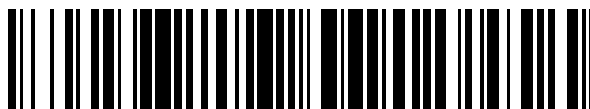


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 931**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2013 PCT/IL2013/050209**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13132495**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2013 E 13716846 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2822971**

54 Título: **Composiciones para inhibición de quiescina sulfhidrilo oxidasa (QSOX1) y usos de las mismas**

30 Prioridad:

07.03.2012 US 201261607696 P
28.06.2012 US 201261665365 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2018

73 Titular/es:

YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)
At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
76100 Rehovot , IL

72 Inventor/es:

FASS, DEBORAH;
GROSSMAN, IRIS;
ILANI, TAL y
ALON, ASSAF

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 691 931 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

Composiciones para inhibición de quiescina sulfhidrido oxidasa (QSOX1) y usos de las mismas

La presente divulgación, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a agentes inhibidores de QSOX1 y, más particularmente, pero no exclusivamente, al uso de los mismos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con laminina.

La quiescina sulfhidrido oxidasa 1 (QSOX1) es una enzima que usa un cofactor de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) unido para mediar en la transferencia de electrones de pares de grupos de tiol en proteínas sustrato a oxígeno molecular, generando peróxido de hidrógeno como un subproducto. QSOX1 comparte esta actividad catalítica fundamental de la formación de disulfuro con varias otras enzimas que actúan en el plegamiento proteico de estadio temprano en el retículo endoplásmico (RE) y con enzimas que median en el plegamiento y la conservación de proteínas en el espacio intermembrana mitocondrial. Sin embargo, QSOX1 es el único catalizador de disulfuro que se sabe que está localizado principalmente en orgánulos corriente abajo del RE en la ruta secretora y que experimenta secreción regulada de las células. QSOX1 es una proteína multidominio que experimenta una serie de etapas de intercambio de ditiol/disulfuro para pasar electrones de tioles sustrato a su cofactor FAD. Los dos principales dominios redox activos de la enzima, el primero de los cuales interacciona con el sustrato proteico que contiene tiol y el segundo de los cuales cataliza la reducción de oxígeno molecular, deben cambiar sus orientaciones relativas durante el ciclo de reacción. En particular, el motivo de dicisteína redox activo en el dominio de pliegue de tiorredoxina, amino terminal, (Figura 1A-B) debe estar suficientemente expuesto al disolvente para aceptar electrones de proteínas sustrato. El dominio Trx debe entonces internarse frente al motivo de dicisteína redox activo del dominio de pliegue de ERV generador de disulfuro (Erv) para continuar transfiriendo los electrones (Figura 1A-B). Un conjunto de estructuras cristalinas de QSOX de mamíferos y de parásito tripanosómico ilustró la naturaleza de los cambios conformacionales mostrados por enzimas QSOX e identificó el enlazador flexible que permite dichos reordenamientos.

QSOX1 se descubrió inicialmente como un catalizador de la formación de enlace disulfuro en leche y secreciones de la vesícula seminal de mamíferos [Janolino V.G. y Swaisgood H.E. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2532-2538]. El transcrito de QSOX1 se identificó posteriormente mediante su inducción en fibroblastos de pulmón cultivados a medida que alcanzaron la confluencia y entraron en el estado quiescente [Coppock D.L. *et al.* (1993) Cell Growth Differ. 4, 483-493]. Se ha observado expresión de QSOX1 *in vivo* durante el desarrollo embrionario [Portes K.F. *et al.* (2008) J. Mol. Histol. 39, 217-225] así como en muchos órganos adultos y tipos de tejidos. Los niveles de QSOX1 son particularmente altos en órganos con alta capacidad secretora tales como pulmón, ovario y endometrio [Musard J. F. *et al.* (2001) Biochem. Biophys. Res. Comm. 287, 83-91] y en la capa epitelial superficial del estómago, bronquiolos, glándulas salivales, esófago, islotes de Langerhans, vejiga urinaria y los sistemas reproductores tanto masculino como femenino [Tury A. *et al.* (2006) Cell Tissue Res. 323, 91-103]. QSOX1 también muestra un patrón de expresión espacial y temporalmente complejo en el cerebro en desarrollo [Amiot C. *et al.*, (2004) Brain Res. Mol. Brain Res. 125, 13-21]. Se mostró que QSOX1 producida por fibroblastos quiescentes se secretaba [Coppock D. *et al.*, (2000) Biochem. Biophys. Res. Comm. 269, 604-610] y la actividad sulfhidrido oxidasa en diversos fluidos corporales sugiere también la secreción de QSOX1 de otros tipos celulares [Janolino V.G. y Swaisgood, mencionado anteriormente].

El fin de un catalizador de disulfuro extracelular o secretor tardío ha seguido siendo un interrogante no resuelto importante, y aún no se han identificado sustratos nativos de QSOX1.

Recientemente varios investigadores han encontrado conexiones entre QSOX1 y el cáncer. Según las enseñanzas de Antwi *et al.* [Antwi K. *et al.* (2009) J. Proteome Res. 8, 4722-4731], se vieron niveles aumentados de proteína QSOX1 en adenocarcinomas ductales del páncreas (ADP) y micrometástasis asociadas en pacientes humanos. Asimismo, estudios espectrométricos de masas del peptidoma del suero de enfermos de ADP revelaron altos niveles de un péptido procedente, aparentemente de forma proteolítica, de QSOX1 [Antwi *et al.* (2009), mencionado anteriormente], Katchman *et al.* enseñan que QSOX1 promueve la invasión de células de tumores pancreáticos mediada por metaloproteinasas de la matriz [Katchman *et al.* (2011) Mol Cancer Res; 9(12) 1621-31]. Por otra parte, en un modelo de ratón para cáncer de próstata, la pérdida de función del supresor tumoral Nkx3.1 dio como resultado aumento de la producción de QSOX1 [Ouyang X. *et al.* (2005) Cancer Res. 65, 6773-6779]. QSOX1 tenía expresión particularmente alta en hiperplasia prostática y neoplasia interepitelial, acontecimientos tempranos en oncogénesis [Song H. *et al.* (2009) Oncogene 28, 3307-3319].

La técnica antecedente adicional incluye las solicitudes de PCT n.º WO 2010/077921 y WO 2010/071787.

WO 2012040095 proporciona métodos para el tratamiento de tumores administrando un inhibidor de quiescina sulfhidrido oxidasa 1 (QSOX1), composiciones que comprenden dichos inhibidores y métodos para identificar dichos inhibidores.

El documento WO 0206315 desvela secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos novedosas. Algunas de las secuencias de ácidos nucleicos novedosas son variantes de corte y empalme alternativo de transcritos previamente conocidos. Otras de estas secuencias de ácidos nucleicos novedosas son similares a una

secuencia expresada previamente conocida. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos novedosas tienen una diversidad de aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

El documento CN 101503679 obtiene una secuencia de ADNc de región codificante de longitud completa de una proteína QSOX mediante un método de RT-PCR. Después se lleva a cabo mutación puntual fija; se construyen genes de tipo silvestre y genes mutantes respectivamente en serie pET, serie pGEX y serie pTYB de vectores de vectores de expresión de pronúcleo y vectores de serie de expresión en levadura para convertir *Escherichia coli* y levadura para expresión inductiva y llevar a cabo la purificación y el estudio de la función en un producto expresado.

El documento WO 2010077921 proporciona métodos para evaluar la probabilidad de un tumor de próstata en un sujeto, o para supervisar la eficacia de tratamiento para cáncer de próstata, que implican la detección de QSOX1 en muestras tisulares del paciente.

Jack Geltosky desvela "QSOX1 como una diana farmacológica antineoplásica" (*QSOX1 as an anti-neoplastic drug target*), (30/08/2011), página 1-1, URL: <http://azte.technologypublisher.com/files/sites/ncs-m11-003.pdf>, (20111108).

KATCHMAN BENJAMIN A ET AL, desvela que la "Quiescencia sulfhidrilo oxidasa 1 promueve la invasión de células tumorales pancreáticas mediada por metaloproteinasas de la matriz" (*Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes invasion of pancreatic tumor cells mediated by matrix metalloproteinases*), MOLECULAR CANCER RESEARCH: MCR DIC 2011, (12/2011), vol. 9, n.º 12, ISSN 1557-3125, PÁGINAS 1621 - 1631, página 1626, pár. "Role of QSOX1 in tumour cell invasion" [Y] 1-56.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que inhibe la actividad QSOX1, para su uso en el tratamiento de un tumor o tumor sólido metastásico.

La presente invención se refiere también a un anticuerpo monoclonal aislado MAb492.1 que comprende las CDR de SEQ ID NO: 29-34.

La presente invención se refiere aún a un anticuerpo monocatenario aislado scFV492.1 que comprende las CDR de SEQ ID NO: 29-34.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal o monocatenario aislado o una cantidad terapéuticamente eficaz del mismo es para su uso como un medicamento.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal o monocatenario aislado o una cantidad terapéuticamente eficaz del mismo es para su uso en el tratamiento de tumor o tumor sólido metastásico.

Breve descripción de los dibujos

Algunas realizaciones de la divulgación se describen en la presente memoria, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se subraya que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para fines de análisis ilustrativo de realizaciones de la divulgación. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la materia cómo pueden practicarse realizaciones de la divulgación.

En los dibujos:

Las FIG. 1A-B son ilustraciones esquemáticas que representan la organización de dominios y el ciclo de reacción de HsQSOX1. La FIG. 1A es un diagrama esquemático que ilustra los cuatro dominios de HsQSOX1. El fragmento amino terminal, HsQSOX1_{Trx}, está compuesto por dos dominios de pliegue de Trx. El fragmento carboxilo terminal, HsQSOX1_{Erv}, está compuesto por dos dominios de pliegue de Erv. El módulo de sulfhidrilo oxidasa de tipo Erv degradado que ha perdido sus cisteínas de sitio activo y capacidad de unión a cofactor se designa "ψErv". Las bolas amarillas representan los motivos CXXC (disulfuros redox activos). Los tres hexágonos fusionados indican el cofactor de dinucleótido de flavina y adenina (FAD), unido con el dominio de Erv; y la FIG. 1B ilustra las etapas en el ciclo de reacción de oxidación del sustrato y reducción de oxígeno por HsQSOX1. Los dominios están representados con los mismos nombres y colores que en A, representando una línea gris el enlazador entre el dominio de Trx2 y el dominio de ψErv. Las bolas amarillas fusionadas representan enlaces disulfuro. Las bolas amarillas separadas indican cisteínas reducidas.

Las FIG. 1C-M representan que QSOX1 está localizado en el Golgi en fibroblastos subconfluentes y es secretado por fibroblastos confluentes. Las FIG. 1C-J son fotografías que ilustran fibroblastos WI-38 subconfluentes inmunoteñidos con un anticuerpo (rojo) y QSOX1 (verde) específico del Golgi (p115) o específico del RE (GRASP65). La tinción con DAPI (azul) indica núcleos. La barra de escala es de 10 µm; La FIG. 1K es una fotografía que ilustra una transferencia de western de extractos celulares WI-38 confluentes (parte superior) y RT-PCR (parte inferior) que demuestran expresión de QSOX1 pero no QSOX2 en estas células; La FIG. 1L es una fotografía que ilustra una transferencia de western de sobrenadantes de cultivo de WI-38 (parte superior) y RT-PCR (parte inferior) de células en función de la confluencia; y la FIG. 1M es un gráfico de barras que ilustra la actividad sulfhidrilo

oxidasa de sobrenadantes de cultivo celular medidos por el consumo de oxígeno tras la adición de DTT 5 mM.

Las FIG. 2A-H representan que es necesaria QSOX1 activa para formar una monocapa densa de fibroblastos en cultivo. Las FIG. 2A-D son fotografías que ilustran la tinción con DAPI de monocapas de cultivo WI-38 cuatro días después de la transfección con ARNip de control (ipCONTROL) o específico de QSOX1 (ipQSOX1) siRNA. Las FIG. 2C-D representan cultivos tratados con ipQSOX1 que se complementan con QSOX1 50 nM recombinante (rQSOX1) o un mutante inactivo (rQSOX1-AA) 24 horas después de la transfección con ARNip. La barra de escala es de 10 μ m; la FIG. 2E es un gráfico de barras que ilustra la cuantificación de números de células de campos como se muestra en las FIG. 2A-D; la FIG. 2F es una ilustración esquemática de un diagrama de organización de dominio y estructura de QSOX1 con disulfuros redox activos mostrados como bolas amarillas emparejadas marcadas como "CXXC". El cofactor de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) está indicado por hexágonos fusionados (arriba) o barras naranjas (abajo). La línea vertical en zigzag representa un acontecimiento de corte y empalme alternativo que genera una versión soluble o unida a membrana de QSOX1. "TM" significa región transmembrana. QSOX1 recombinante abarca todos los dominios QSOX1 y sitios redox activos. El mutante rQSOX1-AA carece de las cisteínas redox activas amino terminales; y la FIG. 2G-H son gráficos de barras que ilustran que la atenuación de QSOX1 provoca desprendimiento celular de la placa de cultivo tisular. La FIG. 2G muestra números de células, en placas de control y de atenuación de QSOX1, como se indica para los días 1, 2 y 4 después de transfección de ARNip. La FIG. 2H presenta el número de células halladas desprendidas y flotando, pero viables como se indica por tinción con azul de tripano en sobrenadantes de cultivo.

Las FIG. 3A-R son fotografías que representan que QSOX1 es necesaria para la incorporación de laminina en la membrana basal. Las FIG. 3A-L ilustran la inmunotinción de laminina usando anticuerpos policlonales P1 que revelan una matriz de laminina más sustancial en los cultivos de WI-38 de control (ipCONTROL, FIG. 3A-C) en comparación con atenuación de QSOX1 (ipQSOX1, FIG. 3D-F). La complementación de cultivos de siQSOX1 con QSOX1 recombinante (rQSOX1, FIG. 3G-I), pero no el mutante rQSOX1-AA (FIG. 3J-L), 24 horas después de la transfección con ARNip restaura la matriz de laminina gruesa. La barra de escala es de 10 μ m; y las FIG. 3M-R ilustran la inmunotinción de monocapas celulares de atenuación de control y tratadas con ipQSOX1 con anticuerpos específicos de cadena de laminina. LAMA2 y LAMA4 indican tinción con anticuerpos que reconocen las cadenas α 2 y α 4 de laminina, respectivamente. La barra de escala es de 10 μ m.

Las FIG. 4A-C representan que QSOX1 es necesaria para la incorporación de laminina en la membrana basal. La FIG. 4A es un gráfico de barras que representa la cuantificación de la intensidad de laminina de campos tal como se muestra en las FIG. 3A-L. La FIG. 4B es una fotografía que ilustra una transferencia de western de laminina (panel superior) y QSOX1 (panel inferior) en muestras de sobrenadantes de cultivo celular WI-38. Los carriles 1-2 corresponden a sobrenadantes de células tratadas con ARNip de control. Los carriles 3-5 corresponden a sobrenadantes de células tratadas con ARNip específico de QSOX1; y la FIG. 4C es un gráfico de barras que representa la cuantificación de la intensidad de cadena de laminina de campos tal como se muestra en las FIG. 3M-R.

Las FIG. 5A-F son fotografías que representan que QSOX1 es necesaria para la incorporación de laminina en la membrana basal. Las imágenes por MEB de superficies de WI-38 revelan un material agrupado definido, indicado por flechas en imágenes tomadas a menor aumento. Este material, que se supone que es laminina que contiene la cadena α 4, apareció solamente en células tratadas con ARNip de control y no en células tratadas con ipQSOX1.

La FIG. 5G es un diagrama esquemático del ensayo de migración usado para las FIG. 6A-R. Se cultivaron fibroblastos hasta su confluencia en la cámara superior antes de la adición de células tumorales marcadas con fluorescencia. Se contaron las células tumorales que habían penetrado la capa de fibroblastos/MEC, migrado a través de la membrana porosa y alcanzado la superficie inferior de la cámara superior.

Las FIG. 6A-Q representan que QSOX1 producida por fibroblastos promueve la adhesión y migración de células epiteliales tumorales. Las FIG. 6A-O son fotografías que representan células cancerosas de pulmón humano H460 marcadas con fluorescencia que han migrado a través de una capa estromal preformada de fibroblastos WI-38 sometida a los tratamientos indicados. Se añadieron enzimas recombinantes (rQSOX1, FIG. 6G-I y rQSOX1-AA, FIG. 6J-L) 24 horas después de transfección con ARNip de los fibroblastos (como en las FIG. 2A-H, 3A-R, 4A-C y 5A-F). Para las FIG. 6M-O, marcadas "anti- α 6," las células H460 se trataron con anticuerpos contra la subunidad de integrina α 6 que bloquean la actividad de integrina antes de la superposición sobre fibroblastos transfectados de control. Se muestran tres campos representativos para cada tratamiento; la FIG. 6P es un gráfico de barras que representa la cuantificación de números de células migratorias de paneles tal como se muestra en las FIG. 6A-O; y FIG. 6Q es un gráfico de barras que indica el número de células, en cada una de las muestras, que permanecen adherentes después de someterse a fuerza.

Las FIG. 6R-S representan la cuantificación de células cancerosas pancreáticas BxPC-3 marcadas con fluorescencia que migraron a través de la capa estromal preformada de fibroblastos pancreáticos (FIG. 6R), y células cancerosas de pulmón H460 que permanecen adherentes a una capa de fibroblastos de pulmón después de someterse a fuerza (FIG. 6S), mostrada como un porcentaje de valores de control (ipCONTROL).

La FIG. 6T representa microscopia de fuerza atómica que muestra que los cultivos de fibroblastos de control son

más rígidos que los producidos en ausencia de QSOX1. Las propiedades mecánicas de cultivos de fibroblastos y MEC asociada se alteraron como resultado del agotamiento de QSOX1. Se usó microscopia de fuerza atómica para medir la rigidez de fibroblastos WI-38 confluentes de control o con agotamiento de QSOX1. Medida con un tamaño de punta y profundidad de indentación elegidos para optimizar la sensibilidad a alteraciones en la MEC, la distribución de módulos elásticos para controlar los cultivos de fibroblastos alcanzó un máximo entre 4 y 6 kPa, pero se observó un amplio intervalo de valores hasta 30 kPa. Este intervalo de módulos elásticos es coherente con un estudio de AFM previo de fibroblastos cultivados. La distribución para cultivos de atenuación de QSOX1 mostró un pico a valores de rigidez menores, de 2 a 4 kPa, con algunas mediciones dispersadas entre 8 kPa y 50 kPa. El conjunto sustancial de curvas de indentación que producen módulos elásticos de más de 100 kPa obtenidos para cultivos celulares con atenuación de QSOX1 pero no de control probablemente represente contacto directo con el soporte de placa de petri subyacente.

Las FIG. 7A-D representan que QSOX1 está regulada positivamente en fibroblastos asociados con tumores. La FIG. 7A es una transferencia de western de QSOX1 en sobrenadantes de células WI-38 cultivadas durante dos días en ausencia o presencia de medio acondicionado (M.A.) de células de carcinoma de pulmón H460; la FIG. 7B es un gráfico de barras que representa que las células fibroblásticas asociadas con cáncer (FAC) cultivadas *ex vivo* muestran mayores niveles de QSOX1 en comparación con fibroblastos tomados de tejido más distante de los crecimientos tumorales (FN = fibroblastos normales). Cuando se exponen a medio acondicionado de cultivos de células tumorales H460, se induce que los FN transcriban y secreten niveles de QSOX1 comparables a los producidos por FAC; y las FIG. 7C-D ilustran secciones histológicas de carcinoma ductal de mama teñido con anti-QSOX1. Las flechas indican fibroblastos asociados con tumor representativos que expresan altos niveles de QSOX1. La cabeza de flecha indica una célula fibroblástica negativa para QSOX1.

Las FIG. 8A-K representan que la inhibición de QSOX1 bloquea la migración de células epiteliales. Las FIG. 8A-F son fotografías que ilustran células cancerosas de pulmón humano H460 marcadas con fluorescencia que han migrado a través de una capa estromal preformada de fibroblastos WI-38 de control, no tratados, o fibroblastos WI-38 cultivados en presencia de un anticuerpo monoclonal específico de QSOX1 (anti-QSOX1, FIG. 8C-D) o un anticuerpo de control (anti-CD19, FIG. 8E-F) en el medio de cultivo. Se muestran dos campos representativos en cada caso; la FIG. 8G es un gráfico de barras que ilustra la cuantificación de números de células migratorias de paneles tal como se muestra en las FIG. 8A-F; y las FIG. 8H-K son fotografías que ilustran la tinción con IF de laminina en MB de células WI-38 cultivadas en ausencia o presencia de anticuerpo monoclonal específico de QSOX1. Se muestran dos campos representativos.

Las FIG. 9A-L representan caracterización de QSOX1 de fibroblastos confluentes. Las FIG. 9A-F son fotografías que representan células HUVEC inmunoteñidas con anticuerpos específicos del Golgi (p115) o específicos del RE (GRASP65) y QSOX1. La tinción con DAPI (azul) indica núcleos. La barra de tamaños representa 10 μ m; las FIG. 9G-J son fotografías que representan fibroblastos WI-38 inmunoteñidos con marcador del Golgi p115 (rojo) y QSOX1 (verde). La tinción con DAPI (azul) indica núcleos. La barra de tamaños representa 10 μ m; la FIG. 9K es un gráfico que ilustra una curva de calibración para actividad QSOX1 en el sustrato modelo ditiotreitól (DTT) como se generó usando las concentraciones indicadas de rQSOX1. El punto cero corresponde a consumo de oxígeno de fondo en una solución que contiene DTT pero no enzima. La línea gris es el mejor ajuste para los seis puntos de datos. Los círculos rosas indican las tasas de consumo de oxígeno tras la adición de DTT observada para tres muestras de sobrenadante de cultivos de fibroblastos WI-38 confluentes; y la FIG. 9L es una fotografía que ilustra la secreción de QSOX1 de diversos fibroblastos detectada por transferencia de western (1=WI-38, 2=fibroblastos de pulmón normales, 3=fibroblastos de prepucio humano (FPH)). Cabe señalar que QSOX1 no se secretó de cultivos confluentes de la línea celular epitelial pancreática BxPC (epi) o células HUVEC endoteliales (endo). Las FIG. 10A-D representan caracterización de QSOX1 de fibroblastos confluentes. Identificación por espectrometría de masas de las dos bandas observadas por SDS-PAGE tras inmunoprecipitación de QSOX1 secretada. Los cuatro restos (PELI) a la derecha del resto 600 son únicos de la variante de corte y empalme de QSOX1 más corta. Los 147 restos adicionales a continuación son únicos de la variante de corte y empalme más larga. Las bandas se digirieron en gel con tripsina o quimotripsina. Las letras en rojo indican que se observó un aminoácido mediante LC-MS/MS en al menos un péptido. Los sitios de glucosilación ligados a N potenciales están en un fondo gris. Las barras negras verticales a la izquierda de los restos 601-747 en los paneles del lado derecho indican secuencias halladas solamente en la variante de corte y empalme de QSOX1 más larga. La presencia de aminoácidos rojos en esta región en las muestras tanto de tripsina como de quimotripsina indica que la banda superior de QSOX1 debe obtenerse de la variante de corte y empalme más larga.

Las FIG. 11A-E representan atenuación de QSOX1. La FIG. 11A es una fotografía que representa la alta eficacia de atenuación de QSOX1 en fibroblastos WI-38 usando ARNip como se muestra por aumento por PCR de transcrito de QSOX1 de ARN total y por transferencia de western.

El control de carga usado fue tinción de Coomassie de la membrana de transferencia; La FIG. 11B ilustra que la atenuación de QSOX1 se mantuvo durante al menos 4 días después de transfección de ARNip y dio como resultado niveles de fondo de actividad sulfhidrilo oxidasa en sobrenadantes de cultivo celular, como se supervisa por consumo de oxígeno tras la adición de DTT. De forma correspondiente, la proteína QSOX1 fue prácticamente indetectable en sobrenadantes de cultivo después de atenuación; y las FIG. 11C-E son fotografías que ilustran que la atenuación de QSOX1 no promueve senescencia celular, como se demuestra mediante tinción de X-gal para

actividad β -galactosidasa asociada a senescencia. Se obtuvieron células senescentes de control de un cultivo de tres semanas de edad de células WI-38 de un número de pase alto (mayor de 32).

Las FIG. 12A-Q representan los efectos de atenuación de QSOX1 en la MEC. La FIG. 12A es un gráfico de barras que representa que la atenuación de QSOX1 conduce a aumento del contenido de tiol reactivo aumentado en MB. Los fibroblastos de WI-38 se sometieron a la transfección de ARNip indicada (las muestras de DTT y NEM se prepararon a partir de células transfectadas de control) y se cultivaron durante cuatro días adicionales. Se retiraron células con hidróxido de amonio y se aplicó ThioGlo para cuantificar tioles libres. Se generaron muestras de DTT y NEM aplicando DTT 100 mM o NEM 100 mM a placas de control, retirando por lavado el DTT/NEM y tratando después con ThioGlo; Las FIG. 12B-Q son transferencia de western e inmunofluorescencia que demuestran mayores cantidades de proteínas asociadas a laminina en los sobrenadantes de cultivo celular de células con atenuación de QSOX1, pero solamente cantidades menores en las cantidades incorporadas en la MB.

Las FIG. 13A-N representan los efectos de atenuación de QSOX1 en la MEC. Las FIG. 13A-E ilustran tinción de laminina de campos que contienen números iguales de células que muestran diferencias significativas en la intensidad ya el día dos después de la transfección; la FIG. 13F es una fotografía que muestra que el contenido de proteína total de MB no era apreciablemente diferente para diversos tratamientos con ARNip y QSOX1 recombinante como se indica por tinción de Coomassie de muestras de MB; Las FIG. 13G-L son fotografías que representan que dos redes de laminina independientes con diferentes estabidades coexisten en MB WI-38. Los procedimientos de tinción de IF convencionales provocaron la aparición de puntos grandes que contenían laminina, que desaparecieron en muestras tratadas con ipQSOX1 pero se restauraron mediante la adición de rQSOX1; las FIG. 13M-N son gráficos de barras que representan que rQSOX1 50 nM añadida un día después de la transfección fue suficiente para restaurar números de células normales y composición de laminina a células con atenuación de QSOX1.

La FIG. 14 es un gráfico de barras que representa que QSOX1 producida por fibroblastos pancreáticos promueve la migración de células epiteliales tumorales. Una cuantificación de migración de células cancerosas de páncreas humano BxPC-3 marcadas con fluorescencia a través de una capa estromal preformada de fibroblastos pancreáticos sometidos a los tratamientos indicados.

Las FIG. 15A-D son gráficos lineales que representan la determinación de la constante de inhibición para MAb492.1. La FIG. 15A ilustra una curva de respuesta a dosis de MAb492.1 para HsQSOX1 50 nM, basándose en los resultados de un ensayo colorimétrico que implica oxidación de rRNasa. La actividad inhibidora se expresa como absorbancia a 405 nm, que representa la cantidad de tioles libres que reaccionaron con DTNB y no se oxidaron mediante HsQSOX1. La CI_{50} se determinó mediante análisis de regresión no lineal y produjo un valor de 60 nM; la FIG. 15B ilustra la curva de inhibición de MAb492.1 para HsQSOX1 25 nM, basándose en resultados de ensayos de electrodos de oxígeno a diferentes concentraciones de MAb492.1 (que varían de 250 nM a 1 nM). La actividad inhibidora se expresa como la relación de la tasa inhibida con respecto a la tasa no inhibida. La constante de inhibición se determinó mediante análisis de regresión no lineal y produjo un valor de $1,0 \pm 0,3$ nM; la FIG. 15C es una fotografía que ilustra que se incubó HsQSOX1 10 nM con o sin MAb492.1 250 nM en presencia de las concentraciones indicadas de DTT durante 10 minutos y se inactivó mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA). DTT a 200 μ M proporciona una concentración suficientemente alta de sustrato reductor para obtener tasas iniciales en ensayos de consumo de oxígeno de HsQSOX1 (la K_M de HsQSOX1 para DTT es de aproximadamente 70 μ M), pero no conduce a reducción y desmontaje del anticuerpo, y se usó por lo tanto en el experimento descrito en la FIG. 15B (véase posteriormente); y la FIG. 15D es un gráfico de barras que representa dependencia del sustrato de la inhibición de MAb492.1, basándose en el ensayo de consumo de oxígeno. La velocidad inicial de HsQSOX1 100 nM se midió con respecto a dos concentraciones de DTT, 35 μ M (0,5 KM) y 200 μ M (3 KM), en ausencia y presencia de MAb492.1 50 nM. La relación promedio de tres mediciones entre la velocidad inicial en presencia de MAb492.1 (v_i) con respecto a la velocidad inicial en ausencia de MAb492.1 (v_0) se presenta para cada concentración. Relaciones similares a estas concentraciones diferentes indican que la inhibición no depende del sustrato.

Las FIG. 16A-D son gráficos lineales que representan que MAb492.1 se une con el fragmento amino terminal de HsQSOX1 HsQSOX1₁₋₇₅. La FIG. 16A ilustra curvas de unión de MAb492.1 para HsQSOX1 de longitud completa, y para sus dos fragmentos, basándose en ensayo de unión de ELISA. La alta absorbancia a 630 nm conseguida a bajas concentraciones de proteína diana indica unión estrecha; y las FIG. 16B-D ilustran perfiles de migración de HsQSOX1 de longitud completa, y sus dos fragmentos, obtenidos de cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Las líneas grises representan el perfil de migración de MAb492.1 solo. Las líneas discontinuas representan el perfil de migración de HsQSOX1 o uno de sus fragmentos, solo. Las líneas negras representan el perfil de migración de la mezcla de MAb492.1 y HsQSOX1 o sus fragmentos.

La FIG. 17 es un gráfico lineal que representa una curva de respuesta a dosis de scFv492.1 para HsQSOX1 50 nM, basándose en los resultados de un ensayo colorimétrico que implica oxidación de rRNasa. La actividad inhibidora se expresa como absorbancia a 405 nm, que representa la cantidad de tioles libres que reaccionaron con DTNB. La CI_{50} se determinó mediante análisis de regresión no lineal y produjo un valor de 250 nM, cinco veces mayor que el valor de CI_{50} obtenido para MAb492.1.

La FIG. 18 es un gráfico lineal que representa una curva de respuesta a dosis de Fab procedente de MAb492.1 para

HsQSOX1 50 nM, basándose en los resultados de un ensayo colorimétrico que implica oxidación de rdRNasa. La actividad inhibidora se expresa como absorbancia a 405 nm, que representa la cantidad de tioles libres que reaccionaron con DTNB. La CI_{50} se determinó mediante análisis de regresión no lineal y produjo un valor de 100 nM, dos veces el valor de CI_{50} obtenido para MAb492.1 de longitud completa.

- 5 Las FIG. 19A-C son ilustraciones esquemáticas que representan lo siguiente: la FIG. 19A ilustra la estructura del complejo entre HsQSOX1_{Trx} (Trxl anaranjado, Trx2 gris, motivo CXXC es esferas amarillas) y Fab492.1 (cadena pesada azul, cadena ligera verde). Se presenta una ampliación del sitio de unión con presentación en superficie; la FIG. 19B ilustra una presentación en superficie del complejo de Fab492.1 - HsQSOX1_{Trx} y las CDR de vistas de diferentes ángulos. Coloración de Trxl, cadenas pesadas y ligeras como en A. Los marcadores de CDR están en colores de las CDR en sí mismas. A la izquierda se muestra que Trxl tiene contacto con CDR L1, L3 y H2. La rotación de 180° alrededor del eje y muestra Trxl en contacto con CDR L2, H1 y H3 (medio). A la derecha una vista superior de la superficie de las seis CDR; y la FIG. 19C ilustra una representación de libro abierto de Fab492.1 (izquierda) y Trxl (derecha). Trxl se rota 180° alrededor de un eje vertical en relación con Fab492.1. Coloración de Trxl, motivo CXXC, cadenas pesadas y ligeras como en A. Los restos de la cadena ligera implicada en interacciones con Trxl están en blanco. Los restos de CDR H3 implicados en interacciones con Trxl están en color rosa fresa. Los restos de CDR H2 y H1 implicados en interacciones con Trxl están en morado. Los restos de interacción correspondientes de Trxl están en los mismos colores que los restos de Fab492.1.

- 20 Las FIG. 20A-B son ilustraciones esquemáticas que representan que se presentan restos de la interfaz Fab492.1 - HsQSOX1_{Trx} de Trxl, de la cadena ligera (FIG. 20A) y la cadena pesada (FIG. 20B). Trxl se muestra en una superficie blanca y los restos de interacción específicos se muestran en barras, marcadas con letras negras. La cadena ligera (verde) y cadena pesada (azul) se muestran en dibujo y los restos de interacción específicos se muestran en barras. Las CDR están marcadas. Los enlaces de hidrógeno se presentan con líneas negras discontinuas y se indican sus distancias. Los enlaces catión - π y salinos también se indican.

- 25 Las FIG. 21A-O son fotografías que ilustran células cancerosas de pulmón humano H460 marcadas con fluorescencia que han migrado a través de una capa estromal preformada de fibroblastos WI-38 de control, no tratados, o fibroblastos WI-38 cultivados en presencia de un anticuerpo MAb492.1 o de control (anti- β actina) en el medio de cultivo. Se muestran tres campos representativos en cada caso.

- 30 La FIG. 22 es un gráfico de barras que representa la inhibición de la migración de células tumorales por MAb492.1. Se cultivaron células fibroblásticas WI-38 durante cuatro días en una membrana porosa y se permitió que produjeran MEC en presencia o ausencia de una concentración diferente de MAb492.1. Posteriormente, se superpusieron células de cáncer de pulmón H460 marcadas con fluorescencia en los fibroblastos. Se indica el número de células H460 marcadas que habían penetrado en la capa de fibroblastos en cada muestra después de 24 horas. Cabe señalar que esta FIG. es una cuantificación de los paneles presentados en las FIG. 21O-A.

- 35 La FIG. 23 es una imagen de bioluminiscencia emitida de células de cáncer de mama MDA-MB-231. La FIG. muestra tres ratones que presentan tumores localizados una semana después de la coinoculación de células tumorales y fibroblastos en el panículo adiposo mamario.

- 40 La FIG. 24 es un gráfico de barras que representa la actividad de diversas enzimas QSOX1 de mamífero en ausencia y presencia de MAb492.1. Las tasas de actividad se evaluaron usando un ensayo de consumo de oxígeno. Se realizaron mediciones para cada enzima QSOX1 en presencia de diferentes concentraciones de MAb492.1 y se calcularon las pendientes (tasas) iniciales. Se presentan tasas de agotamiento de oxígeno para cada enzima QSOX1 en ausencia de MAb492.1 (gris), en presencia de MAb492.1 250 nM (negro) y en presencia de MAb492.1 1 μ M (blanco). Cabe destacar que HsQSOX1 es la única enzima que fue inhibida por MAb492.1 a las concentraciones de MAb492.1 ensayadas.

- 45 La FIG. 25 es un alineamiento de secuencias de HsQSOX1 con otras enzimas QSOX1 de mamífero que muestran la parte del dominio de Trxl que se une con MAb492.1, incluyendo el motivo CGHC de sitio activo y los restos que entran en contacto con la cadena ligera de MAb492.1 y CDR H3. Los restos implicados en las interacciones con MAb492.1 están en negrita. Los restos de MmQSOX1 (SEQ ID NO: 43), RnQSOX1 (SEQ ID NO: 42) y CpQSOX1 (SEQ ID NO: 41) que difieren de los restos de HsQSOX1 correspondientes (SEQ ID NO: 3) se colorean en rojo.

- 50 La FIG. 26 es una superposición entre la estructura del complejo de HsQSOX1_{Trx}-Fab492.1 y la estructura de MmQSOX1_{Trx}. HsQSOX1_{Trx} está en azul, y las dos cadenas de MmQSOX1_{Trx} de la misma unidad asimétrica están en verde y magenta. Las cisteínas de sitio redox activo están marcadas como dos bolas amarillas. A la derecha hay una ampliación del choque esperado entre Tyr92 de CDR L3 y Asn117 de MmQSOX1. A la izquierda hay una ampliación del choque esperado entre Tyr100 de CDR H3 y el bucle de los restos 138-141 de MmQSOX1. La numeración de los restos de HsQSOX1 y MmQSOX1 es según MmQSOX1, para facilitar la comparación.

- 55 La FIG. 27 es un gráfico de barras que representa el porcentaje de actividad para diferentes mutantes de MmQSOX1 en presencia de MAb492.1. Las mediciones se realizaron tres veces y se promediaron. La enzima MmQSOX1 de tipo silvestre es resistente a la inhibición de MAb492.1, mientras que los mutantes de TLPG y A119P mostraron algo de susceptibilidad a MAb492.1. MmQSOX1 con ambas mutaciones se inhibe en el mismo grado que HsQSOX1.

Descripción de realizaciones específicas de la divulgación

La presente divulgación, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a agentes inhibidores de QSOX1 y, más particularmente, pero no exclusivamente, al uso de los mismos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con laminina.

- 5 Los principios y la operación de la presente divulgación pueden entenderse mejor en referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la divulgación en detalle, debe entenderse que la divulgación no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificada por los Ejemplos. La divulgación tiene capacidad para otras realizaciones o puede practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en la presente memoria son para el fin de describir no deberían interpretarse como limitantes.

10 La quiescencia sulfhidrido oxidasa 1 (QSOX1) es una enzima que usa un cofactor de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) unido para mediar en la transferencia de electrones de pares de grupos de tiol en proteínas sustrato a oxígeno molecular, generando peróxido de hidrógeno como un subproducto. QSOX1 está localizado principalmente en orgánulos corriente abajo del RE en la ruta secretora y experimenta secreción regulada de las células.

15 La membrana basal (MB) es la capa de matriz extracelular (MEC) en el interfaz entre cavidades corporales o vasos sanguíneos y fibroblastos estromales subyacentes. La MB está compuesta de laminina, colágeno IV, proteoglicanos de sulfato de heparina, entactina y muchas otras macromoléculas contribuyentes. La MB es un medio complejo para adherencia y señalización celular y su composición y propiedades afectan profundamente al comportamiento de células epiteliales asociadas.

Al reducir la presente divulgación a la práctica, los presentes inventores han descubierto un papel fundamental de QSOX1 en el ensamblaje de laminina en la membrana basal (MB) y la importancia del mismo en la interfaz con la invasión de células tumorales. Específicamente, los presentes inventores han ilustrado que QSOX1 es necesaria para funcionalidad de laminina apropiada (por ejemplo ensamblaje y soporte de la adhesión y migración celular) que a su vez permite que las células y células cancerosas en particular migren a través de la membrana basal. El hallazgo de QSOX1 como un regulador primario del proceso de ensamblaje de laminina apunta a este como una diana fundamental en el proceso metastásico y la migración celular.

Al reducir adicionalmente la presente divulgación a la práctica, los presentes inventores fueron capaces de producir por primera vez anticuerpos inhibidores para QSOX1 y sustentaron su papel en el ensamblaje de laminina y la migración de células tumorales y, por lo tanto, estos anticuerpos pueden usarse para modulación de la membrana basal y como agentes terapéuticos para la inhibición de la migración de células tumorales.

Como se muestra posteriormente en la presente memoria y en la sección de ejemplos a continuación, los presentes inventores han descubierto que QSOX1 está implicada directamente en el ensamblaje de MB (véase el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos a continuación). El componente de MB más notablemente afectado por QSOX1 es laminina (véase Figuras 12B-Q), siendo las isoformas de laminina más sensibles a la presencia de QSOX1 las que contienen la cadena $\alpha 4$ (véase Tabla 2, posteriormente en la presente memoria). Los presentes inventores observaron que el agotamiento de QSOX1 condujo a la aparición de isoformas de laminina solubles en los sobrenadantes de cultivos de fibroblastos confluentes (véase Figuras 12B-Q, Figuras 3A-L y Figura 4A). Los inventores observaron adicionalmente que la MB producida en ausencia de QSOX1 no consiguió soportar la adherencia y migración de células epiteliales agresivas (véase Figuras 8A-K).

Por otra parte, los presentes inventores generaron un anticuerpo monoclonal que se une con e inhibe QSOX1 humana (HsQSOX1), construyeron una versión de dominio variable monocatenaria recombinante del anticuerpo y caracterizaron el sitio de unión a anticuerpo en QSOX1 (véase Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos a continuación). Los presentes inventores han ilustrado en un modelo de ratón *in vivo* que el tratamiento con mAb492.1, a una dosis de 30 mg/kg, redujo significativamente la infiltración de células de cáncer de mama en ganglios linfáticos en comparación con ratones que no recibieron tratamiento (véase Tablas 6 y 7 posteriormente en la presente memoria).

Los presentes inventores han mostrado adicionalmente que HsQSOX1 es comparable a otros ortólogos de QSOX1. El alineamiento de la secuencia del dominio Trxl de HsQSOX1 con la región correspondiente de otras enzimas QSOX1 mostró que las secuencias próximas a los motivos redox activos de CGHC son idénticas (véase Figura 25). Sin embargo, la región de HsQSOX1 unida a la cadena ligera de anticuerpo y la secuencia de CDR H3 (HsQSOX1₁₀₆₋₁₅₂) reveló algunas diferencias en comparación con otras enzimas QSOX1 (véase Figura 25). En particular, Pro 116, que se ajusta bien en una hendidura entre cadenas laterales de CDR L3 de MAb492.1, se reemplaza con alanina en otras enzimas QSOX1 de mamífero. Otra región que muestra diferencias en la secuencia es V135-V138 de HsQSOX1, correspondiente a Thr₁₃₈-Gly₁₄₁ en MmQSOX1. Estos descubrimientos proporcionan el contexto para generar anticuerpos capaces de unirse con QSOX1 de ratón.

Tomadas juntas las presentes enseñanzas describen un valor terapéutico para las moléculas inhibidoras de QSOX1 en el tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas con laminina tales como tumores metastásicos.

Por lo tanto, según un aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para inhibir o prevenir el ensamblaje de laminina en una membrana basal, comprendiendo el método poner en contacto un tejido con un agente que inhibe la actividad o expresión de QSOX1, inhibiendo o previniendo de este modo el ensamblaje de laminina en la membrana basal.

- 5 Según otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para inhibir la migración celular mediante una membrana basal que comprende laminina, comprendiendo el método poner en contacto un tejido con un agente que inhibe la actividad o expresión de QSOX1, inhibiendo de este modo la migración celular mediante la membrana basal que comprende laminina.

- 10 Como se emplea en la presente memoria, el término "laminina" se refiere a una proteína laminina humana. Típicamente las lamininas son proteínas triméricas que contienen una cadena α , una cadena β y una cadena γ (halladas en cinco, cuatro y tres variantes genéticas, respectivamente). Por lo tanto, el término laminina como se emplea en la presente memoria abarca cualquier tipo de laminina humana, incluyendo cualquiera de las diferentes combinaciones de cadenas. Las diferentes cadenas y moléculas triméricas difieren con respecto a su distribución tisular reflejando aparentemente diversas funciones *in vivo*. Las lamininas ejemplares de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMA4, LAMA5, LAMB1, LAMB2, LAMB3, LAMB4, LAMC1, LAMC2 y LAMC3.

Según una realización de la presente divulgación, la laminina comprende una cadena alfa 4.

Según una realización específica, la laminina es laminina-411 o laminina 421.

- 20 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "ensamblaje de laminina" se refiere a la incorporación de proteínas lamininas en la lámina basal (es decir una de las capas de la membrana basal). Típicamente, la laminina se secreta de células (por ejemplo fibroblastos, células epiteliales, células tumorales) y se incorpora en matrices extracelulares asociadas a células donde forman redes independientes y se asocian con redes de colágeno de tipo IV mediante entactina, fibronectina y perlecano.

- 25 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "membrana basal" o "membrana basal que comprende laminina" se refiere a la capa fina de fibras que ancla y soporta el epitelio y endotelio y comprende la lámina basal (es decir que comprende laminina).

- 30 Como se emplea en la presente memoria la expresión "inhibir o prevenir el ensamblaje de laminina" se refiere a reducir, invertir, atenuar, minimizar, suprimir o detener el ensamblaje de laminina en una membrana basal. Según una realización, la inhibición o prevención del ensamblaje de laminina es en al menos aproximadamente 10 %, en al menos aproximadamente 20 %, en al menos aproximadamente 30 %, en al menos aproximadamente 40 %, en al menos aproximadamente 50 %, en al menos aproximadamente 60 %, en al menos aproximadamente 70 %, en al menos aproximadamente 80 %, en al menos aproximadamente 90 % o en al menos aproximadamente 100 %, en comparación con ensamblaje de laminina en ausencia del inhibidor de QSOX1 (como se describe adicionalmente posteriormente en la presente memoria). Por lo tanto, según una realización de la divulgación no se incorpora laminina en la membrana basal.

- 35 Como se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos a continuación, la laminina que no se incorpora en la membrana basal puede encontrarse en forma soluble (por ejemplo en el medio de cultivo de células cultivadas *in vitro*). Por lo tanto, la supervisión de la reducción del ensamblaje de laminina puede supervisarse mediante por ejemplo tinción de inmunofluorescencia (IF) de la matriz extracelular o mediante transferencia de Western de la laminina soluble (es decir la que no se hubo incorporado en la membrana basal).

- 40 Se apreciará que la inhibición o prevención del ensamblaje de laminina también puede ser ventajoso en situaciones en las que se produce tejido conectivo en exceso de una manera no estructurada en un órgano o tejido en un proceso reparador o reactivo, tal como fibrosis. Por lo tanto, al reducir adicionalmente la presente divulgación a la práctica, la inhibición de QSOX1 y posteriormente la generación de laminina soluble puede ser terapéutica para procesos fibróticos.

Se apreciará que las lamininas son una parte biológicamente activa importante de la lámina basal y la membrana basal que influyen en la adhesión, señalización, migración, fenotipo, diferenciación y supervivencia celular.

- 45 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "migración celular" se refiere al proceso celular en el que una célula se mueve de una localización a otra. Una migración celular ejemplar de la presente divulgación comprende migración de células tumorales que conduce a metástasis.

- 50 Por lo tanto, una célula según las presentes enseñanzas puede comprender, por ejemplo, una célula del cerebro, una neurona, una célula cardíaca, una célula muscular, una célula cutánea, una célula ósea, una célula pancreática, una célula hepática, una célula renal, una célula intestinal, una célula del bazo, una célula respiratoria, una célula pulmonar, un linfocito o un monocito. La célula de la presente divulgación puede comprender una célula sana o puede como alternativa comprender una célula mutada (por ejemplo una célula tumoral).

Como se emplea en la presente memoria la expresión "inhibir la migración celular" se refiere a reducir, invertir, atenuar, minimizar, suprimir o detener la migración de una célula (por ejemplo célula tumoral) mediante una membrana basal que comprende laminina. Según una realización, la inhibición o prevención del ensamblaje de laminina es en al menos aproximadamente 10 %, en al menos aproximadamente 20 %, en al menos aproximadamente 30 %, en al menos aproximadamente 40 %, en al menos aproximadamente 50 %, en al menos aproximadamente 60 %, en al menos aproximadamente 70 %, en al menos aproximadamente 80 %, en al menos aproximadamente 90 % o en al menos aproximadamente 100 %, en comparación con la migración celular mediante una membrana basal que comprende laminina en ausencia del inhibidor de QSOX1 (como se describe adicionalmente posteriormente en la presente memoria). Por lo tanto, según una realización de la divulgación la migración celular está completamente inhibida a través de la membrana basal.

Como se ha mencionado anteriormente en la presente memoria, los métodos de la presente divulgación se realizan poniendo en contacto un tejido con un agente que inhibe la actividad o expresión de QSOX1 (también denominado en la presente memoria "inhibidor de QSOX1").

Como se emplea en la presente memoria, el término "QSOX1" se refiere a la quiescina sulfhidrilo oxidasa 1 (por ejemplo, humana), también denominada QSCN6. El número de referencia de proteína para la variante larga de QSOX1 humana en la base de datos del NCBI es NP_002817 (SEQ ID NO: 1), y el número de referencia para la forma corta de QSOX1 humana es NP_001004128 (SEQ ID NO: 2). Los inhibidores de proteínas QSOX1 de la presente divulgación median en la elevación de laminina ensamblada erróneamente (es decir laminina disfuncional) en la membrana basal.

El término "tejido" se refiere a parte de un organismo que consiste en células diseñadas para realizar una función o funciones. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, tejido cerebral, retina, tejido cutáneo, tejido hepático, tejido pancreático, hueso, cartílago, tejido conectivo, tejido sanguíneo, tejido muscular, tejido cerebral de tejido cardíaco, tejido vascular, tejido renal, tejido pulmonar, tejido gonadal y tejido hematopoyético.

Según una realización de la presente divulgación, el tejido es un tejido tumoral.

Según otra realización, el tejido comprende fibroblastos.

Puede efectuarse regulación negativa de QSOX1 en el nivel genómico y/o del transcrito usando una diversidad de moléculas que interfieren con la transcripción y/o la traducción [por ejemplo, agentes de silenciamiento de ARN (por ejemplo, antisentido, ARNip, ARNhp, microARN), ribozima y ADNzima] o en el nivel proteico usando, por ejemplo, antagonistas, enzimas que escinden el polipéptido y similares, siempre que la actividad de QSOX1 en la mediación del ensamblaje de membrana basal apropiado que permite la migración celular esté inhibida como se ha descrito anteriormente. Específicamente, la inhibición del ensamblaje de membrana basal puede ensayarse cuantificando el nivel y la localización de laminina soluble como se describe en el presente documento.

Según una realización, el agente capaz de regular negativamente una actividad QSOX1 es un agente polipeptídico.

Los agentes polipeptídicos ejemplares que pueden regular negativamente la actividad QSOX1 comprenden un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un péptido, una molécula negativa dominante o un inhibidor natural capaz de regular negativamente una actividad QSOX1 uniéndose específicamente con QSOX1 e interfiriendo con su actividad. Preferentemente, el anticuerpo se une específicamente con al menos un epítipo de una QSOX1. Como se emplea en la presente memoria, el término "epítipo" se refiere a cualquier determinante antigénico en un antígeno con el que se une el parátipo de un anticuerpo.

Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de carbohidratos y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Una región ejemplar de QSOX1 que puede ser diana de inhibición eficaz de la misma es el dominio de Trx amino terminal (véase Ejemplo 2 en la sección de Ejemplos a continuación). Específicamente, el disulfuro redox activo en el dominio de Trxl de QSOX1 puede ser diana de inhibición eficaz.

Según otra realización, el agente polipeptídico puede dirigirse hacia las coordenadas de aminoácidos 34 a 266 de QSOX1 (SEQ ID NO: 3 y 4).

Como se describe en detalle en la sección de Ejemplos a continuación (véase Ejemplo 2, posteriormente en la presente memoria), los presentes inventores han generado un anticuerpo monoclonal (mAb) y un anticuerpo monocatenario (scAb) que se dirigen específicamente a e inhiben QSOX1. Asimismo, los presentes inventores generaron un plásmido, que comprendía la secuencia de ácido nucleico de QSOX133-546 humana (SEQ ID NO: 5) que codifica el polipéptido de QSOX1 recombinante (SEQ ID NO: 6) usado para inducir anticuerpos.

Por lo tanto, se proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de QSOX1, siendo el péptido de menos de 500 aminoácidos de longitud.

Según otra realización, el polipéptido de la presente divulgación puede comprender entre 50-500 aminoácidos, entre 100-500 aminoácidos, entre 200-500 aminoácidos, entre 300-500 aminoácidos, entre 400-500 aminoácidos, entre 50-100 aminoácidos, entre 100-200 aminoácidos, entre 100-300 aminoácidos, entre 100-400 aminoácidos, entre 200-300 aminoácidos o entre 200-400 aminoácidos. Preferentemente, el polipéptido comprende una función de QSOX1 en la mediación del ensamblaje de membrana basal apropiado. La expresión ensamblaje de membrana basal apropiado se define como el que soporta migración celular.

Según una realización específica de la divulgación, se proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de QSOX1 como se expone en la SEQ ID NO: 6.

El término "anticuerpo" como se usa en la presente divulgación incluye moléculas intactas así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv que son capaces de unirse a macrófagos. Estos fragmentos de anticuerpos funcionales se definen de la siguiente manera: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede producirse por digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una parte de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse tratando anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenido unido por dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento obtenido por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada como dos cadenas; y (5) Anticuerpo monocatenario ("SCA", una molécula modificada por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente.

Se conocen bien en la técnica métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales así como fragmentos de los mismos (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988, e). Los péptidos de QSOX1 usados para inmunización pueden comprender entre 50-100 aminoácidos, entre 50-150 aminoácidos, entre 50-200 aminoácidos, entre 50-232 aminoácidos, entre 100-200 aminoácidos o entre 150-232 aminoácidos.

Los fragmentos de anticuerpo según algunas realizaciones de la divulgación pueden prepararse mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en *E. coli* o células de mamífero (por ejemplo cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento. Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de anticuerpos mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S indicado como F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3,5S. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Goldenberg, patentes de los Estados Unidos n.º 4.036.945 y 4.331.647 y referencias contenidas en las mismas. Véase también Porter, R. R. [Biochem. J. 73: 119-126 (1959)]. También pueden usarse otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar *et al.* [Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659-62 (1972)]. Como alternativa, las cadenas variables pueden unirse mediante un enlace disulfuro intermolecular o reticularse mediante productos químicos tales como glutaraldehído. Preferentemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas VH y VL conectadas mediante un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno monocatenarias (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que se introduce posteriormente en una célula hospedadora tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V (por ejemplo [Gly4Ser]₃ como se enseña en el Ejemplo 2 posteriormente en el presente documento). Se describen métodos para producir sFv, por ejemplo, en [Whitlow y Filpula, *Methods* 2: 97-105 (1991); Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988); Pack *et al.*, *Bio/Technology* 11:1271-77 (1993); y patente de los Estados Unidos N.º 4.946.778.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de complementariedad (CDR). Pueden obtenerse péptido de CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") construyendo genes que codifiquen la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable de ARN de células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry [Methods, 2: 106-10 (1991)].

Son formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) moléculas quiméricas de

inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab').sub.2 u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan restos de marco conservado de Fv de la inmunoglobulina humana por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o marco conservado importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992)].

Se conocen bien en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos importados, que se toman típicamente de un dominio variable importado. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo con CDR o secuencias de CDR de ratón las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567), en donde se ha sustituido sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

También pueden producirse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en este campo, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner *et al.*, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. De manera similar, pueden prepararse anticuerpos humanos mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa producción de anticuerpos humanos, que se asemeja estrechamente a la vista en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo reordenación génica, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65-93 (1995).

Según una realización, los anticuerpos se producen esencialmente como se describe posteriormente en el presente documento. Específicamente, los ratones se inmunizan primero con una emulsión de QSOX1 humana recombinantes y adyuvante completo de Freund (por ejemplo obtenido de Difco Laboratories). Por ejemplo, los ratones pueden inmunizarse cuatro veces a intervalos de tres semanas. A continuación, se fusionan células del bazo de ratones seleccionados con células de mieloma (por ejemplo células de mieloma NSO) usando polietilenglicol. Después se seleccionan células de hibridoma mediante un medio de selección (por ejemplo medio HAT) y se exploran sobrenadantes de las células con respecto a unión específica con QSOX1 humana e inhibición de la misma. Después pueden producirse anticuerpos a gran escala usando, por ejemplo, un biorreactor miniPERM (Sarstedt) en medio sin suero (DCCM).

Por lo tanto las enseñanzas de la presente divulgación proporcionan un anticuerpo aislado que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno que se une con QSOX1 e inhibe una actividad QSOX1 en la mediación del ensamblaje de membrana basal que soporta la migración celular.

Según una realización de la divulgación, la actividad se ensaya mediante al menos uno de un ensayo de tinción de inmunofluorescencia (IF) de la matriz extracelular o ensayo de transferencia de Western para laminina soluble (es decir la que no se incorpora en la membrana basal, como se describe adicionalmente en la sección de Ejemplos a continuación).

Según una realización específica, el anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo monoclonal ejemplar que puede usarse de acuerdo con las presentes enseñanzas es MAb492.1 y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) SEQ ID NO: 29-34. En consecuencia, las CDR 1-3 (SEQ ID NO: 29-31, respectivamente) se localizan en la cadena ligera del anticuerpo y las CDR 1-3 (SEQ ID NO: 32-34, respectivamente) se localizan en la cadena pesada del anticuerpo.

Según otra realización, el anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo monocatenario. Un anticuerpo monocatenario ejemplar que puede usarse de acuerdo con las presentes enseñanzas es scFV492.1 y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) SEQ ID NO: 29-34.

5 Según otra realización, un anticuerpo aislado de la presente divulgación comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 7 y 8.

Según otra realización, un anticuerpo aislado de la presente divulgación comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 27 y 28.

Según una realización, el anticuerpo de la presente divulgación puede unirse con una enzima QSOX1 de ratón.

10 Por lo tanto, como se describe en más detalle en la sección de Ejemplos a continuación, QSOX1 humana y murina son comparables y comprenden una identidad de secuencia de al menos 70 % (por ejemplo 79 %). El alineamiento de secuencias de QSOX1 humana y de ratón reveló, por ejemplo, que Pro 116 de QSOX1 humana se reemplaza con alanina en QSOX1 murina (véase Figura 25). Otra región que muestra diferencias de secuencias es Val₁₃₅-Val₁₃₈ de QSOX1 humana, correspondiente a Thr₁₃₈-Gly₁₄₁ en QSOX1 de ratón (véase Figura 25). Estos descubrimientos proporcionaron el contexto para generar anticuerpos capaces de unirse con QSOX1 de ratón.

15 Según una realización, el anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo monoclonal anti-QSOX1 de ratón.

Según otra realización, el anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo monocatenario anti-QSOX1 de ratón.

Se describen posibles mutaciones de MAb492.1 usadas para generar un anticuerpo que se dirige a QSOX1 de ratón en la Tabla 8 posteriormente en la presente memoria.

20 Otro agente capaz de regular negativamente QSOX1 es una molécula que se une con y/o escinde QSOX1. Dichas moléculas pueden ser antagonistas de QSOX1, moléculas negativas dominantes de QSOX1 (por ejemplo parte del péptido o una mutación del mismo que compite con efectores), inhibidores naturales de QSOX1 o péptidos inhibidores de QSOX1.

25 Se apreciará que un análogo no funcional de al menos una parte catalítica o de unión de QSOX1 también puede usarse como un agente que regula negativamente QSOX1.

Otro agente que puede usarse junto con algunas realizaciones de la divulgación para regular negativamente QSOX1 es una molécula que previene la activación o unión a sustrato de QSOX1.

30 Como se ha mencionado, otro agente capaz de regular negativamente la expresión de QSOX1 es un agente de ácido nucleico adecuado para silenciar la expresión de una manera dirigida. Se enumeran ejemplos de dichos agentes posteriormente.

35 Por ejemplo, puede conseguirse regulación negativa de QSOX1 mediante silenciamiento de ARN. Como se emplea en la presente memoria, la expresión "silenciamiento de ARN" se refiere a un grupo de mecanismos reguladores [por ejemplo interferencia de ARN (ARNi), silenciamiento génico transcripcional (TGS), silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), represión, cosupresión y represión traduccional] mediados por moléculas de ARN que dan como resultado la inhibición o el "silenciamiento" de la expresión de un gen codificante de proteínas correspondiente. Se ha observado silenciamiento de ARN en muchos tipos de organismos, incluyendo plantas, animales y hongos.

40 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "agente de silenciamiento de ARN" se refiere a un ARN que es capaz de inhibir específicamente o "silenciar" la expresión de un gen diana. En determinadas realizaciones, el agente de silenciamiento de ARN es capaz de prevenir el procesamiento completo (por ejemplo, la traducción y/o expresión completa) de una molécula de ARNm mediante un mecanismo de silenciamiento postranscripcional. Los agentes de silenciamiento de ARN incluyen moléculas de ARN no codificantes, por ejemplo dobles cadenas de ARN que comprenden cadenas emparejadas, así como ARN precursores a partir de los que pueden generarse dichos ARN no codificantes pequeños. Los agentes de silenciamiento de ARN ejemplares incluyen ARNbc tales como ARNip, miARN y ARNhp. En una realización, el agente de silenciamiento de ARN es capaz de inducir interferencia de ARN. En otra realización, el agente de silenciamiento de ARN es capaz de mediar en la represión traduccional.

50 Según una realización de la divulgación, el agente de silenciamiento de ARN es específico del ARN diana (por ejemplo, QSOX1) y no inhibe de forma cruzada ni silencia un gen o una variante de corte y empalme que muestre 99 % o menos homología global con el gen diana, por ejemplo, menos de 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 % de homología global con el gen diana.

La interferencia de ARN se refiere al proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia en animales mediado por ARN de interferencia cortos (ARNip). El proceso correspondiente en plantas se denomina habitualmente silenciamiento génico postranscripcional o silenciamiento de ARN y también se denomina represión en hongos. Se cree que el proceso de silenciamiento génico postranscripcional es un mecanismo de defensa celular

conservado evolutivamente usado para prevenir la expresión de genes ajenos y está compartido habitualmente por diversa flora y filos. Dicha protección de la expresión de genes ajenos puede haber evolucionado en respuesta a la producción de ARN bicatenarios (ARNbc) procedentes de infección vírica o de la integración aleatoria de elementos transposónicos en el genoma hospedador mediante una respuesta celular que destruye específicamente ARN monocatenario homólogo o ARN genómico vírico.

La presencia de ARNbc largo en células estimula la actividad de una enzima ribonucleasa III denominada Dicer. Dicer está implicada en el procesamiento del ARNbc en trozos pequeños de ARNbc conocidos como ARN de interferencia cortos (ARNip). Los ARN de interferencia cortos procedentes de actividad Dicer son típicamente de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud y comprenden dobles cadenas de aproximadamente 19 pares de bases. La respuesta de ARNi también presenta un complejo de endonucleasa, denominado habitualmente complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que media en la escisión de ARN monocatenario que tiene complementariedad de secuencia con la cadena antisentido de la doble cadena de ARNip. La escisión del ARN diana tiene lugar en el medio de la región complementaria para la cadena antisentido de la doble cadena de ARNip.

En consecuencia, algunas realizaciones de la divulgación contemplan el uso de ARNbc para regular negativamente la expresión de proteínas a partir de ARNm.

Según una realización, el ARNbc es de más de 30 pb. El uso de ARNbc largos (es decir ARNbc de más de 30 pb) ha sido muy limitado debido a la creencia de que estas regiones más largas de ARN bicatenario darán como resultado la inducción de la respuesta de interferón y PKR. Sin embargo, el uso de ARNbc largos puede proporcionar numerosas ventajas porque la célula puede seleccionar la secuencia de silenciamiento óptima aliviando la necesidad de ensayar numerosos ARNip; los ARNbc largos permitirán que las bibliotecas de silenciamiento tengan menos complejidad de lo que sería necesario para ARNip; y, lo que es quizás más importante, los ARNbc largos podrían prevenir mutaciones de escape vírico cuando se usen como productos terapéuticos.

Diversos estudios demuestran que los ARNbc largos pueden usarse para silenciar la expresión génica sin inducir la respuesta de tensión o provocar efectos fuera de la diana significativos - véase, por ejemplo, [Strat *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 2006, Vol. 34, N.º 13 3803-3810; Bhargava A *et al.* *Brain Res. Protoc.* 2004;13:115-125; Diallo M., *et al.*, *Oligonucleotides*. 2003;13:381-392; Paddison P.J., *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002;99:1443-1448; Tran N., *et al.*, *FEBS Lett.* 2004;573:127-134].

En particular, la divulgación según algunas realizaciones de la misma contempla la introducción de ARNbc largo (transcritos de más de 30 bases) para silenciamiento génico en células donde la ruta de interferón no está activada (por ejemplo células embrionarias y oocitos), véase, por ejemplo, Billy *et al.*, *PNAS* 2001, Vol 98, páginas 14428-14433, y Diallo *et al.*, *Oligonucleotides*, 1 de octubre de 2003, 13(5): 381-392. doi:10.1089/154545703322617069.

La divulgación según algunas realizaciones de la misma también contempla la introducción de ARNbc largo diseñado específicamente para no inducir las rutas de interferón y PKR para regular negativamente la expresión génica. Por ejemplo, Shinagwa e Ishii [*Genes & Dev.* 17 (11): 1340-1345, 2003] han desarrollado un vector, denominado pDECAP, para expresar ARN bicatenario largo a partir de un promotor de ARN polimerasa II (Pol II). Debido a que los transcritos de pDECAP carecen tanto de la estructura de recubrimiento 5' como de la cola de poli(A) 3' que facilitan la exportación de ARNbc al citoplasma, el ARNbc largo de pDECAP no induce la respuesta de interferón.

Otro método para evitar las rutas de interferón y PKR en sistemas mamíferos es mediante la introducción de ARN inhibidores pequeños (ARNip) mediante la transfección o la expresión endógena.

El término "ARNip" se refiere a dobles cadenas de ARN inhibidor pequeño (en general de entre 18-30 pares de bases) que inducen la ruta de interferencia de ARN (ARNi). Típicamente, los ARNip se sintetizan químicamente como 21meros con una región de doble cadena de 19 pb central y salientes 3' de 2 bases simétricos en los extremos, aunque se ha descrito recientemente que las dobles cadenas de ARN sintetizadas químicamente de 25-30 bases de longitud pueden tener un aumento de hasta 100 veces de la potencia en comparación con 21meros en la misma localización. Se ha teorizado que la potencia aumentada observada obtenida usando ARN más largos para desencadenar ARNi resulta del aporte a Dicer de un sustrato (27mero) en lugar de un producto (21mero) y que esto mejora la tasa o eficacia de entrada de la doble cadena de ARNip en RISC.

Se ha descubierto que la posición del saliente 3' influye en la potencia de un ARNip y dobles cadenas asimétricas que tienen un saliente 3' en la cadena antisentido son en general más potentes que las que tienen el saliente 3' en la cadena con sentido (Rose *et al.*, 2005). Esto puede atribuirse a una carga de cadena asimétrica en RISC, ya que se observan los patrones de eficacia opuestos cuando la diana es el transcrito antisentido.

Las cadenas de un ARN de interferencia bicatenario (por ejemplo, un ARNip) pueden conectarse para formar una estructura en horquilla o de tallo-bucle (por ejemplo, un ARNhp). Por lo tanto, como se ha mencionado el agente de silenciamiento de ARN de algunas realizaciones de la divulgación también puede ser un ARN en horquilla corto (ARNhp).

El término "ARNhp", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un agente de ARN que tiene una estructura de tallo-bucle, que comprende una primera y una segunda región de secuencia complementaria, siendo el grado de complementariedad y orientación de las regiones suficiente para que se produzca formación de pares de bases entre las regiones, uniéndose las primera y segunda regiones por una región de bucle, resultando el bucle de una falta de formación de pares de bases entre nucleótidos (o análogos de nucleótidos) en la región de bucle. El número de nucleótidos en el bucle es un número entre e incluyendo 3 a 23, o 5 a 15, o 7 a 13, o 4 a 9, o 9 a 11. Algunos de los nucleótidos en el bucle pueden estar implicados en interacciones de pares de bases con otros nucleótidos en el bucle. Los ejemplos de secuencias oligonucleotídicas que pueden usarse para formar el bucle incluyen 5'-JUCAAGAGA-3' (Brummelkamp, T. R. *et al.* (2002) Science 296: 550) y 5'-UUUGUGUAG-3' (Castanotto, D. *et al.* (2002) RNA 8:1454). Un experto en la materia reconocerá que el oligonucleótido monocatenario resultante forma una estructura de tallo-bucle o en horquilla que comprende una región bicatenaria capaz de interactuar con la maquinaria de ARNi.

Puede efectuarse síntesis de agentes de silenciamiento de ARN adecuados para su uso con algunas realizaciones de la divulgación de la siguiente manera. En primer lugar, la secuencia de ARNm de QSOX1 se explora cadena abajo del codón de inicio AUG con respecto a secuencias dinucleotídicas AA. La aparición de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes 3' se registra como sitios diana de ARNi potenciales. Preferentemente, los sitios diana de ARNi se seleccionan a partir del marco abierto de lectura, ya que las regiones no traducidas (UTR) son más ricas en sitios de unión a proteína reguladores. Las proteínas de unión a UTR y/o complejos de inicio de la traducción pueden interferir en la unión del complejo de endonucleasa y ARNi [Tuschl ChemBiochem. 2:239-245]. Se apreciará, no obstante, que los ARNi dirigidos a regiones no traducidas también pueden ser eficaces, como se ha demostrado para GAPDH en donde ARNi dirigido a la 5' UTR medió en una reducción de aproximadamente 90 % del ARNm de GAPDH celular y anuló completamente el nivel de proteínas (www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html).

En segundo lugar, los sitios diana potenciales se comparan con una base de datos genómica (por ejemplo, humana, de ratón, de rata, etc.) usando cualquier software de alineamiento de secuencias, tal como el software BLAST disponible del servidor de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Se filtran los sitios diana potenciales que muestren homología significativa con otras secuencias codificantes.

Se seleccionan secuencias diana cualificantes como molde para síntesis de ARNi. Son secuencias preferidas las que incluyen bajo contenido de G/C ya que se ha demostrado que estas son más eficaces en la mediación del silenciamiento génico en comparación con las que tienen contenido de G/C mayor de 55 %. Se seleccionan preferentemente varios sitios diana a lo largo de la longitud del gen diana para evaluación. Para mejor evaluación de los ARNi seleccionados, un control negativo se usa preferentemente combinado. Los ARNi de control negativo incluyen la misma composición de nucleótidos que los ARNi pero carecen de homología significativa con el genoma. Por lo tanto, se usa preferentemente una secuencia de nucleótidos aleatoria del ARNi, siempre que no presente ninguna homología significativa con ningún otro gen.

Por ejemplo, un ARNi de QSOX1 adecuado puede ser el ARNi obtenido comercialmente de Dharmacon, Estados Unidos.

Se apreciará que no es necesario que el agente de silenciamiento de ARN de algunas realizaciones de la divulgación esté limitado a las moléculas que contienen solamente ARN, sino que abarca adicionalmente nucleótidos químicamente modificados y no nucleótidos.

Los ARNm para dirigir usando agentes de silenciamiento de ARN incluyen, pero sin limitación, aquellos cuya expresión está correlacionada con un rasgo fenotípico indeseado. Son ARNm ejemplares que pueden dirigirse los que codifican proteínas truncadas, es decir, comprenden supresiones. En consecuencia el agente de silenciamiento de ARN de algunas realizaciones de la divulgación puede dirigirse a una región de unión en uno de los lados de la supresión. La introducción de dichos agentes de silenciamiento de ARN en una célula provocaría una regulación negativa de la proteína mutada dejando al mismo tiempo la proteína no mutada intacta.

Según otra realización el agente de silenciamiento de ARN puede ser un miARN.

El término "microARN", "miRNA" y "miR" son sinónimos y se refieren a una colección de moléculas de ARN monocatenario no codificante de aproximadamente 19-28 nucleótidos de longitud, que regulan la expresión génica. Se encuentran miARN en una amplia serie de organismos (virus.fwdarw.humanos) y se ha mostrado que desempeñan un papel en el desarrollo, la homeostasis y la etiología de la enfermedad.

Debería observarse que puede haber variabilidad en los extremos 5' y 3' de cualquier par de miARN y miARN*. Esta variabilidad puede deberse a la variabilidad en el procesamiento enzimático de Drosha y Dicer con respecto al sitio de escisión. La variabilidad en los extremos 5' y 3' de miARN y miARN* también puede deberse a desapareamientos en las estructuras de tallo del pri-miARN y pre-miARN. Los desapareamientos de las cadenas de tallo pueden conducir a una población de estructuras en horquilla diferentes. La variabilidad en las estructuras de tallo también puede conducir a variabilidad en los productos de escisión por Drosha y Dicer.

Otro agente capaz de regular negativamente una QSOX1 es una molécula de ADNzima capaz de escindir específicamente un transcrito de ARNm o una secuencia de ADN de la QSOX1. Las ADNzimas son polinucleótidos

monocatenarios que son capaces de escindir secuencias diana tanto mono como bicatenarias (Breaker, R.R. y Joyce, G. Chemistry and Biology 1995;2:655; Santoro, S.W. y Joyce, G.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997;94:4262) Se ha propuesto un modelo general (el modelo "10-23") para la ADNzima. Las ADNzimas "10-23" tienen un dominio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos, flanqueado por dos dominios de reconocimiento de sustrato de siete a nueve desoxirribonucleótidos cada uno. Este tipo de ADNzima puede escindir eficazmente su ARN sustrato en puntos de unión de purina:pirimidina (Santoro, S.W. y Joyce, G.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 199; para una revisión de ADNzimas véase Khachigian, LM [Curr Opin Mol Ther 4:119-21 (2002)]).

Se han desvelado ejemplos de construcción y amplificación de ADNzimas sintéticas, modificadas técnicamente, que reconocen sitios de escisión diana mono y bicatenarios en la patente de los Estados Unidos n.º 6.326.174 de Joyce *et al.* Se ha observado recientemente que ADNzimas de diseño similar dirigidas contra el receptor de uroquinasa humano inhiben la expresión del receptor de uroquinasa, e inhiben con éxito la metástasis de células de cáncer de colon *in vivo* (Itoh *et al.*, 20002, Abstract 409, Ann Meeting Am Soc Gen Ther www.asgt.org). En otra aplicación, ADNzimas complementarias de oncogenes bcr-ab1 tuvieron éxito en la inhibición de la expresión de oncogenes en células de leucemia y reducción de tasas de recaída en trasplante de médula ósea autólogo en casos de LMC y LLA.

También puede efectuarse regulación negativa de una QSOX1 usando un polinucleótido antisentido capaz de hibridar específicamente con un transcrito de ARNm que codifica la QSOX1.

El diseño de moléculas antisentido que puede usarse para regular negativamente una QSOX1 debe efectuarse teniendo en cuenta dos aspectos importantes para el enfoque antisentido. El primer aspecto es el suministro del oligonucleótido al citoplasma de las células apropiadas, mientras que el segundo aspecto es el diseño de un oligonucleótido que se une específicamente con el ARNm designado en células de una manera que inhiba la traducción del mismo.

La técnica anterior enseña varias estrategias de suministro que pueden usarse para suministrar eficazmente oligonucleótidos en una amplia diversidad de tipos celulares [véase, por ejemplo, Luft J Mol Med 76: 75-6 (1998); Kronenwett *et al.* Blood 91: 852-62 (1998); Rajur *et al.* Bioconjug Chem 8: 935-40 (1997); Lavigne *et al.* Biochem Biophys Res Commun 237: 566-71 (1997) y Aoki *et al.* (1997) Biochem Biophys Res Commun 231: 540-5 (1997)].

Además, también están disponibles algoritmos para identificar las secuencias con la mayor afinidad de unión predicha por su ARNm diana basándose en un ciclo termodinámico que represente la energética de alteraciones estructurales tanto en el ARNm diana como en el oligonucleótido [véase, por ejemplo, Walton *et al.* Biotechnol Bioeng 65: 1-9 (1999)].

Dichos algoritmos se han usado con éxito para implementar un enfoque antisentido en células. Por ejemplo, el algoritmo desarrollado por Walton *et al.* permitió a los científicos diseñar con éxito oligonucleótidos antisentido para transcritos de beta globina de conejo (RBG) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) de ratón. El mismo grupo de investigación ha informado más recientemente de que la actividad antisentido de oligonucleótidos seleccionados racionalmente contra tres ARNm diana modelo (lactato deshidrogenasa A y B humana y gp130 de rata) en cultivo celular como se evaluó mediante una técnica de PCR cinética demostró ser eficaz en casi todos los casos, incluyendo ensayos contra tres dianas diferentes en dos tipos celulares con químicas de oligonucleótidos fosfodiéster y fosforotioato.

Además, también se han publicado varios enfoques para diseñar y predecir la eficacia de oligonucleótidos específicos usando un sistema *in vitro* (Matveeva *et al.*, Nature Biotechnology 16: 1374 - 1375 (1998)).

Otro agente capaz de regular negativamente una QSOX1 es una molécula de ribozima capaz de escindir específicamente un transcrito de ARNm que codifica una QSOX1. Se están usando cada vez más ribozimas para la inhibición específica de secuencia de la expresión génica mediante la escisión de ARNm que codifican proteínas de interés [Welch *et al.*, Curr Opin Biotechnol. 9:486-96 (1998)]. La posibilidad de diseñar ribozimas para escindir cualquier ARN diana específico las ha hecho herramientas valiosas en aplicaciones tanto de investigación básica como terapéuticas. En el área terapéutica, las ribozimas se han aprovechado para dirigirse a ARN víricos diana en enfermedades infecciosas, oncogenes dominantes en cánceres y mutaciones somáticas específicas en trastornos genéticos [Welch *et al.*, Clin Diagn Virol. 10:163-71 (1998)]. Más notablemente, varios protocolos de terapia génica de ribozimas para enfermos de VIH están ya en ensayos de fase 1. Más recientemente, se han usado ribozimas para investigación de animales transgénicos, validación de dianas génicas y dilucidación de rutas. Varias ribozimas están en diversos estadios de ensayos clínicos. La ANGIOZIMA fue la primera ribozima sintetizada químicamente que se estudió en ensayos clínicos humanos. La ANGIOZIMA inhibe específicamente la formación del VEGF-r (receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular), un componente clave en la ruta de la angiogénesis. Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., así como otras marcas han demostrado la importancia de los productos terapéuticos antiangiogénesis en modelos animales. Se descubrió que la HEPTAZIMA, una ribozima diseñada para destruir de forma selectiva ARN del virus de la hepatitis C (VHC), era eficaz en la reducción del ARN vírico de la Hepatitis C en ensayos de cultivo celular (Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated - página de inicio WEB).

En algunas realizaciones, el agente de silenciamiento de ARN proporcionado en el presente documento puede asociarse funcionalmente con un péptido de penetración celular. Como se emplea en la presente memoria, un

"péptido de penetración celular" es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos corta (aproximadamente 12-30 restos) o motivo funcional que confiere las propiedades de translocación independientes de energía (es decir, no endocíticas) asociadas con el transporte del complejo permeable a membrana a través del plasma y/o membranas nucleares de una célula. El péptido de penetración celular usado en el complejo permeable a membrana de algunas realizaciones de la divulgación preferentemente comprende al menos un resto de cisteína no funcional, que está libre o derivatizado para formar un enlace disulfuro con un ácido ribonucleico bicatenario que se ha modificado para dicho enlace. Se enumeran motivos de aminoácidos representativos que confieren dichas propiedades en la patente de los Estados Unidos n.º 6.348.185. Los péptidos de penetración celular de algunas realizaciones de la divulgación incluyen preferentemente, pero sin limitación, penetratina, transportano, pls1, TAT(48-60), pVEC, MTS y MAP.

Los métodos de la presente divulgación (por ejemplo, inhibir la migración celular) pueden efectuarse *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

La capacidad para modular la migración celular puede usarse como una modalidad terapéutica novedosa.

Por lo tanto, según otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para tratar una enfermedad o afección asociada a laminina en un sujeto que lo necesite comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que inhibe la actividad o expresión de QSOX1.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "enfermedad o afección asociada a laminina" se refiere a una enfermedad o afección en la que la función de laminina está asociada con la aparición o progresión de una enfermedad.

El término "tratar" se refiere a inhibir o detener el desarrollo de una enfermedad, un trastorno o una afección y/o provocar la reducción, remisión o regresión de una enfermedad, un trastorno o una afección evitar que una enfermedad, un trastorno o una afección médica se produzca en un sujeto que pueda estar en riesgo de padecer la enfermedad, el trastorno o la afección, pero al que todavía no se ha diagnosticado que tenga la enfermedad, el trastorno o la afección. Los expertos en la materia entenderán que pueden usarse diversas metodologías y ensayos para evaluar el desarrollo de una enfermedad, un trastorno o una afección, y, de forma similar, pueden usarse diversas metodologías y ensayos para evaluar la reducción, remisión o regresión de una enfermedad, un trastorno o una afección.

Como se emplea en la presente memoria, el término "Sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano, incluyendo seres humanos tanto jóvenes como viejos de ambos sexos que padecen o están predispuestos a un trastorno o una afección relacionada con la necrosis.

Según una realización, la enfermedad o afección asociada con laminina es un tumor.

Los ejemplos de tumores incluyen, pero sin limitación, carcinoma, blastoma y sarcoma. Son ejemplos particulares de enfermedades cancerosas, pero sin limitación: enfermedades mieloproliferativas, tales como tumores sólidos, meningioma benigno, tumores mixtos de las glándulas salivales, adenomas colónicos; adenocarcinomas, tales como cáncer de pulmón no microcítico, de riñón, de útero, de próstata, de vejiga, de ovario, de colon, sarcomas, liposarcoma, mixoide, sarcoma sinovial, rabdomiosarcoma (alveolar), condrosarcoma mixoide extraesquelético, tumor de Ewing; otros incluyen disgerminoma testicular y ovárico, retinoblastoma, tumor de Wilms, neuroblastoma, melanoma maligno, mesotelioma, de mama, cutáneo, de próstata y ovárico.

Según una realización, el tumor es un tumor sólido metastatizante.

Según una realización, el tumor es un adenocarcinoma.

Según otra realización, los tumores que pueden tratarse de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero sin limitación, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de uraco, cáncer vaginal, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer pancreático, cáncer de garganta, cáncer de estómago y leucemia mieloide.

Según una realización, la enfermedad o afección asociada con laminina está asociada con fibrosis.

El término "fibrosis" se refiere a una formación o una presencia de tejido conectivo en exceso en un órgano o tejido. Puede aparecer como una respuesta de reparación o reemplazo a un estímulo tal como lesión o inflamación tisular.

Los ejemplos de trastornos que implican fibrosis incluyen, pero sin limitación, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis pancreática, esclerodermia, enfermedades de tejido conectivo, deformidad cicatricial, fibrosis cutánea, fibrosis cardíaca, trasplante de órganos, estenosis vascular, reestenosis, fibrosis arterial, artrofibrosis, fibrosis de mama, fibrosis muscular, fibrosis retroperitoneal, fibrosis tiroidea, fibrosis de ganglio linfático, fibrosis de vejiga, fibrosis pleural y EPOC.

Según una realización, la enfermedad o afección asociada con laminina es una enfermedad bacteriana, una enfermedad vírica o una enfermedad parasitaria.

Una enfermedad parasitaria ejemplar que puede tratarse por las enseñanzas de la presente divulgación incluye la tripanosomiasis africana.

Según las presentes enseñanzas, para tratar la enfermedad o afección asociada con laminina, se administra al sujeto un agente que regula negativamente la actividad o expresión de QSOX1, como se ha detallado adicionalmente anteriormente en la presente memoria.

Cada uno de los agentes reguladores negativos descritos anteriormente en el presente documento puede administrarse al individuo por sí solo o como parte de una composición farmacéutica que también incluye un vehículo fisiológicamente aceptable. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración del principio activo a un organismo.

Como se emplea en la presente memoria una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En la presente memoria la expresión "principio activo" se refiere al agente regulador de QSOX1 responsable del efecto biológico.

En lo sucesivo en la presente memoria, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que pueden usarse indistintamente se refieren a un vehículo o un diluyente que no provoca irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. Se incluye un adyuvante en estas expresiones.

En la presente memoria el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Pueden encontrarse técnicas para formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Las vías adecuadas de administración pueden, por ejemplo, incluir suministro oral, rectal, transmucoso, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramuscular, subcutánea e intramedular así como inyecciones intratecal, intraventricular directa, intracardiaca, por ejemplo, en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular.

Los enfoques convencionales para suministro de fármacos al sistema nervioso central (SNC) incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo, inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (por ejemplo, producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene una afinidad por una molécula de superficie celular endotelial en combinación con un agente que en sí mismo sea incapaz de cruzar la BHE) en un intento de aprovechar una de las rutas de transporte endógenas de la BHE; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad en lípidos de un agente (por ejemplo, conjugación de agentes hidrosolubles con vehículos lipídicos o de colesterol); y la alteración transitoria de la integridad de la BHE por alteración hiperosmótica (resultante de la infusión de una solución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina).

Como alternativa, se puede administrar la composición farmacéutica de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica directamente en una región tisular de un paciente.

Las composiciones farmacéuticas de algunas realizaciones de la divulgación pueden fabricarse mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, composición de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, inmovilización o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación pueden formularse por lo tanto de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que pueden usarse de forma farmacéutica. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Para inyección, los principios activos de la composición farmacéutica pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosa, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera para permear. Dichos penetrantes son bien conocidos en general en la técnica.

Para administración oral, la composición farmacéutica puede formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que la composición farmacéutica se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes,

pastas, suspensiones y similares, para ingesta oral por un paciente. Pueden prepararse preparaciones farmacológicas para uso oral usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir adyuvantes adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Son excipientes adecuados, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinil pirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico.

10 Se proporcionan núcleos de grageas con revestimientos adecuados. Para este fin, pueden usarse soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

15 Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen capsulas de ajuste por presión hechas de gelatina así como cápsulas selladas, blandas, hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los principios activos en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los principios activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizadores. 20 Todas las formulaciones para administración oral deberían estar en dosificaciones adecuadas para la vía elegida de administración.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formulados de una manera convencional.

25 Para administración mediante inhalación nasal, los principios activos para su uso según algunas realizaciones de la divulgación se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden 30 formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un dosificador que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica descrita en la presente memoria puede formularse para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección de embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un 35 conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o de dispersión.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma hidrosoluble. Además, pueden prepararse suspensiones de los principios activos como 40 suspensiones para inyección de base oleosa o acuosa apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumenten la solubilidad de los 45 principios activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, solución a base de agua apirógena, estéril, antes de su uso.

La composición farmacéutica de algunas realizaciones de la divulgación también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio 50 convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de algunas realizaciones de la divulgación incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de principios 55 activos (agente regulador negativo de QSOX1) eficaz para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de un trastorno (por ejemplo enfermedad o afección asociada a laminina) o prolongar la supervivencia del sujeto que se trate.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para cualquier preparación usada en los métodos de la divulgación, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular e *in vitro*.

Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir una concentración o un título deseado. Dicha información puede usarse para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos.

- 5 Los modelos animales para enfermedades asociadas a laminina incluyen, por ejemplo, el modelo animal murino para fibrosis hepática [véase por ejemplo el artículo de revisión de Hiromitsu Hayashi y Takao Sakai¹, Amer Journal Physiol - GI (2011) 300(5): G729-G738] y el modelo animal murino para cáncer de mama metastásico [Anna Fantozzi y Gerhard Christofori, Breast Cancer Research (2006) 8:212].

- 10 La toxicidad y eficacia terapéutica de los principios activos descritos en la presente memoria pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivo celular y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en el ser humano. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación pueden ser elegidas por el médico individual a la vista de la condición del paciente. (Véase, por ejemplo, 15 Fingl, *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", C. 1 p.l).

- La cantidad de dosificación y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar el principio activo en una cantidad suficiente para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración eficaz mínima, CEM). La CEM variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para conseguir la CEM dependerán de características individuales y la vía de administración. Pueden usarse ensayos de 20 detección para determinar las concentraciones en plasma.

Dependiendo de la gravedad y sensibilidad de la afección que se va a tratar, la dosificación puede ser una única administración a una pluralidad de administraciones, durante el ciclo de tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se efectúe la cura se consiga disminución de la patología.

- 25 Se apreciará que los anticuerpos anti-QSOX1 de ratón de algunas realizaciones de la presente divulgación pueden usarse para ensayos preclínicos para determinar la cantidad terapéutica eficaz, la toxicidad y la eficacia de los anticuerpos para el tratamiento.

La cantidad de una composición que se va a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se trate, la gravedad de la afección, la forma de administración, el criterio del médico que la receta, etc.

- 30 Las composiciones de algunas realizaciones de la divulgación pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dosificador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen el principio activo. El envase puede, por ejemplo, comprender papel metálico o de plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dosificador pueden estar acompañados de instrucciones para la administración. El envase o dosificador también puede estar acompañado de una nota asociada con el 35 recipiente en una forma prescrita por una agencia del gobierno que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, reflejando dicha nota la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o administración humana o veterinaria. Dicha nota, por ejemplo, puede ser etiquetado aprobado por la administración de alimentos y fármacos de los Estados Unidos para fármacos con receta o de un prospecto de producto aprobado. También pueden prepararse composiciones que comprenden una preparación de la divulgación formulada en un vehículo farmacéutico compatible, colocado en un recipiente apropiado y marcado para el 40 tratamiento de una afección indicada, como se ha detallado anteriormente de forma adicional.

Se apreciará que ya que el polipéptido aislado (por ejemplo anticuerpo) de la presente divulgación es capaz de unirse específicamente con QSOX1 y ya que los niveles de QSOX1 están elevados en condiciones médicas asociadas con laminina (por ejemplo tumores), dicho polipéptido puede usarse en el diagnóstico de una enfermedad o afección asociada a laminina.

- 45 Por lo tanto, según un aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad o afección asociada a laminina en un sujeto que comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con el polipéptido aislado de la presente divulgación en condiciones adecuadas para la formación de inmunocomplejo entre el polipéptido aislado y proteínas QSOX1; y (b) detectar la formación del inmunocomplejo, en donde una presencia del inmunocomplejo por encima de un umbral predeterminado (es decir, el 50 nivel del mismo en una muestra biológica obtenida de un individuo sano) es indicativa de la enfermedad asociada a laminina.

Como se emplea en la presente memoria la expresión "diagnosticar" se refiere a clasificar una enfermedad o afección asociada a laminina, determinar una gravedad de la enfermedad, supervisar la progresión de la enfermedad, pronosticar un resultado de una enfermedad y/o las posibilidades de recuperación.

- 55 Como se emplea en la presente memoria "muestra biológica" se refiere a una muestra de tejido o líquido aislada de un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, células (por ejemplo células fibroblásticas, células neuronales, células

dendríticas, células epiteliales, etc.), tejidos, órganos, diversos tumores (por ejemplo muestra de biopsia tumoral) y líquidos tales como sangre, suero, plasma, linfa, líquido biliar, orina, saliva, esputo, líquido sinovial, semen, lágrimas, líquido cefalorraquídeo, líquido de lavado broncoalveolar, líquido ascítico, pus, medio acondicionado y también muestras de constituyentes de cultivo celular *in vivo*. Una "muestra biológica del sujeto" también puede comprender opcionalmente una muestra que no se ha retirado físicamente del sujeto.

Según una realización, el método de la presente divulgación permite diagnóstico de un tumor, tal como un tumor sólido metastatizante (por ejemplo cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de mama, etc.).

El diagnóstico de enfermedad asociada a laminina según la presente divulgación se efectúa poniendo en contacto la muestra biológica del sujeto con el polipéptido aislado de la presente divulgación en condiciones adecuadas para la formación de inmunocomplejo entre el polipéptido aislado (por ejemplo anticuerpo) y proteínas QSOX1.

Como se emplea en la presente memoria el término "inmunocomplejo" se refiere a un complejo formado entre un anticuerpo (por ejemplo, el polipéptido aislado de la presente divulgación) y su antígeno específico (proteínas QSOX1).

El inmunocomplejo de la presente divulgación puede formarse a una diversidad de temperaturas, concentración salina y valores de pH que pueden variar dependiendo del polipéptido aislado usado y las proteínas QSOX1 y los expertos en la materia son capaces de ajustar las condiciones adecuadas para la formación de cada inmunocomplejo.

Según el método de este aspecto de la presente divulgación, la detección de formación de inmunocomplejo es indicativa de un diagnóstico de la enfermedad o afección asociada a laminina. Pueden usarse diversos métodos para detectar el inmunocomplejo de la presente divulgación y los expertos en la materia son capaces de determinar qué método es adecuado para cada inmunocomplejo y/o el tipo de muestra biológica usada para el diagnóstico.

Por ejemplo, el inmunocomplejo puede detectarse mediante inmunohistoquímica convencional o inmunofluorescencia, FACS, ELISA, transferencia de Western y análisis de RIA, o mediante un enfoque basado en peso molecular.

Se apreciará que el polipéptido aislado (por ejemplo anticuerpo) de algunas realizaciones de la presente divulgación puede unirse con un resto detectable para permitir la detección del inmunocomplejo.

Diversos tipos de restos detectables o indicadores pueden conjugarse con el anticuerpo de la divulgación. Estos incluyen, pero sin limitación, un isótopo radiactivo (tal como yodo^[125]), un producto químico fosforescente, un producto químico quimioluminiscente, un producto químico fluorescente (fluoróforo), una enzima, un polipéptido fluorescente, un marcador de afinidad y moléculas (agentes de contraste) detectables mediante tomografía de emisión de positrones (TEP) o captura de imágenes por resonancia magnética (IRM).

Los ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen, pero sin limitación, ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), Cy-cromo, rodamina, proteína verde fluorescente (GFP), proteína azul fluorescente (BFP), Texas red, PE-Cy5 y similares. Para orientación adicional con respecto a selección de fluoróforos, métodos de enlace de fluoróforos con diversos tipos de moléculas, véase Richard P. Haugland, "Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1992-1994", 5ª ed., Molecular Probes, Inc. (1994); patente de los Estados Unidos n.º 6.037.137 de Oncoimmunin Inc.; Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press New York, N.Y. (1995); Kay M. *et al.*, 1995. *Biochemistry* 34:293; Stubbs *et al.*, 1996. *Biochemistry* 35:937; Gakamsky D. *et al.*, "Evaluating Receptor Stoichiometry by Fluorescence Resonance Energy Transfer," en "Receptors: A Practical Approach," 2ª ed., Stanford C. y Horton R. (eds.), Oxford University Press, Reino Unido. (2001); patente de los Estados Unidos n.º 6.350.466 de Targesome, Inc.]. Los métodos de detección de fluorescencia que pueden usarse para detectar el anticuerpo cuando se conjuga con un resto detectable fluorescente incluyen, por ejemplo, citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), microscopía confocal de inmunofluorescencia, hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) y transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (TERF).

Pueden unirse numerosos tipos de enzimas con el anticuerpo de la divulgación [por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HPR), beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina (AP)] y puede realizarse detección de anticuerpos conjugados con enzima usando ELISA (por ejemplo, en solución), ensayo inmunohistoquímico ligado a enzimas (por ejemplo, en un tejido fijado), ensayo de quimioluminiscencia ligado a enzimas (por ejemplo, en una mezcla de proteínas separadas electroforéticamente) u otros métodos conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, Khatkhatay M. y Desai M., 1999. *J Immunoassay* 20:151-83; Wisdom GB., 1994. *Methods Mol Biol.* 32:433-40; Ishikawa E. *et al.*, 1983. *J Immunoassay* 4:209-327; Oellerich M., 1980. *J Clin Chem Clin Biochem.* 18:197-208; Schuurs AH. y van Weemen BK., 1980. *J Immunoassay* 1:229-49).

El marcador de afinidad (o un miembro de un par de unión) puede ser un antígeno identificable por un anticuerpo correspondiente [por ejemplo, digoxigenina (DIG) que se identifica mediante un anticuerpo anti DIG] o una molécula que tiene una alta afinidad hacia el marcador [por ejemplo, estreptavidina y biotina]. El anticuerpo o la molécula que se une con el marcador de afinidad puede marcarse con fluorescencia o conjugarse con enzima como se ha descrito anteriormente.

Diversos métodos, ampliamente practicados en la técnica, pueden emplearse para unir una molécula de estreptavidina o biotina con el anticuerpo de la divulgación. Por ejemplo, una molécula de biotina puede unirse con el anticuerpo de la divulgación mediante la secuencia de reconocimiento de una biotina proteína ligasa (por ejemplo, BirA) como se describe en la sección de Ejemplo a continuación y en Denkberg, G. *et al.*, 2000. Eur. J. Immunol. 30:3522-3532. Como alternativa, una molécula de estreptavidina puede unirse con un fragmento de anticuerpo, tal como un Fv monocatenario, esencialmente como se describe en Cloutier SM. *et al.*, 2000. Molecular Immunology 37:1067-1077; Dubel S. *et al.*, 1995. J Immunol Methods 178:201; Huston JS. *et al.*, 1991. Methods in Enzymology 203:46; Kipriyanov SM. *et al.*, 1995. Hum Antibodies Hybridomas 6:93; Kipriyanov SM. *et al.*, 1996. Protein Engineering 9:203; Pearce LA. *et al.*, 1997. Biochem Molec Biol Intl 42:1179-1188).

Restos funcionales, tales como fluoróforos, conjugados con estreptavidina están disponibles en el mercado de esencialmente todos los proveedores de reactivos de citometría de flujo por inmunofluorescencia (por ejemplo, Pharmingen o Becton-Dickinson).

Según algunas realizaciones de la divulgación, se unen anticuerpos conjugados con biotina con una molécula de estreptavidina para formar una composición multivalente (por ejemplo, una forma dimérica o tetramérica del anticuerpo).

La Tabla 1 proporciona ejemplos no limitantes de restos identificables que pueden conjugarse con el anticuerpo de la divulgación.

Tabla 1

Resto identificable	Secuencia de aminoácidos (N.º de referencia de GenBank)	Secuencia de ácido nucleico (N.º de referencia de GenBank)
Proteína verde fluorescente	AAL33912	AF435427
Fosfatasa alcalina	AAK73766	AY042185
Peroxidasa	CAA00083	A00740
Marcador de histidina	Aminoácidos 264-269 del n.º de referencia de GenBank AAK09208	Nucleótidos 790-807 del n.º de referencia de GenBank AF329457
Marcador de myc	Aminoácidos 273-283 del n.º de referencia de GenBank AAK09208	Nucleótidos 817-849 del n.º de referencia de GenBank AF329457
Marcador de biotina ligasa	LHHILDAQKMWVNH	
Proteína naranja fluorescente	AAL33917	AF435432
Beta galactosidasa	ACH42114	EU626139
Estreptavidina	AAM49066	AF283893

Asimismo, para aislar el inmunocomplejo, el péptido aislado (por ejemplo anticuerpo) puede inmovilizarse en un soporte sólido. Como se emplea en la presente memoria la expresión "soporte sólido" se refiere a una matriz no acuosa a la que puede adherirse un reactivo de interés (por ejemplo, el polipéptido aislado de este aspecto de la presente divulgación). Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, soportes sólidos formados parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliácridamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En determinadas realizaciones, dependiendo del contexto, el soporte sólido puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otros es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Esta expresión también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la patente de los Estados Unidos n.º 4.275.149.

Los agentes descritos anteriormente en la presente memoria para detección de la formación de inmunocomplejo pueden incluirse en un kit de diagnóstico/artículo de fabricación preferentemente junto con instrucciones apropiadas para su uso y marcadores que indican la aprobación de la FDA para su uso en el diagnóstico y/o evaluación de una enfermedad asociada a laminina.

Dicho kit puede incluir, por ejemplo, al menos un recipiente que incluye al menos uno de los agentes de diagnóstico descritos anteriormente (por ejemplo, anticuerpos) y un reactivo de captura de imágenes envasado en otro recipiente (por ejemplo, enzimas, anticuerpos secundarios, tampones, sustratos cromogénicos, material fluorogénico). El kit también puede incluir tampones y conservantes apropiados para mejorar la vida útil del kit.

Según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un kit para detectar un nivel de QSOX1 en una muestra biológica.

Como se describe en detalle en la sección de Ejemplos a continuación (véase Ejemplo 1, posteriormente en la presente memoria), los presentes inventores han mostrado que la inhibición/agotamiento de QSOX1 provoca defectos del ensamblaje de laminina en la membrana basal.

Por lo tanto, según otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para identificar un inhibidor de

QSOX1, comprendiendo el método cultivar un tejido en presencia o ausencia de un agente de ensayo, en donde una reducción de la membrana basal funcional después del cultivo con el agente de ensayo es indicativa de que el agente de ensayo es el inhibidor de QSOX1.

5 Según una realización de la divulgación, una reducción de la membrana basal funcional comprende una reducción del ensamblaje de laminina en la membrana basal.

10 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "una reducción de la membrana basal funcional" se refiere a una reducción de al menos aproximadamente 10 %, en al menos aproximadamente 20 %, en al menos aproximadamente 30 %, en al menos aproximadamente 40 %, en al menos aproximadamente 50 %, en al menos aproximadamente 60 %, en al menos aproximadamente 70 %, en al menos aproximadamente 80 %, en al menos aproximadamente 90 % o en al menos aproximadamente 100 %. Por lo tanto, preferentemente no se incorpora laminina en la membrana basal.

Según otra realización, la reducción del ensamblaje de laminina comprende un aumento de laminina soluble en el tejido.

Según otra realización, el tejido comprende un cultivo tisular.

15 Según otra realización, el método se realiza *in vivo*.

20 Según otra realización, el método comprende además una reducción de la actividad o el nivel de expresión de QSOX1. La reducción de la actividad o el nivel de expresión de QSOX1 puede ser de al menos aproximadamente 10 %, en al menos aproximadamente 20 %, en al menos aproximadamente 30 %, en al menos aproximadamente 40 %, en al menos aproximadamente 50 %, en al menos aproximadamente 60 %, en al menos aproximadamente 70 %, en al menos aproximadamente 80 %, en al menos aproximadamente 90 % o en al menos aproximadamente 100 %.

Como se emplea en la presente memoria el término "aproximadamente" se refiere a ± 10 %.

Las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye pero sin limitación".

La expresión "que consiste en" significa "que incluye y limitado a".

25 La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método y la estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solamente si los ingredientes, las etapas y/o las partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición reivindicada, el método o la estructura.

30 Como se emplea en la presente memoria, la forma singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen referencias plurales salvo que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

35 A lo largo de la presente solicitud, diversas realizaciones pueden presentarse en un formato de intervalo. Debería entenderse que la descripción en formato de intervalo es únicamente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la divulgación. En consecuencia, debería considerarse que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene subintervalos específicamente desvelados tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

40 Siempre que se indique un intervalo numérico en la presente memoria, se entiende que incluye cualquier número citado (fraccional o integral) dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan en el presente documento indistintamente y se entiende que incluyen los primer y segundo números indicados y todos los números fraccionales e integrales entre ellos.

45 Como se emplea en la presente memoria el término "método" se refiere a modos, medios, técnicas y procedimientos para conseguir una tarea dada incluyendo, pero sin limitación, los modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos, o fácilmente desarrollados a partir de modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos por practicantes de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

50 Se aprecia que determinados elementos de la divulgación, que se describen, para mayor claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, diversos elementos de la divulgación, que se describen, para mayor brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o según sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la divulgación. Determinados elementos descritos en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse elementos esenciales de esas realizaciones, a no ser que la

realización no sea operativa sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente divulgación como se han delineado anteriormente en la presente memoria y como se reivindica en la sección de reivindicaciones posterior encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

5 Ejemplos

Se hace ahora referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la divulgación de una manera no limitante.

En general, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente divulgación incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se exponen en las patentes de los Estados Unidos n.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); se describen exhaustivamente inmunoensayos disponibles en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos n.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en las mismas son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

Ejemplo 1

El catalizador de disulfuro QSOX1 promueve la migración de células tumorales mediante la incorporación de componentes de membrana basal claves

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

35 Líneas celulares y mantenimiento

Se mantuvieron fibroblastos de pulmón WI-38 (Coriell) en Medio Esencial Mínimo (MEM) complementado con FBS 15 %, L-glutamina y antibióticos como ha recomendado el proveedor. Se mantuvieron células HFF y células fibroblásticas pancreáticas en MEM complementado con FBS 10 %, L-glutamina y antibióticos. Se mantuvieron células epiteliales BxPC-3 y H460 en DMEM complementado con FBS 10 %, L-glutamina y antibióticos.

40 Transfección de ARNip

Se transfectaron oligonucleótidos de ARNip específicos de QSOX1 y aleatorios en fibroblastos según las instrucciones del fabricante (Dharmacon). En resumen, las células se sembraron a una confluencia de aproximadamente el 75 % y se incubaron durante 6 h con ARNip 50 nM y tampón de transfección Dharmafect1 en medios Opti-MEM sin suero. Después de la incubación, la mezcla de transfección se aspiró, y se añadió MEM que contenía FBS 10 % a las células.

Inmunofluorescencia

Las células se cultivaron en cubreobjetos de vidrio en una placa de 24 pocillos hasta la confluencia deseada. Para tinción intracelular, las células se fijaron durante 30 min a TA con formaldehído 3,7 %, seguido de permeabilización en Triton X-100 0,1 % durante 2 min, y después se aclararon 3 veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Tween (PBS-T) 0,1 %. Las células se incubaron después durante una h con BSA 5 % en PBS-T, seguido de incubación con anticuerpo primario (20 µg/ml salvo que el fabricante especifique otra cosa) en BSA 5 % en PBS durante 1 h a TA o durante una noche a 4 °C lavado en PBS y se incubaron con anticuerpo secundario marcado con fluorescencia en BSA 5 % en PBS-T durante 1 h a TA. Después de 3 lavados adicionales, se colocaron cubreobjetos, con las células hacia abajo, en una gota de 5 µl de reactivo antidestinción ProLong Gold (Invitrogen) en portaobjetos de vidrio y se dejaron secar durante una noche protegidas de la luz. Las muestras se observaron en

un sistema de captura de imágenes DeltaVision (Applied Precision). Para marcaje de proteínas del MEC, las células y su matriz asociada se incubaron con BSA 5 % en PBS-T y se marcaron con anticuerpo primario. Las muestras se fijaron después con formaldehído 3,7 % y se trataron con anticuerpo secundario.

Purificación de la MEC y tinción con ThioGlo

- 5 Se dejaron crecer cultivos celulares en placas de 24 pocillos y se transfectaron como se describe en la sección de resultados (posteriormente en la presente memoria) y descripción de figuras (anteriormente en la presente memoria). Las células se desprendieron mediante tratamiento con NH_4OH 20 mM durante 1 min, seguido de 6 lavados con EDTA/PBS 1 mM (pH 7,4). Después del último lavado, las muestras del MEC de control positivo y negativo se trataron con DTT 100 mM (en EDTA/PBS 1 mM) o NEM 100 mM (añadido de una reserva 250 mM en acetonitrilo 5 %), respectivamente, durante 1 h a 37 °C. Las muestras se lavaron después 4 veces con EDTA/PBS 1 mM, después
- 10 se incubaron con reactivo ThioGlo 6 μM durante 30 min a TA (protegido de la luz). La reacción se terminó mediante la adición de 2 μl de HCl 2 N, y la emisión se midió usando un lector de placas de ELISA (ex: 379 nm, em: 513 nm).

Ensayo de consumo de oxígeno

- 15 Un electrodo de oxígeno de tipo Clarke (Hansatech Instruments Ltd.) se usó para supervisar cambios en las concentraciones de oxígeno disuelto como una medida de la actividad de sulfhidrilo oxidasa. Se ensayó QSOX1 purificada en tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,5, NaCl 65 mM, EDTA 1 mM. Las reacciones se iniciaron mediante inyección de ditioneitol (DTT) a una concentración de 5 mM en la cámara de reacción de electrodos. La actividad de sulfhidrilo oxidasa en sobrenadantes de cultivo celular se ensayó de forma similar, después de la inyección de DTT 5 mM en la solución de sobrenadante.

Análisis de espectrometría de masas

- Los fragmentos de gel se trataron con proteasa a 37 °C en bicarbonato de amonio 50 mM. Se extrajeron mezclas de péptidos de los geles con CH_3CN 80 %, CF_3COOH 1 %, y el disolvente orgánico se evaporó en una centrífuga al vacío. Las mezclas de péptidos resultantes se reconstituyeron en ácido fórmico 80 % y se diluyeron inmediatamente 1:10 con agua Milli-Q antes del análisis de espectrometría de masas. Se realizó espectrometría de masas en tándem
- 25 (LC-MS/MS) usando una columna capilar de sílice fusionado por pulverización de fase inversa de 15 cm (diámetro interno de 75 μm) realizada de forma interna y empaquetada con medio ReproSil-Pur C_{18}AQ de 3 μm (Ammerbuch-Entringen, Alemania) usando un sistema UltiMate 3000 Capilar/Nano LC (LC Packings, Dionex). El sistema de LC se usó junto con un LTQ Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) operado en el modo iónico positivo y equipado con una fuente de iones de nanoelectropulverización. Los péptidos se separaron con un gradiente de 50 min de acetonitrilo de 5 a 65 % (tampón A: acetonitrilo al 5 %, ácido fórmico al 0,1 %, TFA al 0,005 %; tampón B: acetonitrilo al 90 %, ácido fórmico al 0,2 %, TFA al 0,005 %). Se adquirieron exploraciones de MS de investigación en el Orbitrap con la resolución ajustada a un valor de 60.000. Hasta los seis iones más intensos por exploración se fragmentaron y analizaron en la trampa lineal. Para el análisis de péptidos, se registraron exploraciones de investigación en el modo de FT seguido de disociación inducida por colisión (CID) dependiente de los datos de los seis iones más intensos en la trampa iónica lineal (LTQ). Los archivos de datos en bruto se exploraron con MASCOT (Matrix Science, Londres, Reino Unido) frente a una base de datos Swissprot.
- 35

Ensayos de invasión

- Los fibroblastos se sembraron en las cámaras superiores de placas BD BioCoat de 24 pocillos con insertos de membrana de un tamaño de poro de 8,0 μm . Las células se transfectaron y se complementaron con rQSOX1 como se describe en la sección de resultados (posteriormente en el presente documento) y descripción de las figuras (anteriormente en el presente documento), y se dejaron crecer durante 4 días hasta alcanzar la confluencia. El cuarto día, 5×10^4 células epiteliales, premarcadas con el marcador de seguimiento celular CFSE (Molecular Probes) según las instrucciones del fabricante, se superpusieron sobre los fibroblastos. La cámara interna se cargó con MEM sin sueros y la cámara externa con MEM que contenía FBS 10 %. Se permitió que las células epiteliales
- 40 migraran a través de la membrana durante 24 h a 37 °C. Las células no invasoras se rasparon manualmente de la cara superior de la membrana y se descartaron y las células invasoras en la cara inferior se fijaron en formaldehído 3,7 %, se capturaron imágenes y se cuantificaron.
- 45

Ensayo de adherencia celular

- Los fibroblastos se cultivaron en una placa de 24 pocillos y se transfectaron y complementaron con rQSOX1 como se describe en la sección de resultados y las leyendas de las figuras. El día 4 después de la transfección, los fibroblastos se incubaron durante 1 h con BSA 5 % en PBS y 1 conjunto de muestras se complementó con anticuerpo $\alpha 6$. Después de lavados con PBS-T, 10^5 células epiteliales, premarcadas con el colorante de seguimiento celular CFSE, se superpusieron en los fibroblastos y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Las placas se precintaron después con plástico y se centrifugaron boca abajo durante 5 min a 50 x g para retirar células. Después de la centrifugación, las células que permanecieron unidas a las placas se tripsinizaron, se resuspendieron en PBS y se
- 50 contaron mediante citometría de flujo.
- 55

Tinción de senescencia

Las células se transfectaron como se describe en la sección de resultados y las leyendas de las figuras. Antes de la tinción con SA- β -Gal, las células se fijaron con glutaraldehído 0,5 % durante 15 min a TA, seguido de 3 lavados con PBS/MgCl₂ (pH 6,0). Después se añadió solución de X-gal nueva, y las células se incubaron durante 3 h a 37 °C protegidas de la luz. Las células se lavaron después 3 veces con PBS y se capturaron imágenes inmediatamente.

Microscopía electrónica de barrido

Se cultivaron células WI-38 en cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro. Las células se fijaron durante 1 h a TA con paraformaldehído 3 % y glutaraldehído 2 % en tampón de cacodilato 0,1 M, pH 7,2, CaCl₂ 5 mM, sacarosa 1 %. Después de aclarar con tampón de cacodilato 0,1 M que contenía sacarosa 1 % 3 veces (5 min cada una), las células se trataron con OsO₄ 1 % en tampón de cacodilato 0,1 M, pH 7,2, CaCl₂ 5 mM, sacarosa 1 % durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron después 5 veces con tampón de cacodilato 0,1 M, 5 veces con agua, se incubaron durante 5 min con ácido tánico 1 % y se lavaron de nuevo 5 veces con agua. Las muestras se incubaron con acetato de uranilo 1 % durante 30 min y se lavaron de nuevo 5 veces con agua. Para deshidratación, las muestras se incubaron durante 5 min cada vez sucesivamente en 25 %, 50 %, 70 %, 96 % y 100 % de etanol. Se capturaron imágenes de las muestras usando un microscopio electrónico FEG-SEM LEO Supra 55.

Aislamiento de FN/FAC

Se obtuvieron FN y FAC se un tumor de pulmón resecado quirúrgicamente (FAC) o de un área sana (FN) de la misma muestra de ensayo. Se obtuvo consentimiento firmado de los pacientes, como requiere el Consejo de Revisión Institucional (IRB). Los tejidos se trituraron y se incubaron durante una noche a 37 °C con agitación constante en DMEM que contenía collagenasa de tipo 4. Después las células se filtraron y se sembraron en DMEM que contenía FBS 20 %, piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales, antibióticos y β -mercaptoetanol 60 μ M durante 7-14 días, después se movieron a medio que contenía FBS 10 %. La identidad de fibroblastos se confirmó mediante morfología típica, tinción de vimentina positiva y tinción de citoqueratina negativa. Las células se congelaron en alícuotas y se descongelaron 7 días antes de cada experimento. Después de la descongelación, los fibroblastos se cultivaron hasta 70 % de confluencia y después el medio se reemplazó con medio de control o medio acondicionado H460. Se realizó recogida celular y análisis de ARN a las 48 h.

Medio acondicionado

Se cultivaron células epiteliales de pulmón (H460) y páncreas (BxPC-3) confluyentes en placas de cultivo. Se recogió medio acondicionado después de 5 días y se centrifugó para eliminar residuos.

Análisis de PCR de transcripción inversa en tiempo real

Se extrajo ARN total usando el kit NucleoSpin kit (Macherey Nagel, Alemania). Se transcribió de forma inversa un microgramo de ARN con transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney y cebadores hexaméricos aleatorios. Se realizó PCR en tiempo real cuantitativa usando mezcla maestra de PCR SYBR Green en un instrumento ABI 7300 (Applied Biosystems). Los cebadores se diseñaron usando el software Primer Express y el nivel de expresión se normalizó mediante el del gen de GAPDH constitutivo en la misma muestra.

Inmunotinción histológica

Se deshidrataron tejidos fijados en formalina de enfermos de cáncer de mama, se incluyeron en parafina y se cortaron a 4 μ m. Los portaobjetos se calentaron a 60 °C durante 1 h, se desparafinizaron en xileno y se deshidrataron. Se realizó un bloqueo con peroxidasa endógena durante 10 min en H₂O₂/metanol 3 %. Después de aclarados en TBS, las secciones se incubaron una h a temperatura ambiente con un anticuerpo purificado a QSOX1 (1:50). Se realizó detección con conjugado Super Picture POLY HRP (Invitrogen). En resumen, las secciones se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con conjugado POLY HRP. La unión de anticuerpo se visualizó con el sustrato cromógeno AEC. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se montaron en cubreobjetos con un líquido de montaje acuoso (Glycergel, Dako). Las secciones teñidas se revisaron con un microscopio óptico y se analizaron.

Análisis de micromatrices

Para cuantificación de transcritos de laminina, las células WI-38 se trataron con ipCONTROL, ipQSOX1, o ipQSOX1 + rQSOX1, y se extrajo ARN total usando el minikit RNeasy (Qiagen). La calidad del ARN se evaluó usando la plataforma Bioanalyzer 2100 (Agilent). Después las muestras se procesaron e hibridaron con micromatrices humanas Affymetrix 2.0 usando el sistema de Affymetrix GeneChip según las instrucciones del fabricante.

Microscopía de fuerza atómica

Se realizaron mediciones de AFM en un Bruker Bioscope con controlador Nanoscope 4, usando una punta coloidal (borosilicato de 1 μ m de radio) y voladizo de 0,03 N/m (Novascan). Se realizaron curvas de fuerza-distancia a 0.5 Hz sin exploración en la muestra. Se calcularon los módulos elásticos usando un ajuste de modelo herziano para las

curvas entrantes. Se adquirieron varias docenas de curvas de fuerza en cada una de 3 muestras de control y 2 muestras de atenuación de QSOX1.

RESULTADOS

Se secreta QSOX1 activa de fibroblastos inactivos

5 Se mostró previamente que QSOX1 expresada de forma transitoria en células epiteliales cultivadas estaba localizada en el aparato de Golgi [Chakravarthi S. *et al.* (2007). *Biochem. J.* 404, 403-411]. También se ha sugerido previamente que la QSOX1 endógena en neuronas y glándulas neuroendocrinas está localizada en el Golgi [Tury A. *et al.* (2004) *J. Endocrinol.* 183, 353-363]. Los presentes inventores indujeron anticuerpos policlonales y demostraron la localización de QSOX1 endógena en el Golgi en células endoteliales y epiteliales (Figuras 9A-J). En fibroblastos subconfluentes, también se descubrió QSOX1 en el Golgi (Figuras 1C-J). Tras alcanzar la confluencia, sin embargo, el patrón de tinción intracelular en fibroblastos cambió, lo que parecía corresponder al movimiento de QSOX1 a vesículas secretoras (Figuras 9A-J).

Se ha mostrado previamente que los niveles de QSOX1 aumentan en el medio de cultivo de fibroblastos WI-38 a medida que se hacen confluentes y entran en inactividad (Coppock *et al.*, 2000, mencionado anteriormente). Células WI-38, procedentes de pulmón, un tejido con abundancia de QSOX1 pero no su parólogo QSOX2. Los presentes inventores confirmaron transcripción de QSOX1 exclusiva y secreción de proteínas al medio de cultivo de fibroblastos confluentes (Figura 1K). Los niveles de QSOX1 secretada aumentaron a lo largo del tiempo (Figura 1L), en correlación con un aumento de la actividad sulfhidrilo oxidasa, como se mide mediante un ensayo de consumo de oxígeno (Figura 1M). La actividad de QSOX1 en medio de cultivo celular confluyente fue comparable a QSOX1 recombinante de tipo silvestre 40-50 nM (rQSOX1) (Figura 9K). Se mostró que la secreción de QSOX1 era un fenómeno general de fibroblastos confluentes de diversos orígenes. En particular, fibroblastos asociados a cáncer (FAC) de páncreas y pulmón, fibroblastos de pulmón normales y fibroblastos de prepucio humano secretaron QSOX1 al medio de cultivo (Figura 9L). Por el contrario, las células epiteliales y endoteliales ensayadas, aunque expresaban QSOX1 de forma intracelular, no secretaban la enzima incluso varios días después de alcanzar la confluencia (datos no mostrados).

Las transferencias de Western de QSOX1 secretada a medio de cultivo de fibroblastos mostraron uniformemente un doblete de bandas por SDS-PAGE a aproximadamente 80-90 kD (Figura 1L). Las dos variantes de corte y empalme conocidas del transcrito QSOX1 codifican una proteína soluble de un peso molecular calculado de aproximadamente 76 kD, incluyendo modificaciones de oligosacáridos y una proteína de aproximadamente 92 kD que contiene un segmento transmembrana carboxilo terminal predicho. Para determinar la fuente de las dos especies de QSOX1 observadas mediante transferencia de western, los presentes inventores inmunoprecipitaron QSOX1 de sobrenadante de cultivo y sometieron las dos bandas a espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida (LC-MS/MS) (Figuras 10A-D). Los péptidos recuperados de la banda inferior se obtuvieron solamente de la región común para ambas variantes de corte y empalme. Algunos péptidos recuperados de la banda superior, sin embargo, fueron de regiones únicas de la variante de corte y empalme más larga. No se observó ningún péptido que abarcara la cola citosólica o región transmembrana de la variante de corte y empalme más larga. Una posible explicación de estas observaciones fue que la variante de corte y empalme más larga se biosintetizara con su región transmembrana y el ectodominio soluble se desprendiera tras escisión postraducciona en la ruta secretora o en la superficie celular.

QSOX1 extracelular es necesaria para la adhesión de fibroblastos

Se agotó QSOX1 de fibroblastos usando ARN de interferencia pequeño (ARNip). La transfección con ARNip específico de QSOX1 redujo el ARNm de QSOX1 y secretó enzima por debajo de niveles detectables y condujo a una reducción correspondiente de la actividad sulfhidrilo oxidasa extracelular hasta tasas de fondo (Figura 11A). La tinción con inmunofluorescencia de fibroblastos transfectados con ARNip de QSOX1 mostró muy pocas células (aproximadamente 5 %) que conservaban niveles detectables de proteína intracelular. El agotamiento de QSOX1 se mantuvo durante al menos cuatro días después de la transfección (Figura 11B).

El efecto más evidente del agotamiento de QSOX1 de fibroblastos fue una reducción del número de células (Figuras 2A-E). Cuatro días después de la transfección, el recuento celular pobre en QSOX1 fue de aproximadamente 50 % de las células de control. La adición de rQSOX1 50 nM al medio de cultivo de células pobres en QSOX1 24 horas después de la transfección restauró completamente los números de células. Por el contrario, la adición de rQSOX1 catalíticamente inactiva 50 nM (rQSOX1 - AA), en la que las cisteínas redox activas amino terminales (C70 y C73) se reemplazaron por alaninas (Figura 2F), no tuvo ningún efecto. La posibilidad de que el peróxido de hidrógeno, el subproducto de la formación de disulfuro mediada por QSOX1, sea necesario para la proliferación celular normal se descartó por el tratamiento de células de control con catalasa, una enzima que dismuta peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua, sin efectos detectables (datos no mostrados). Estos datos establecen la importancia de QSOX1 extracelular catalíticamente activa y la formación de enlaces disulfuro para la proliferación de fibroblastos en cultivo.

Varios escenarios podrían conducir a reducción del número de células después del agotamiento de QSOX1 en fibroblastos. En particular, la actividad de QSOX1 extracelular puede promover la proliferación celular, o la falta de

QSOX1 puede inducir apoptosis, inactivación o senescencia. La tinción con anexina V indicó que la apoptosis era insignificante en células con atenuación de QSOX1 (datos no mostrados). Tampoco la atenuación de QSOX1 provocó que las células se volvieran senescentes, según la tinción de X-gal para actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (Figuras 11C-E). Asimismo, la tinción con yoduro de propidio el día cuatro después del tratamiento con ARNip sugirió que el agotamiento de QSOX1 no provocó salida del ciclo celular (datos no mostrados). Los inventores observaron que no hubo ninguna diferencia significativa en los números de células entre cultivos pobres en QSOX1 y de control hasta 48 horas después de la transfección. A partir del tercer día, sin embargo, los números de células comenzaron a divergir y las células desprendidas comenzaron a aparecer en el medio de cultivo de muestras pobres en QSOX1 (Figuras 2G-H). La adición de rQSOX1 al cultivo de fibroblastos un día después de la transfección evitó el desprendimiento celular posteriormente, además de restaurar los números de células. Como se ha observado anteriormente. El agotamiento de QSOX1 puede empeorar la adhesión reducida de células mitóticas que se aprovecha en la técnica de "desprendimiento de células mitóticas por agitación", que da como resultado pérdida de células de la monocapa incluso sin agitación intencionada.

El agotamiento de QSOX1 provoca defectos del ensamblaje de laminina en la membrana basal

Los inventores buscaron a continuación identificar los defectos moleculares que dieron como resultado el desprendimiento celular en ausencia de QSOX1 extracelular. Las proteínas de la matriz extracelular (MEC) son dianas importantes para los receptores de adhesión. Se ha observado previamente que los transcritos para una diversidad de componentes de MEC aumentaron en fibroblastos confluentes junto con ARNm de QSOX1 (Coppock *et al.*, 1993, mencionado anteriormente). Los presentes inventores razonaron que si QSOX1 es necesaria para la formación de enlaces disulfuro en colágenos u otros componentes de la MEC, el agotamiento de QSOX1 puede dar como resultado un exceso de cisteínas sin emparejamiento en la MEC. De hecho, la matriz extracelular aislada de fibroblastos pobres en QSOX1 tuvo niveles aumentados de tioles reactivos como se indica por marcaje con el fluoróforo específico de tiol ThioGlo1 (Figura 12A). Los niveles de tiol fueron restaurados en parte por la adición de rQSOX1 al medio de cultivo después de transfección de ARNip, pero no por adición de rQSOX1-AA. Estos datos proporcionan la primera indicación de que QSOX1 cataliza la formación de disulfuro en proteínas de la matriz extracelular.

Los componentes de la MEC producidos por fibroblastos WI-38 son los que constituyen la membrana basal (MB), la capa fibrosa fina que subyace en el epitelio y endotelio. Los inventores han hecho referencia anteriormente en el presente documento a la MEC producida por células WI-38 cultivadas así como MB, aunque la matriz se retira de su contexto fisiológico en relación con superficies y cavidades corporales. Los constituyentes principales de la MB incluyen colágeno IV y laminina, que se polimerizan para formar redes fibrosas, y perlecano, entactina y agrina, que unen el colágeno IV y armazones de laminina. Para determinar si cualquiera de estos constituyentes de la MB se ven influidos por la actividad extracelular de QSOX1, se usaron inmunofluorescencia (IF) y transferencia de western para analizar, respectivamente, células y medios de cultivo procedentes de fibroblastos cuatro días después de la transfección de ARNip específica de QSOX1. De esta manera, los presentes inventores supervisaron cambios en la morfología y composición de MB, así como cambios en los niveles de versiones solubles de proteínas debido a la ausencia de incorporación en la MB. No se detectaron cambios significativos en colágeno IV mediante transferencia de western tras el agotamiento de QSOX1 (Figuras 12B-Q). Sin embargo, se observaron muchos defectos en la incorporación de laminina en ausencia de QSOX1. Cuatro días después del agotamiento de QSOX1, podría detectarse laminina soluble mediante transferencia de western en medio de cultivo y se midió una reducción del 74 % en laminina extracelular IF en comparación con células de control (Figuras 3A-L y 4A). Los cambios en laminina después del agotamiento de QSOX1 se invirtieron completamente por la adición exógena de rQSOX1 al medio de cultivo después de transfección de ARNip, pero no mediante adición de rQSOX1-AA, lo que indica que es necesaria actividad sulfhidrilo oxidasa para incorporación de laminina en la MB. Aunque podría esperarse una reducción de la cantidad total de laminina a la vista de la reducción del número de células total tras atenuación de QSOX1, los inventores descubrieron niveles de laminina reducidos incluso cuando se capturaron imágenes de números iguales de células (Figura 13A). Además, el desprendimiento celular comenzó el tercer día después de la transfección, mientras que pudo detectarse laminina reducida en la matriz ya a las 48 horas (Figura 13A) y el contenido total de proteína extracelular fue en general igual entre células de control y pobres en QSOX1 (Figura 13F). Finalmente, y lo que es más importante, se detectó laminina soluble en el medio de cultivo solo en ausencia de QSOX1 (Figura 4B), lo que indica un defecto en el ensamblaje en lugar de un simple cambio en la cantidad.

Para diseccionar adicionalmente el papel de QSOX1 extracelular en el ensamblaje de laminina en la membrana basal, los inventores evaluaron la concentración y dependencia del tiempo de la adición de rQSOX1 a células pobres en QSOX1 (Figura 13M). Los inventores descubrieron que rQSOX1 50 nM añadida 24 horas después de la transfección reparaba los defectos extracelulares, tales como la adhesión celular reducida e incorporación de laminina deficiente en la MB, provocados por agotamiento de QSOX1 con ARNip. Mayores concentraciones de rQSOX1 (es decir, 125 nM) no aumentaron los números de células o el ensamblaje de laminina por encima de los niveles de células de control o células con atenuación de QSOX1 tratadas con rQSOX1 50 nM, lo que indica que la actividad de QSOX1 no era limitante por encima de 50 nM. Por el contrario, rQSOX1 25 nM fue insuficiente para invertir completamente los efectos del agotamiento de QSOX1. Cuando se añadió rQSOX1 50 nM 72 en lugar de 24 horas después de la transfección, los efectos del agotamiento de QSOX1 no se invirtieron (no mostrados). La dependencia del tiempo de la adición de enzima exógena sugiere que la secreción de QSOX1 y laminina debe estar correlacionada temporalmente, o se pierde la ventana de oportunidad para la incorporación en MB de laminina.

Se espera que la perturbación del ensamblaje de laminina también influyera en proteínas de unión a laminina. La membrana basal es rica en proteínas de interacción de laminina, incluyendo perlecano, entactina, agrina, netrina y fibronectina. Estas proteínas también interactúan con la red de colágeno IV y con receptores de superficie celular. Los inventores observaron perlecano soluble, entactina, agrina y fibronectina en medio de cultivo de fibroblastos pobres en QSOX1 en una mayor medida que en el medio de células de control (Figura 12C-E). Sin embargo, como mucho se detectó una reducción menor de cada una de estas proteínas mediante IF en MB de células pobres en QSOX1 (Figura 12G-I, 12K-M). Estos datos son coherentes con un defecto en la red de laminina en ausencia de QSOX1 y una influencia posterior en las proteínas que interactúan con laminina, pero sugieren que las interacciones con colágeno IV o proteínas de superficie celular son suficientes para conservar su incorporación en MB en un mayor grado.

QSOX1 afecta a isoformas de laminina particulares

La laminina se secreta de la célula como un heterotrímero en forma de cruz que consiste en tres cadenas conocidas como α , β y γ . Se conocen cinco isoformas de la subunidad α , 4 isoformas β y 3 isoformas γ en seres humanos, y 16 combinaciones de cadena diferentes, expresadas en diferentes tejidos y estadios del desarrollo, se han descubierto hasta la fecha. Según la nomenclatura contemporánea, estos tipos de laminina se designan por su composición de cadena, por ejemplo, laminina-111 contiene las cadenas $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\gamma 1$. El anticuerpo usado para detectar cambios en laminina anterior fue policlonal para el fragmento P1, que es un determinante antigénico altamente conservado de trómeros de laminina. El anticuerpo P1 reconoce por lo tanto múltiples isoformas de laminina. La tinción IF para P1 apuntó no obstante a la coexistencia de múltiples matrices de laminina diferentes en MB producida por células WI-38 confluyentes. Los presentes inventores observaron que se observó una matriz de laminina delicada en muestras tanto de control como de atenuación de QSOX1. Sin embargo, una población de laminina adicional, que en procedimientos de tinción IF convencionales aparecieron como manchas amorfas grandes (Figura 13G-H, 13K-L), se encontró solamente en células de control. La diferente apariencia de las dos poblaciones de laminina en el mismo protocolo de fijación y tinción indicó la existencia de dos tipos cualitativamente diferentes de laminina, solamente uno de los cuales era sensible a la presencia de QSOX1. El refinamiento posterior del protocolo de tinción (véase 'sección de materiales y métodos' anterior) conservó la apariencia de tipo malla de la red de laminina dependiente de QSOX1 para producir imágenes tales como las de las Figuras 3A-L.

Se obtuvo información con respecto a las isoformas de laminina expresadas en fibroblastos WI-38 de análisis de micromatrices de ARN de células de control y pobres en QSOX1, los inventores descubrieron que laminina-411, -421, -221 y -211 se expresan potencialmente de forma más abundante en estas células y que, aparte de un aumento menor en los transcritos para las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, el agotamiento de QSOX1 no alteró los niveles de ARNm de cadena de laminina de forma significativa (Tabla 2, posterior). La tinción IF con anticuerpos específicos reveló una profunda reducción de la cadena $\alpha 4$ de laminina en la MB tras el agotamiento de QSOX1, mientras que la cadena $\alpha 2$ no tenía cambios (Figuras 3M-R y 4C). Por lo tanto, la incorporación de laminina-411 o laminina-421, pero no laminina-221 o laminina-211, es el acontecimiento preciso afectado por QSOX1 extracelular. Asimismo, laminin-411 o -421 probablemente corresponda a las manchas de laminina grandes vistas usando procedimientos de tinción IF convencionales, como se ha descrito anteriormente. Las regiones de MB ricas en laminina de cadena $\alpha 2$ tendieron a ser ricas en laminina de cadena $\alpha 4$ también, pero la matriz que contenía $\alpha 4$ se extendió a regiones pobres en laminina que contenía $\alpha 2$ (Figuras 3M-R).

Tabla 2: Niveles de expresión de isoforma de laminina

gen	ipQ frente a ipC	ipQ+r frente a ipC	ipQ+r frente a ipQ	Nivel en ipC
LAMA1	1,6	1,5	-1,1	6,7
LAMA2	1,5	2,5	1,7	7,8
LAMA3	ND	ND	ND	ND
LAMA4	-1,0	-1,2	-1,2	10,3
LAMA5	ND	ND	ND	ND
LAMB1	1,1	-1,0	-1,1	10,8
LAMB2	-1,3	-1,3	-1,1	8,1
LAMB3	ND	ND	ND	ND
LAMB4	ND	ND	ND	ND
LAMC1	1,1	1,0	-1,0	10,7
LAMC2	ND	ND	ND	ND
LAMC3	ND	ND	ND	ND

Los niveles de transcritos de ARNm en fibroblastos WI-38 tratados con ARNip de control o ARNip específico de QSOX1, con o sin complementación con rQSOX1, se

determinaron usando análisis de micromatrices. Se proporcionaron los factores de cambio entre los diversos pares de muestras y niveles normalizados (en relación con un conjunto seleccionado de ARNm de referencia) en células WI-38 de control

Se obtuvo información acerca de la ultraestructura de la matriz de laminina dependiente de QSOX1 usando microscopia electrónica de barrido (MEB). La MEB reveló una abundancia de un material de tipo filigrana agrupada en el ambiente extracelular de células WI-38 de control (Figuras 5A-F). No se detectó material con esta apariencia en asociación con células con atenuación de QSOX1. En conjunto, observaciones realizadas usando MEB e IF sugirieron que QSOX1 es necesaria para el ensamblaje de MB apropiado de solamente isoformas de laminina particulares que presenten una ultraestructura definida. Asimismo, la sensibilidad al protocolo de tinción sugiere que la malla de laminina dependiente de QSOX1 está de forma natural fijada a la superficie celular o a otros componentes de la MB que las redes de laminina depositadas en la MB de forma independiente de la actividad de QSOX1.

QSOX es necesaria para migración de células epiteliales tumorales

Las isoformas de laminina promueven y soportan la migración de células epiteliales durante la metástasis. Se descubrió previamente que los transcritos tanto para QSOX1 como para la cadena de laminina $\alpha 4$, codificados por el gen de LAMA4, aumentan significativamente en fibroblastos que rodean el carcinoma de mama invasivo en comparación con fibroblastos de mama normales [Finak G. *et al.* (2008) *Nature Med.* 14, 518-527]. Los datos presentes, que demuestran una necesidad específica de QSOX1 en el ensamblaje de lamininas que contienen $\alpha 4$, sugieren una consecuencia mecánica de la coinducción de LAMA4/QSOX1 en el estroma asociado a cáncer. Para ensayar si la actividad extracelular de QSOX1 afecta a la interacción de células tumorales con el estroma circundante, los inventores utilizaron un ensayo de invasión organotípico. Este ensayo supervisó la capacidad de células epiteliales de pulmón metastásicas H460, premarcadas con un colorante citoplasmático fluorescente, para migrar a través de una capa preformada de fibroblastos de pulmón WI-38 y su MB asociada (Figura 5G). La migración de células epiteliales se atenuó en aproximadamente 60 % cuando se agotó QSOX1 durante la formación de la capa de fibroblastos (Figuras 6A-O). Cuando los fibroblastos pobres en QSOX1 se complementaron con rQSOX1 exógena, la migración de células tumorales se reestableció. Sin embargo, la adición de rQSOX1-AA no apoyó la migración. Se obtuvieron resultados similares usando fibroblastos pancreáticos y células epiteliales, lo que indica la generalidad de la inhibición de la migración tras el agotamiento de QSOX1 (Figura 14). Se obtuvieron resultados similares para fibroblastos pancreáticos emparejados y células epiteliales (Figuras 6R-S), lo que indica la generalidad de la actividad catalítica de QSOX1 en la construcción de MEC promigratoria. Aunque las monocapas de fibroblastos pobres en QSOX1 fueron más elásticas que los controles (Figura 6T), lo que sugiere mayor penetrabilidad, su incapacidad para apoyar la migración es coherente con el papel conocido de la laminina en la adhesión mediada por integrina, un prerrequisito para la metástasis tumoral.

Para excluir la posibilidad de que QSOX1 actúe directamente en células epiteliales tumorales para promover su migración, se realizó un ensayo de migración en ausencia de la capa de fibroblastos. La migración de H460 a través de membrana porosa recubierta con Matrigel se cuantificó en presencia o ausencia de rQSOX1 en el medio de cultivo. La adición de rQSOX1 no tuvo ningún efecto detectable, lo que demuestra que QSOX1 no promueve directamente la migración de células tumorales. Además, para excluir la posibilidad de que la escasa migración de células tumorales en una capa de fibroblastos que carece de QSOX1 se deba a viabilidad de células epiteliales reducida, se superpusieron células H460 sobre fibroblastos WI-38 en un cubreobjetos de vidrio. No se detectó ninguna diferencia en la captación de un indicador de la viabilidad celular entre células H460 en fibroblastos de control frente a pobres en QSOX1 (datos no mostrados). En conjunto, estos datos apoyan la conclusión de que la actividad extracelular de QSOX1 promueve de hecho la migración de células epiteliales tumorales a través de MB secretada de fibroblastos mediante sus efectos en la capa del estroma.

Las células epiteliales requieren QSOX1 para adhesión firme a MB durante la migración

Los defectos en la adhesión de fibroblastos se correlacionaron con ensamblaje de laminina alterada en monocultivos deficientes en QSOX1 como se ha descrito anteriormente. Para ensayar si la capacidad afectada de las células epiteliales para migrar a través de una capa de fibroblastos pobres en QSOX1 también se debe a defectos de adhesión, los inventores evaluaron la adhesión de células epiteliales usando centrifugación. Se colocaron células epiteliales en capas de fibroblastos preformadas y se compararon las fuerzas de adhesión aplicando una fuerza controlada. Tras someterlas a una aceleración de 50 g durante 5 minutos, las células epiteliales H460 se desprendieron más fácilmente (desprendimiento del 44,9 %) de fibroblastos WI-38 pobres en QSOX1 que de células de control (desprendimiento del 4,5 %). La adición de rQSOX1 a cultivos en crecimiento de fibroblastos pobres en QSOX1 restauró la adhesión de células epiteliales posteriormente superpuestas sobre ellas, mientras que la adición de rQSOX1-AA no. Los inventores concluyen que la actividad catalítica extracelular de QSOX1 facilita la formación de una capa del estroma a la que se adhieren eficazmente células tumorales, con facilitación posterior de migración de células tumorales.

Las lamininas son reconocidas por integrinas de superficie celular, que son heterodímeros de cadenas α y β que actúan como mediadores fundamentales de adhesión célula-célula y célula-matriz. La integrina $\alpha 6 \beta 1$ es un receptor

importante para laminina en células epiteliales, aunque también se ha mostrado previamente que $\alpha 6 \beta 4$ y $\alpha 3 \beta 1$ se unen a laminina. Si la atenuación de QSOX1 reduce de hecho la adhesión y migración celular debido a deficiencia de laminina, los inventores esperarían que el bloqueo directo del receptor de laminina tuviera un efecto comparable. Las células epiteliales metastásicas pretratadas con un anticuerpo de bloqueo $\alpha 6$ durante una hora mostraron reducción de la migración a través de la capa de fibroblastos y su MB asociada, en un grado similar al observado tras atenuación de QSOX1 (Figura 6P). También se demostró adhesión reducida de células epiteliales tratadas con anti- $\alpha 6$ a matriz secretada por fibroblastos en el ensayo de adhesión celular de centrifugación (Figura 6Q). Estos datos son coherentes con menos interacciones de laminina-integrina que subyacen en los defectos de adhesión y migración observados tras la atenuación de QSOX1.

10 ***La interacción entre células epiteliales tumorales y fibroblastos induce secreción de QSOX1 y promueve la migración***

In vivo, los fibroblastos incluidos en la MB alrededor de órganos y vasos sanguíneos intercambian señales con el epitelio y el endotelio a través de factores secretados. Los presentes datos muestran que la secreción de QSOX1 promueve la adhesión celular, el ensamblaje de la membrana basal y la migración celular, todos los cuales podrían apoyar la proliferación celular y la metástasis. Ya que no se sabe que las células epiteliales secreten QSOX1, los inventores ensayaron a continuación si las células tumorales reclutan fibroblastos adyacentes para inducir la expresión y secreción de QSOX1. Para este fin, se cultivaron células WI-38 subconfluentes, que típicamente expresan menores niveles de QSOX1 y no la secretan de forma detectable, durante dos días con medio acondicionado procedente de la línea celular de carcinoma de pulmón H460. La exposición a medio acondicionado potenció la secreción de QSOX1 de los fibroblastos (Figura 7A). Este hallazgo se reprodujo con fibroblastos y células tumorales epiteliales de una fuente pancreática (Figura 7A). Además, la incubación de fibroblastos con medio acondicionado a células tumorales facilitó la posterior migración de células epiteliales a través de la matriz en un mayor grado que la incubación con medio normal (datos no mostrados).

Análisis ex vivo de fibroblastos de enfermos de cáncer

En los estudios descritos anteriormente, los inventores atenuaron la expresión de QSOX1 en células cultivadas y después aportaron al medio de cultivo enzima recombinante para dilucidar el papel de la QSOX1 extracelular. Mediante estas alteraciones, los inventores descubrieron que QSOX1 contribuye al ensamblaje de laminina en la MB y a la adhesión y migración celular. Para explorar adicionalmente el papel de QSOX1 en la progresión tumoral y el desarrollo de la metástasis, los inventores acudieron a un sistema experimental *ex vivo*: fibroblastos primarios de enfermos de cáncer de pulmón. Se purificaron fibroblastos explantados de tejido asociado a cáncer (FAC, fibroblastos asociados a cáncer) o tejido sano adyacente (FN, fibroblastos normales) y se mantuvieron como se ha descrito en la sección de "materiales y procedimientos experimentales" anterior. Un análisis de micromatrices de ARN de células de un paciente mostró que la transcripción de QSOX1 en la muestra de FAC era mayor que en la muestra de FN, y ambos tipos celulares respondieron a incubación con medio acondicionado procedente de tumor aumentando los niveles de transcripción de QSOX1 (datos no mostrados). El análisis de PCR en tiempo real para tres pacientes más mostró que FAC expresaron uniformemente mayores niveles de QSOX1 que FN (Figura 7B). El análisis de transferencia de western de estos fibroblastos *ex vivo* mostró que la secreción de QSOX1 se correlacionaba con la transcripción; FAC secretaron más QSOX1 que FN, y FN mostraron secreción potenciada después de la incubación con medio acondicionado de tumor.

La tinción inmunohistoquímica de secciones tumorales retiradas de enfermos de cáncer de mama confirmó las conclusiones de fibroblastos *ex vivo*. Mientras que la tinción de QSOX1 más prominente fue evidente en células epiteliales de los tumores, fibroblastos adyacentes a tumores mostraron tinción más intensa de QSOX1 que fibroblastos más distantes de los cultivos (Figuras 7C-D).

Control de ensamblaje de MB y migración de células tumorales mediante inhibición de QSOX1 extracelular

Los presentes hallazgos sugieren que la inhibición de QSOX1 puede ser una estrategia potente para controlar la composición de MB y de este modo el microambiente tumoral. Los presentes inventores desarrollaron por lo tanto anticuerpos monoclonales inhibidores contra QSOX1 (véase Ejemplo 2, posteriormente en el presente documento). Cuando estos anticuerpos se proporcionaron al medio de cultivo de fibroblastos WI-38 a medida que se acercaron a la confluencia, se observaron menos números de células en la monocapa de cultivo después de cuatro días en comparación con células no tratadas o células tratadas con un anticuerpo de control (Figuras 8A-K). Asimismo, se observó una tinción drásticamente disminuida de la cadena de laminina $\alpha 4$ en MB producida por células cultivadas en presencia del anticuerpo monoclonal de QSOX1 (como se describe en el Ejemplo 2 posterior). Finalmente, los ensayos de invasión organotípicos del tipo realizado en células tratadas con ARNip de QSOX1, como se ha descrito anteriormente, mostraron una reducción importante en la migración de células epiteliales a través de la capa de fibroblastos cuando esta última se produjo en presencia del inhibidor de QSOX1. Juntos estos resultados muestran que la inhibición de QSOX1 producida por células que expresan y secretan la enzima puede usarse para modular la composición y funcionalidad de la MB.

Ejemplo 2

Un anticuerpo inhibidor que se dirige al catalizador de disulfuro QSOX1 altera la formación de la matriz extracelular bloqueando la primera etapa en una transmisión de ditiol/disulfuro

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**5 Construcción de plásmidos**

La HsQSOX1 recombinante usada para inducir la producción de anticuerpos se ha descrito anteriormente [Alon *et al.*, (2012) *Nature* 488, 414-418], se optimizaron los codones de los genes sintéticos de ScFv y HsQSOX1 para producción de proteínas en *E. coli* (Genescript) entre los sitios NdeI y BamHI del vector pET-15b vector (Novagen). La construcción de fragmentos de HsQSOX1 amino terminales y carboxilo terminales se ha descrito previamente [Alon *et al.*, (2012) *Nature* 488, 414-418 y Alon *et al.*, (2010) *FEBS Lett.* 584, 1521-1525].

HsQSOX1₃₃₋₅₄₆

Se obtuvo un clon de ADNc de isoforma b de HsQSOX1 (ID 4447666) de ARNm de riñón humano de Invitrogen en el vector pCMV-SPORT6. La construcción deseada se amplificó mediante PCR con un cebador directo N' terminal (SEQ ID NO: 39) omitiendo la secuencia señal e incorporando un sitio de restricción de NdeI y un cebador inverso C' terminal (SEQ ID NO: 40) que incorpora un codón de terminación seguido de un sitio BamHI.

El producto de PCR y el vector de expresión pET15b se restringieron con NdeI y BamHI. El vector se trató adicionalmente con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP) para retirar fosfatos flanqueantes 5' y evitar el religamiento del vector. El marcador de His₆ y el sitio de escisión de trombina se reemplazaron con un marcador de His₆ conectado directamente con la proteína. Esta modificación se realizó mediante restricción con NcoI y NdeI seguido de CIP. Se hirvieron e hibridaron oligonucleótidos que codificaban His₆ con nucleótidos flanqueantes que crean los sitios finales escalonados compatibles con sitios de restricción NcoI y NdeI. Ya que estos oligonucleótidos no estaban restringidos sino más bien diseñados para imitar la restricción enzimática, se añadieron grupos fosfato enzimáticamente después de la hibridación y los cebadores se ligaron después con el vector.

El vector de expresión final codificó la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6.

25 Expresión y purificación de HsQSOX1 recombinante

Se expresó HsQSOX1 inyectada en ratones y se purificó como se ha descrito anteriormente [Alon *et al.*, (2012) *Nature* 488, 414-418], HsQSOX1 usado para otros fines se expresó y se purificó de forma similar, solamente se escindió su marcador His₆ amino terminal en una columna de Ni-NTA (GE Healthcare). La enzima eluida se intercambió en tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, imidazol 20 mM usando una columna de desalación PD-10 (GE Healthcare). Se añadió trombina (proteína 10 unidades/mg) y se incubó durante una noche a temperatura ambiente para la reacción de escisión. Se añadió PMSF a 1 mM para inhibir la trombina y la proteína se volvió a aplicar a una columna de Ni-NTA. Se realizó purificación adicional mediante cromatografía de exclusión por tamaño, en tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 0,5 mM.

La expresión y purificación de fragmentos de HsQSOX1 amino terminales y carboxilo terminales se llevaron a cabo como se ha descrito previamente [Alon *et al.*, (2012) *Nature* 488, 414-418 y Alon *et al.*, (2010) *FEBS Lett.* 584, 1521-1525].

Generación de anticuerpo monoclonal anti HsQSOX1 de ratón

Se generaron hibridomas por el método de Kohler-Milstein como se ha descrito previamente [Kohler G. y Milstein C. (1974) *Nature* 256, 495-497]. Se inmunizaron cinco ratones BALB/c (de 12 semanas de edad) con emulsión de HsQSOX1 y adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories) cuatro veces a intervalos de tres semanas. Se fusionaron células del bazo de ratones seleccionados con células de mieloma de NSO usando polietilenglicol como se ha descrito anteriormente [Galfre G. *et al.* (1977) *Nature* 266, 550- 552]. Se seleccionaron células de hibridoma mediante medio HAT. Se exploraron sobrenadantes de las células con respecto a unión e inhibición de HsQSOX1 (véase posteriormente). Se produjo MAb492.1 a gran escala con un biorreactor miniPERM (Sarstedt) en medio sin suero (DCCM).

Purificación de anticuerpos monoclonales

Se dializó el suero a través de una membrana de punto de corte de PM de 10.000 (Thermo) frente a tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7, y se cargó en una columna de proteína G (GE Healthcare). Los anticuerpos se eluyeron de la columna con tampón de glicina 100 mM, pH 3, e inmediatamente se neutralizaron con 10 % de tampón de Tris 1 M, pH 8.

Ensayo de unión de ELISA

Se recubrió una placa de 96 pocillos (Nunc) con 100 µl de HsQSOX1 recombinante 5 µg/ml, o BSA 5 % en solución

salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía tween 0,1 % (PBS-T) como un control, durante una h a 37 °C. Los pocillos se bloquearon con BSA 5 % en PBS-T a TA durante 1 h. Se añadieron diferentes clones y subclones anti HsQSOX1 de ratón a los pocillos durante 1 h a TA. Los pocillos se lavaron 3 veces con 300 µl de PBS-T. Se añadió anticuerpo policlonal de cabra anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en BSA 5 % a una dilución 1:2500 y se incubaron a TA durante 30 min. Los pocillos se lavaron 3 veces con 300 µl de PBS-T. La absorbancia se leyó a 630 nm en un lector de microplacas (TECAN) inmediatamente después de la adición de 100 µl de 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (Millipore).

Ensayo de inhibición de HsQSOX1

Se realizaron reacciones de 100 µl de volumen en placas de 96 pocillos (Nunc). Se usó RNasaA reducida y desnaturalizada (Sigma) como un sustrato modelo y se preparó de la siguiente manera. Se disolvieron diez mg de RNasa en 1 ml de tampón de fosfato 20 mM, pH 6,5, GuHCl 6 M, y DTT 100 mM, y se incubaron a 37 °C durante 1 h. La proteína se desaló en una columna PD-10 (GE Healthcare) equilibrada con DDW y su contenido de tiol se determinó mediante absorbancia de DTNB a 412 nm. Se incubaron HsQSOX1 recombinante 50 nM y se incubaron diversas concentraciones de clones de anticuerpos monoclonales durante 30 min a TA. Las reacciones se iniciaron con la adición de tioles de RNasa 200 µM y se detuvieron después de 25 min con DTNB 1 mM. La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de microplacas.

Secuenciación de regiones variables

Se extrajo ARN total de aproximadamente 11×10^6 células de hibridoma anti HsQSOX1 usando el mini kit RNeasy (Qiagen). Se transcribieron de forma inversa quinientos ng de ARN total en ADN de primera cadena usando cebador polidT y 20 unidades de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney. La región variable de la cadena ligera se amplificó usando cebadores degradados como se ha descrito previamente [Benhar I. y Reiter, Y. (2002) *Curr. Protoc. Immunol.*, Capítulo 10, unidad 10.19B], y la región variable de la cadena pesada se amplificó usando cebadores optimizados para clonación del repertorio de scFv como se ha descrito previamente [Zhou H. *et al.* (1994) *Nuc. Acids Res.* 22, 888-889]. Se extrajeron en gel productos de PCR de aproximadamente 300 pb con el kit de extracción de fragmentos de ADN de PCR/Gel HiYield (RBCBioscience), y se clonaron en el vector pGEM-T (Promega). Los insertos se secuenciaron usando cebadores de T7 y SP6 y se analizaron mediante la base de datos de IMG. Las secuencias se verificaron por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) [Alon *et al.*, (2012) *Nature* 488,414-418].

Cromatografía de exclusión por tamaño analítica

Se cargaron 100 µl de HsQSOX1 20 µM, sus fragmentos o MAb492.1 en una columna superdex 200 (GE HealthCare) equilibrada con tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7,4, NaCl 200 mM y EDTA 1 mM a un caudal de 1 ml/min. Los complejos (200 µl) de HsQSOX1, o sus fragmentos, con MAb492.1 se inyectaron después de 30 min de coincubación a TA.

Expresión, purificación y plegamiento de scFv

Se produjo ScFv492.1 en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) plysS cultivada en medio LB complementado con ampicilina 100 µg/ml y cloranfenicol 30 µg/ml. Las células transformadas se cultivaron a 37 °C y se llevó a cabo inducción mediante la adición de IPTG hasta una concentración de 0,5 mM cuando las células alcanzaron una densidad óptica de 0,5 a 595 nm. Después de la inducción, las células se cultivaron durante una noche a 25 °C. Las células se recogieron por centrifugación durante 30 min a 4000 rpm. Se suspendieron sedimentos celulares en tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, e imidazol 20 mM, complementados con inhibidores de proteasa. El lisado celular se centrifugó a $40.000 \times g$ durante 1 h. Los sedimentos se disolvieron en tampón de Tris 50 mM, pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM y triton X- 100 0,5 %, se sometieron a ultrasonidos 3 veces durante 30 s y se centrifugaron de nuevo durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el procedimiento de ultrasonidos y centrifugación se repitió 3 veces, la última vez sin triton X-100. Los sedimentos se disolvieron en tampón de Tris 50 mM, pH 7,8, GuHCl 6 M, β-mercaptoetanol 10 mM a 4 °C durante una noche. El scFv disuelto se purificó en una columna de Ni-NTA en condiciones desnaturalizantes (GuHCl 6 M), y se eluyó usando un gradiente de pH entre pH 6,9 y pH 3,8. Se realizó plegamiento como se ha descrito anteriormente [Kouhei, T. *et al.* (1998) *J. Immunol. Methods* 219, 119-129].

Determinación constante inhibidora

Un electrodo de oxígeno de tipo Clarke (Hansatech Instruments) se usó para supervisar cambios en las concentraciones de oxígeno disuelto como una medida de la actividad de HsQSOX1. Se ensayaron HsQSOX1 25 nM y diversas concentraciones (1-250 nM) de MAb492.1 purificado en tampón de fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, NaCl 65 mM, EDTA 1 mM. Las reacciones se iniciaron mediante inyección de ditioneitol (DTT) a una concentración de 200 µM en la cámara de reacción de electrodos. Se realizaron mediciones de diferentes concentraciones de MAb492.1 y se calcularon las pendientes iniciales. La reducción de fondo en la concentración de oxígeno debida a la presencia de DTT y MAb492.1 se midió tres veces, se promedió y se restó de las pendientes iniciales para obtener las velocidades de la actividad HsQSOX1 a diversas concentraciones de MAb492.1. Las relaciones de las tasas iniciales de HsQSOX1 en presencia y ausencia de inhibidor se representaron como una función de la concentración

de inhibidor. La curva resultante se ajustó a la siguiente ecuación como se ha descrito anteriormente [Morrison J.F. (1969) *Biophys. Biochem. Acta* 185, 269-286; Bieth J. G. (1995) *Methods in Enzymology* 248, 59-84] para obtener K_i para un inhibidor de unión estrecha:

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{1}{2[E_0]} (([E_0] - [I_0] - K_i) + \sqrt{([I_0] + K_i - [E_0])^2 + 4K_i[E_0]})$$

- 5 Donde v_0 es la velocidad de reacción en ausencia de MAb492.1, v_i es la velocidad en presencia de diferentes concentraciones de MAb492.1, $[E_0]$ es la concentración de enzimas total (25 nM), $[I_0]$ es la concentración de MAb492.1 total, y K_i es la constante inhibidora para determinar.

La constante inhibidora de scFv492.1 se calculó a partir del valor de CI_{50} obtenido por el ensayo colorimétrico basado en la oxidación de rdRNasa, usando la ecuación para inhibición competitiva clásica: $K_i = CI_{50} / (1 + [S]_0 / K_m)$.

- 10 Donde $[S]_0$ es la concentración de sustrato inicial y K_m es la constante de Michaelis de HsQSOX1 para rdRNasa, que es $320 \pm 35 \mu M$.

Purificación y cristalización del complejo de MAb492.1 Fab - HsQSOX1_{Trx}

- El MAb492.1 purificado concentrado hasta 1,5 mg/ml en PBS se digirió a 37 °C usando papaína activada en una relación de papaína:MAb492.1 1:20. Se disolvió papaína (Sigma) en PBS, EDTA 20 mM y se activó con cisteína 20 mM. La digestión se detuvo después de cuatro h usando leupeptina como un inhibidor, y el anticuerpo digerido se dializó frente a PBS, pH 8. El fragmento Fab de MAb492.1 (Fab492.1) se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño seguido de purificación de proteína G. El Fab492.1 purificado se incubó durante 1 h a 4 °C con un exceso doble de HsQSOX1_{Trx}, y el complejo se aisló usando cromatografía de exclusión por tamaño a una concentración de 11 mg/ml. Se cultivaron cristales por difusión de vapor de gota colgante a 293 K sobre una solución de pocillo que contenía polietilenglicol (PEG) de 4 kD 19 % p/v, fosfato de amonio dibásico 0,4 M. Los cristales se transfirieron a una solución que contenía PEG de 4 kD 20 % p/v, glicerol 25 %, fosfato de amonio dibásico 0,35 M y se congelaron instantáneamente.

Recopilación de datos

- 25 Se recogieron datos de difracción a 100 K, en un generador RU-H3R (Rigaku) equipado con un sistema de placas de imágenes RaxisIV++ y espejos Osmic. Los datos se recogieron a una resolución de 2,7 Å de un cristal de grupo espacial P6₁ con dimensiones de células unitarias $a=b=209,311$ Å, $c=55,265$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$. Los datos se procesaron y escalaron usando DENZO y SCALEPACK.

Solución estructural

- 30 La estructura se determinó mediante reemplazo molecular (RM) usando Phaser. En primer lugar, la estructura de HsQSOX_{Trx} se usó para la búsqueda y rotación adecuada y se encontraron soluciones de traducción. Después se usó la región constante de una estructura de Fab con 75 % de identidad de secuencia (código de PDB 3OKD), como un modelo de búsqueda y, finalmente, se buscó la región variable sin los bucles de CDR del mismo modelo de Fab. Se realizó refinamiento usando CNS y reconstrucción de modelo usando Coot. Se realizó validación de las estructuras usando MOLPROBITY, según la cual no hubo ningún valor atípico de Ramachandran y el modelo estructural se cualificó en el 95 % superior en su intervalo de resolución.

Ensayo de invasión celular

- 40 Se sembraron fibroblastos WI-38 (Coriell) en las cámaras superiores de placas BD BioCoat de 24 pocillos con insertos de membrana de un tamaño de poro de 8,0 μm y se permitió que crecieran durante 4 días hasta alcanzar la confluencia en presencia de diferentes concentraciones de MAb492.1 o anti β actina (anticuerpo de control). El cuarto día, 5×10^4 células epiteliales de cáncer de pulmón H460, premarcadas con el marcador de seguimiento celular CSFE (Molecular Probes) según las instrucciones del fabricante, se superpusieron sobre los fibroblastos. La cámara interna se cargó con medio esencial mínimo (MEM) sin sueros y la cámara externa con MEM que contenía suero bovino fetal 10 %. Se permitió que las células H460 marcadas migraran a través de la membrana durante 24 h a 37 °C. Las células no invasoras se rasparon manualmente de la cara superior de la membrana y se descartaron y las células invasoras en la cara inferior se fijaron en formaldehído 3,7 %, se capturaron imágenes y se cuantificaron.

Inhibición de HsQSOX1 in vivo en un experimento de xenoinjerto

- Se cultivaron células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231-RFP como se ha descrito previamente [Goldshaid, L. *et al.* (2010) *Breast Cancer Research* 12:R29]. Se cultivaron fibroblastos de pulmón GFP-hTert-WI-38 en medio MEM complementado con FCS 15 %, L-glutamina, Na-piruvato y antibióticos.
- 50 Se separaron veintiséis ratones desnudos CD-1, hembra, de seis semanas de edad, en seis grupos (véase Tabla 6, posteriormente en el presente documento), se alojaron y se manipularon según las instrucciones de cuidado y uso

animal institucional. El procedimiento experimental fue aprobado por el comité de uso y cuidado animal institucional en el Instituto de Ciencia Weizmann (Rehovot, Israel).

Para iniciar el experimento, se inyectó en tres grupos de ratones en el pániculo adiposo mamario inferior izquierdo una mezcla de 10^7 fibroblastos recogidos y 10^6 células tumorales recogidas en 50 μ l de PBS. Se inyectó en otros dos grupos de forma similar solamente células tumorales. Cuatro días después de la inyección, se inició el tratamiento con MAb492.1. Se prepararon diversas dosificaciones de MAb492.1 (véase Tabla 6, posteriormente en el presente documento) en 200 μ l de PBS y se administraron dos veces por semana por vía intravenosa (IV). Una semana después de la inyección de células se capturaron imágenes de los ratones en el sistema de captura de imágenes ópticas *In Vivo* (IVISR100/XFO-12, Xenogen Corp., Alameda, CA, Estados Unidos), para verificar la formación de tumores localizados, usando bioluminiscencia de luciferina. Antes de capturar imágenes, se proporcionó a los ratones una inyección intraperitoneal (IP) de 1,5 mg de D-luciferina y se anestesiaron mediante inyección de una mezcla de 50 μ l de ketamina:xilacina 85:15. Cinco semanas después de la inyección de células los ratones se anestesiaron como se ha descrito, y se capturaron imágenes en un microscopio fluorescente para identificar metástasis en los ganglios linfáticos poplíteos y axilares. Los animales se sacrificaron con pentobarbital cinco semanas después del comienzo del experimento.

Ensayo de especificidad de MAb492.1

Las enzimas QSOX1 de mamífero MmQSOX1 (tipo silvestre y los tres mutantes), CpQSOX1 y RnQSOX1 se clonaron, expresaron y purificaron como para HsQSOX1 (como se ha descrito anteriormente). Las actividades de estas enzimas a 50 nM se evaluaron usando un ensayo de consumo de oxígeno (como se ha descrito anteriormente) y DTT 200 μ M como un sustrato. La actividad en presencia de MAb492.1 250 nM o 1 μ M también se midió, y se comparó con la actividad en ausencia de MAb492.1.

Purificación y cristalización de MmQSOX1_{Trx}

MmQSOX1_{Trx} se clonó y expresó como para HsQSOX1. La purificación se realizó de forma similar a purificación de HsQSOX1, excepto que la cromatografía de Ni-NTA se realizó en tampón de Tris 20 mM, pH 8,5, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM para unión e imidazol 250 mM para elución. La enzima eluida se cargó inmediatamente en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño y se purificó en tampón de Tris 10 mM, pH 8,5, NaCl 100 mM. Se cultivaron cristales por difusión de vapor de gota colgante a 293 K sobre una solución de pocillo que contenía PEG monometil éter de 2 kD 7 % p/v, acetato de sodio 0,1 M pH 4,6, DMSO 5 %. La concentración de proteína en la gota fue de 13 mg/ml y se complementó con 1 unidad de trombina por cada 0,4 mg de proteína. Los cristales se transfirieron a una solución que contenía PEG monometil éter de 2 kD 15 % p/v, glicerol 25 %, acetato de sodio 0,1 M pH 4,6, y se congeló instantáneamente.

Recogida de datos y solución estructural de MmQSOX1_{Trx}

Se recogieron datos de difracción a 100 K en un generador RU-H3R (Rigaku) equipado con un sistema de placas de imágenes RaxisIV++ y espejos Osmic. Los datos se recogieron a una resolución de 2,05 Å de un cristal de grupo espacial P2₁ con dimensiones de células unitarias a=b=42,48 Å, b=116,38 Å, c=50,02 Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 103,1^\circ$. Los datos se procesaron y escalaron usando DENZO y SCALEPACK. La estructura de MmQSOX1_{Trx} se determinó mediante RM usando la estructura de HsQSOX1_{Trx} como un modelo de búsqueda. Se realizó refinamiento usando CNS y reconstrucción de modelo usando Coot. Se realizó validación de las estructuras usando MOLPROBITY, según la cual no hubo ningún valor atípico de Ramachandran y el modelo estructural se cualificó en el 70 % superior en su intervalo de resolución.

RESULTADOS

Selección de clones de anticuerpos que se unen con e inhiben HsQSOX1

QSOX1 humana recombinante (denominada en lo sucesivo en la presente memoria HsQSOX1) producida en bacterias [Alon *et al.*, (2012) *Nature* 488, 414-418] se usó para inducir la producción de anticuerpos en ratones, y se generaron hibridomas. Se exploraron sobrenadantes de hibridoma con respecto a unión de HsQSOX1 usando un ensayo de ELISA convencional. De aproximadamente 500 clones que se exploraron, se eligieron los cinco con más unión para subclonación. Cada uno de los subclones se ensayó con respecto a unión mediante ELISA. Se eligieron aproximadamente 30 subclones para ensayos de inhibición.

La inhibición se ensayó usando un ensayo de actividad sulfhidrilo oxidasa *in vitro*. Para evitar la reducción de anticuerpos, se eligió inicialmente un sustrato reductor leve, RNasa reducida y desnaturalizada (rdRNasa). La rdRNasa se sometió a oxidación mediante HsQSOX1 en presencia de altas concentraciones de diversos subclones de anticuerpos purificados y se cuantificaron grupos tiol restantes después de un periodo de tiempo por reacción con 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB). La alta reactividad de DTNB indicó la presencia de una alta concentración de grupos tiol en solución al final de la reacción, que se interpretó que indicaba la inhibición de HsQSOX1. Los subclones de anticuerpo procedentes de un clon particular mostraron buena inhibición de HsQSOX1 en este ensayo. Un subclón, MAb492.1, clasificado del isotipo de IgG1, se seleccionó para estudio adicional.

Determinación de constante inhibidora

La inhibición de HsQSOX1 se ensayó a diversas concentraciones de MAb492.1. Cuando el ensayo de DTNB se empleó en primer lugar con HsQSOX1 250 nM, se observó una CI_{50} de 240+30 nM. Ya que este valor corresponde estrechamente a la concentración de enzima en el ensayo, sugiere unión casi estequiométrica de HsQSOX1 mediante MAb492.1 e inhibición eficaz en las condiciones del ensayo. Cuando la concentración de HsQSOX1 se redujo hasta 50 nM, se observó una CI_{50} de 60 ± 10 nM (Figura 15A). De nuevo, este valor es aproximadamente igual a la concentración de enzima, que apoya adicionalmente la unión estrecha e inhibición eficaz. Se exploraron concentraciones de enzima y anticuerpo menores usando un ensayo de consumo de oxígeno, que supervisa la tasa de reducción de oxígeno disuelto a medida que se reduce mediante HsQSOX1 a peróxido de hidrógeno. Este ensayo permite la determinación directa de velocidades iniciales y no solamente el grado de actividad. Aunque se usó un agente reductor fuerte, ditioneitol (DTT), como un donante de electrones en este experimento, se eligió una concentración de DTT que conserva integridad de anticuerpos (Figura 15C). Se calcularon tasas de reacción de experimentos usando HsQSOX1 25 nM y diversas concentraciones de MAb492.1. El ajuste de los resultados a un modelo para un inhibidor de unión estrecha produjo una constante inhibidora aparente de $1,0 \pm 0,3$ nM (Figura 15B). MAb492.1 se une con HsQSOX1 en el dominio Trx1 amino terminal (Figura 1A), y evita el acceso al sustrato del sitio activo del motivo de dicisteína redox activo, lo que indica que MAb492.1 es un inhibidor competitivo. Las tasas de reacción en presencia de inhibidores competitivos típicamente varían con la concentración de sustrato, y por lo tanto la K_i aparente no representa necesariamente la K_i real. No obstante, la inhibición de MAb492.1 fue independiente de la concentración de sustrato (Figura 15D), lo que implica que la disociación del complejo de MAb492.1-HsQSOX1 es lenta en relación con el plazo de tiempo del experimento y no es inducida por sustrato. En estas condiciones, la constante inhibidora aparente se convierte en la constante inhibidora real.

Determinación del sitio de unión a anticuerpo en HsQSOX1

Se ha observado previamente que la proteólisis limitada de QSOX aviar produce dos fragmentos estables. Se realizaron observaciones similares para enzimas QSOX1 de mamíferos, y las estructuras de los dos fragmentos de QSOX1 humana, HsQSOX1_{Trx} y HsQSOX1_{ErV} (Figuras 1A-B), se han determinado previamente usando cristalografía de rayos X [Alon A. *et al.* (2010) *FEBS Lett.* 584, 1521-1525; Alon *et al.* (2012) *Nature* 488, 414-418]. Para determinar si el sitio de unión para MAb492.1 reside en HsQSOX1_{Trx} o HsQSOX1_{ErV}, los inventores produjeron cada uno de los dos fragmentos en bacterias y realizaron dos ensayos de unión complementaria. En el primer ensayo, la unión de MAb492.1 con HsQSOX1_{Trx} o HsQSOX1_{ErV} se comparó con la unión con HsQSOX1 de longitud completa mediante ELISA. HsQSOX1_{Trx}, que contiene los dominios Trx1 y Trx2, se unió con MAb492.1 en la misma medida que HsQSOX1 de longitud completa (Figura 16A). HsQSOX1_{ErV}, por otro lado, no se unió con MAb492.1 a ninguna concentración ensayada. El segundo ensayo de unión usó cromatografía de exclusión por tamaño. Los perfiles de migración de HsQSOX1, HsQSOX1_{Trx}, y HsQSOX1_{ErV} se midieron en presencia y ausencia de MAb492.1. Los perfiles de migración tanto de HsQSOX1 como de HsQSOX1_{Trx} se desplazaron después de la incubación con MAb492.1, pero la migración de HsQSOX1_{ErV} no se vio afectada (Figuras 16B-D), lo que confirma la conclusión de que MAb492.1 se une con la parte amino terminal de HsQSOX1.

Secuenciación del clon de anticuerpo MAb492.1 y construcción de un fragmento variable monocatenario

La secuencia de MAb492.1 se determinó mediante transcripción inversa y PCR del clon de hibridoma. La región variable de la cadena ligera se amplificó con un conjunto relativamente pequeño de cebadores degradados. Por el contrario, la región variable de la cadena pesada no pudo amplificarse usando una mezcla de cebadores comparable, lo que es coherente con la dificultad relativa de la amplificación de cadenas pesadas observadas previamente. Por lo tanto, la cadena pesada de MAb492.1 se amplificó usando cebadores optimizados para clonación de repertorio de scFv de ratón. Cada fragmento amplificado se clonó en el vector pGEM-T Easy y se secuenció. Estas secuencias (véase Tabla 3, posteriormente) se analizaron usando herramientas asociadas con la base de datos ImMunoGeneTics (IMGT) como se ha descrito previamente [Lefranc M. P. *et al.* (2004) *Nuc. Acids Res.* 33, 593-597] y se confirmó que eran secuencias reordenadas de forma productiva. Las regiones variables mostraron más de 94 % de identidad con entradas de la base de datos para regiones variables de anticuerpos producidos en ratones. Las secuencias también se confirmaron mediante espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS) de MAb492.1 purificado (véase Tabla 3, a continuación).

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de región variable de MAb492.1

Secuencia	Cadena
DVVMTQTHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKSGQSPKLLIHS AS YRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLAVYYCQQHYSIPLTFGAGTKL ELK (SEQ ID NO: 7)	Ligera

Secuencia				Cadena
QVQLKQSGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTGYGVNWVRQSPGKGLEWLGMIWGDGRTDYKSALKSRLSITKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARYFCASDYYGSGSFAYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 8)				Pesada
Mr(calc)	Mr(exp)	Péptido	Enzima	Cadena
2037,9612	2037,9634	DVVMTQTHKFMSTSVGDR (SEQ ID NO: 9)	tripsina	Ligera
2742,3140	2742,3148	DVVMTQTHKFMSTSVGDRVSTICK (SEQ ID NO: 10)		
1686,8069	1686,8076	FMSTSVGDRVSITCK (SEQ ID NO: 11)		
1680,8107	1680,8110	ASQDVSTAVAWYQQK (SEQ ID NO: 12)		
1058,5873	1058,5880	LLIHSASYR (SEQ ID NO: 13)	quimotripsina/Asp-N	
1766,8332	1766,8344	DVVMTQTHKFMSTSVG (SEQ ID NO: 14)		
1841,8612	1841,8642	MSTSVGDRVSITCKASQ (SEQ ID NO: 15)		
1870,9901	1870,9938	QQKSGQSPKLLIHSASY (SEQ ID NO: 16)		
1075,4459	1075,4468	TGSGSGTDFTF (SEQ ID NO: 17)		
1203,6863	1203,6886	SIPLTFGAGTKL (SEQ ID NO: 18)	quimotripsina/Asp-N	
995,4713	995,4732	SLTGYGVNW (SEQ ID NO: 19)		
1711,8794	1711,8808	GVNWVRQSPGKGLEW (SEQ ID NO: 20)		
1179,6611	1179,6637	DYKSALKSRL (SEQ ID NO: 21)		
1837,0057	1837,0096	KSRLSITKDNSKSQVF (SEQ ID NO: 22)	tripsina	
1985,9782	1985,9824	QSPGKGLEWLGMIWGDGR (SEQ ID NO: 23)		
1488,7184	1488,7206	GLEWLGMIWGDGR (SEQ ID NO: 24)		
1995,9513	1995,9510	GLEWLGMIWGDGRTDYK (SEQ ID NO: 25)		
1250,5561	1250,5576	MNSLQTDDTAR (SEQ ID NO: 26)		

Se obtuvieron secuencias de cadena ligera y pesada de MAb492.1 como se ha descrito en la sección de 'Materiales y procedimientos experimentales' anterior. MAb492.1 después del tratamiento con DTT presentó dos bandas en SDS-PAGE, una banda superior correspondiente a la cadena pesada y una banda inferior correspondiente a la cadena ligera. Las bandas se digirieron en gel con tripsina o quimotripsina y AspN. La tabla presenta péptidos representativos detectados por LC-MS/MS al menos una vez, después de escisión con tripsina o con quimotripsina y AspN.

Las regiones variables que se identificaron a partir de MAb492.1 se usaron para construir un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFv). El scFv se compuso del dominio variable de cadena pesada en el extremo amino, el dominio variable de cadena ligera en el extremo carboxilo y un enlazador de [Gly4Ser]3 que los conecta. La secuencia que codificaba el scFv se optimizó para expresión en *E. coli* y se clonó en un vector de expresión con un marcador de His₆escindible por trombina en el extremo terminal. El scFv purificado, designado scFv492.1, se obtuvo de cuerpos de inclusión después de producción en bacterias y se replegó para obtener material funcional. scFv492.1

replegado se ensayó en el ensayo colorimétrico basado en oxidación de rdRNasa y se mostró que inhibía HsQSOX1 50 nM con una CI_{50} de 250 ± 30 nM (Figura 17). Podría calcularse una constante inhibidora de $130+20$ nM directamente a partir de este valor de CI_{50} , ya que scFv492.1 es un inhibidor competitivo. scFv492.1 más probablemente se une con HsQSOX1 en el mismo sitio que MAb492.1, evitando la oxidación del sustrato, pero no puede considerarse un inhibidor de unión estrecha debido a que es necesario inhibir HsQSOX1 en las mismas condiciones experimentales.

Determinación del sitio de unión a anticuerpo en HsQSOX1

Un fragmento Fab procedente de MAb492.1 se preparó para cocrystalización con HsQSOX1_{Trx}. El Fab se produjo de MAb492.1 purificado mediante digestión con papaína. La capacidad del Fab para unirse con e inhibir HsQSOX1 se ensayó mediante un ensayo colorimétrico basándose en oxidación de rdRNasa. Se descubrió que Fab492.1 inhibía HsQSOX1 50 nM con una CI_{50} de 100 ± 20 nM (Figura 18), el doble del valor de CI_{50} hallado para MAb492.1 de longitud completa. La avidez de MAb492.1 fue el doble de la avidez del fragmento Fab, lo que indica que Fab492.1 mantiene la conducta de unión estrecha.

La estructura del complejo HsQSOX1_{Trx}-Fab492.1 se determinó hasta una resolución de 2,7 Å (Tabla 4, posteriormente). La estructura cristalina reveló que Fab492.1 reconoce el dominio amino terminal, Trxl (Figura 19A). En particular, Fab492.1 se une con el sitio activo, internando el motivo CXXC y un área de superficie grande que lo rodea. Se calculó que el área de interfaz era de $948,7 \text{ Å}^2$. Las seis CDR participan en la unión (Figura 19B). La cadena pesada es responsable de la mayoría de las interacciones (Figura 20B y tabla 5, posteriormente), incluyendo internamiento del motivo CXXC usando las tres CDR. La cadena ligera, responsable del 40 % de la interfaz HsQSOX1_{Trx} - Fab492.1 ($407,6 \text{ Å}^2$), se une con un área de superficie grande lejos del sitio activo (Figura 19C), en el bucle que conecta con la lámina beta con la hélice c terminal del dominio Trxl. Esta región crea una superficie continua con la superficie unida con la cadena pesada que contiene el sitio activo. La cadena ligera se une con Trxl mediante interacciones hidrófobas y una red de enlaces de hidrógeno (Figura 20A y tabla 5, posteriormente), supuestamente estabilizando la orientación de la cadena pesada en relación con el sitio activo. La estructura de HsQSOX1_{Trx} en complejo con Fab492.1 mostró pocas desviaciones de la estructura de HsQSOX1_{Trx} no en complejo, lo que indica que MAb492.1 no altera la estructura de HsQSOX1_{Trx}, sino que simplemente bloquea el acceso del sustrato al sitio activo.

Tabla 4: Recopilación de datos y estadística de refinamiento

Recopilación de datos	
Grupo espacial	P6 ₁
Dimensiones celulares	
a, b, c (Å)	209,311, 209,311, 55,265
α, β, γ (°)	90, 90, 120
Longitud de onda (Å)	1,5418
Resolución (Å)	50-2,7 (2,75-2,70)
R_{sim}^a	9,2 (36,3)
I/σ	14,35 (1,96)
Compleción	97,3 (91,9)
Redundancia	5,1 (3,8)
Refinamiento	
Resolución (Å)	50-2,70
N.º de reflejos/ensayo	34719/2622
$R_{\text{trabajo}} / R_{\text{libre}}^b$	20,0/23,5
N.º de átomos	
Proteína	5155
Fosfato	10
Agua	350
Desviaciones de r.m.s	
Longitudes de enlace (Å)	0,006
Ángulos de enlace (°)	1,4

Los valores entre paréntesis son para la capa de mayor resolución

^a $R_{\text{sim}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, donde $I_i(hkl)$ es la intensidad observada y $\langle I(hkl) \rangle$ es la intensidad promedio para i observaciones.

^b $R_{\text{trabajo}}, R_{\text{libre}} = \Sigma|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| / \Sigma|F_{\text{obs}}|$, donde F_{obs} y F_{calc} son los factores de estructura observados y calculados, respectivamente. Se excluyó un conjunto de reflejos (6,8 %) del refinamiento y se usó para calcular R_{libre} .

Tabla 5: Interacciones de Fab492.1 - HsQSOX1_{Trx}

Fab492.1		HsQSOX1 _{Trx}		
CDR	Resto	Resto	Tipo de interacción	Distancia
L1	Ser30	Val135	Enlace de hidrógeno	2,9 Å
L1	Ala32	Val135	Hidrófobo	<5 Å
Armazón 3 (cadena ligera)	Tyr53	Pro137	Hidrófobo	<5 Å
Armazón 3 (cadena ligera)	Tyr53	Arg149	catión - π	4,86 Å
L3	Tyr92	Arg122	catión - π	4 Å
L3	Tyr92	Arg122	Enlace de hidrógeno	3,2 Å
L3	Tyr92	Ser132	Enlace de hidrógeno	3,4 Å
L3	Tyr92	Gly133	Enlace de hidrógeno	2,6 Å
L3	Tyr92	Val135	Hidrófobo	<5 Å
L3	Ile94	Asn114	Enlaces de hidrógeno	2,6 Å, 3,5 Å
L3	Ile94	Pro116	Hidrófobo	<5 Å
L3	Leu96	Pro116	Hidrófobo	<5 Å
H1	Gly31	Gly71	Enlace de hidrógeno	2,9 Å
H2	Trp52	Trp69	Hidrófobo	<5 Å
H2	Trp52	Trp69	Aromático - aromático	6,9 Å
H2	Trp52	Phe118	Hidrófobo	<5 Å
H2	Trp52	Phe118	Aromático - aromático	5 Å
Armazón 3 (cadena pesada)	Asp58	Arg111	Enlace salino	6,9 Å
H3	Asp98	His72	Enlace salino	6,9 Å
H3	Tyr99	Ala139	Hidrófobo	<5 Å
H3	Tyr100	His72	Enlace de hidrógeno	3,4 Å
H3	Tyr100	Phe76	Hidrófobo	<5 Å
H3	Tyr100	Phe76	Aromático - aromático	6,1 Å
H3	Tyr100	Pro119	Hidrófobo	<5 Å
H3	Tyr100	Val138	Hidrófobo	<5 Å
H3	Tyr100	Ala139	Hidrófobo	<5 Å
H3	Gly101	Thr120	Enlace de hidrógeno	3,4 Å

Inhibición de HsQSOX1 en ensayos de cocultivo para migración de células tumorales a través del estroma

- 5 El MAb492.1 se ensayó con respecto a su capacidad para inhibir la producción de fibroblastos de una capa de MEC que apoya la invasión de células tumorales. Se realizó un ensayo de invasión organotípico permitiendo en primer lugar que los fibroblastos WI-38 se hagan confluentes y acumulen MEC durante cuatro días en presencia de diferentes concentraciones de MAb492.1. Para control, se añadió un anticuerpo para β actina. Después, se colocaron células tumorales de pulmón H460 marcadas con fluorescencia en los fibroblastos. Después de 24 horas, se contaron las células que habían penetrado en la capa de fibroblastos y la MEC asociada en cada muestra (Figuras 21A-0 y 22). Las muestras tratadas con MAb492.1 250 nM y 500 nM mostraron menos invasión de células tumorales que la muestra no tratada, lo que demuestra que MAb492.1 puede bloquear la migración de células tumorales en cultivo celular. Las muestras tratadas con MAb492.1 50 nM no mostraron una diferencia en la invasión de células tumorales, lo que indica que la concentración de HsQSOX1 en el ensayo fue de aproximadamente 50 nM o menor, basándose en la constante inhibidora determinada.

Inhibición de HsQSOX1 in vivo en un experimento de xenoinjerto para prevención o reducción de la metástasis

- 20 Para demostrar que la inhibición de HsQSOX1 *in vivo* puede modular la composición de la MB y puede prevenir, ralentizar o eliminar la migración de células tumorales, es necesario un modelo animal que incorpora tanto células tumorales como fibroblastos asociados a tumor. MAb492.1 muestra gran especificidad para HsQSOX1 (datos no

mostrados), eliminando la opción de estudiar la inhibición de QSOX1 *in vivo* cuando se secreta QSOX1 de fibroblastos animales. Para superar este obstáculo, se realizó un ensayo de xenoinjerto que implica el trasplante de células vivas de una especie a otra, en ratones desnudos (ratones con un sistema inmunitario inhibido debido a un timo ausente o defectuoso). Se proporcionaron diferentes composiciones de inyecciones celulares y diferentes tratamientos (resumidos en la Tabla 6, posteriormente en el presente documento) a seis grupos que comprendían 3-5 ratones desnudos hembra cada uno.

Se inyectó una mezcla de células de cáncer de mama humano junto con fibroblastos humanos en el pániculo adiposo mamario de tres grupos de ratones. Dos grupos recibieron solamente células de cáncer de mama, para confirmar que el crecimiento metastásico es apoyado por HsQSOX1 secretado y no por HsQSOX1 intracelular localizado en el tumor en sí mismo. No se trasplanta al último grupo ninguna célula humana, para ensayar el efecto de MAb492.1 en animales sanos. Los fibroblastos inmortalizados humanos usados fueron fibroblastos GFP-hTERT-WI-38. Se usaron células de cáncer de mama MDA-MB-231 que contenían proteína roja fluorescente (RFP) y luciferasa como las células tumorales. La expresión de luciferasa, que actúa en luciferina para generar luz, permite supervisar la migración de células tumorales mediante captura de imágenes de bioluminiscencia durante el transcurso del experimento. Es importante destacar que, la captura de imágenes de bioluminiscencia tiene grandes relaciones de señal con respecto a ruido en tejidos, y la señal emitida puede detectarse en animales vivos de forma no invasiva. La formación de un tumor localizado en el pániculo adiposo mamario después de una semana se verificó usando bioluminiscencia de luciferina (Figura 23). Cuatro días después de la inoculación de células, varios grupos de ratones (véase Tabla 6, posteriormente en el presente documento) comenzaron a recibir un tratamiento de MAb492.1 en diferentes dosificaciones. Cinco semanas después de la inyección de células, se evaluó la progresión de la metástasis a los ganglios linfáticos axilares y poplíteos mediante la fluorescencia emitida de las células cancerosas (véase Tabla 6, posteriormente en el presente documento).

Los animales restantes presentaron dos tendencias principales. En primer lugar, los animales que recibieron células cancerosas MDA-MB-231 junto con fibroblastos humanos desarrollaron tumores mayores que producían más metástasis que los animales que recibieron solamente células MDA-MB-231. Esta observación reforzó la idea ya establecida de que componentes del estroma secretados de fibroblastos asociados al tumor son fundamentales para progresión de cáncer. El segundo efecto observado fue que entre los animales que recibieron tanto fibroblastos como células MDA-MB-231, los tratados con la dosificación de MAb492.1 mayor (es decir 30 mg/kg) tuvieron menos infiltraciones de ganglios linfáticos por células cancerosas en comparación con animales que no recibieron tratamiento o una dosificación menor (véase Tabla 7, posteriormente en el presente documento). Las dosificaciones y los regímenes de dosificación de MAb492.1 pueden optimizarse adicionalmente.

Es importante destacar que, los tres animales que recibieron inyecciones de MAb492.1 pero no células no mostraron un comportamiento anómalo durante el experimento, y no se bio ninguna indicación de inflamación en la autopsia. Como se esperaba, MAb492.1 no tuvo ningún efecto secundario observable.

Tabla 6: experimento de xenoinjertos

Tipo de células inyectado	Tratamiento	Tamaño y propiedades tumorales (vistos de forma externa)	Localización de metástasis (según la captura de imágenes de RFP)
Células de cáncer de mama humano y fibroblastos humanos inmortalizados	MAb492.1 5 mg/kg dos veces a la semana IV	Enorme, con gangrena	Las células están ampliamente expandidas, tumor localizado no formado
		Medio	En los cuatro ganglios linfáticos
		Enorme, con gangrena	En el ganglio linfático poplíteo colateral
		No visible	Ninguno
		Enorme, con gangrena	En el ganglio linfático poplíteo colateral y en el ganglio linfático axilar, en el mismo lado del tumor
Células de cáncer de mama humano y fibroblastos humanos inmortalizados	MAb492.1 30 mg/kg dos veces a la semana IV	Medio	En el ganglio linfático poplíteo cerca del tumor
		Grande y rojo	En el ganglio linfático poplíteo cerca del tumor
		Grande y rojo	Las células están ampliamente expandidas, tumor localizado no

Tipo de células inyectado	Tratamiento	Tamaño y propiedades tumorales (vistos de forma externa)	Localización de metástasis (según la captura de imágenes de RFP)
			formado
		Medio	En el ganglio linfático poplíteo cerca del tumor
Células de cáncer de mama humano y fibroblastos humanos inmortalizados	ninguno	Enorme, con gangrena	En el ganglio linfático poplíteo colateral
		No visible	Ninguno
		Medio, cerca de la cola	Las células están ampliamente expandidas, tumor localizado no formado
		grande	En el ganglio linfático poplíteo colateral
Células de cáncer de mama humano	ninguno	pequeño	Ninguno
		Enorme + gangrena	En el ganglio linfático poplíteo cerca del tumor
		Pequeño	Ninguno
		grande	Las células están ampliamente expandidas, tumor localizado no formado
		No visible	Ninguno
Células de cáncer de mama humano	MAb492.1 30 mg/kg dos veces a la semana IV	Grande	Las células están ampliamente expandidas, tumor localizado no formado
		medio	Las células están ampliamente expandidas, tumor localizado no formado
		No visible	Ninguno
		Grande y rojo	En los ganglios linfáticos poplíteos y axilares,
			en el mismo lado del tumor
		Grande + gangrena Cola con gangrena	Las células están ampliamente expandidas, tumor localizado no formado
Sin células humanas	MAb492.1 30 mg/kg dos veces a la semana IV	Ninguno	Ninguno
		Ninguno	Ninguno
		Ninguno	Ninguno

Tabla 7: compendio de experimento de xenoinjertos

Tipo de células inyectado	Tratamiento	Número de animales incluidos	% de animales con metástasis en ganglios linfáticos distales
Células de cáncer de mama humano y fibroblastos humanos inmortalizados	MAb492.1 5 mg/kg dos veces a la semana IV	3	100 %
Células de cáncer de mama humano y fibroblastos humanos inmortalizados	MAb492.1 30 mg/kg dos veces a la semana IV	3	0 %

Tipo de células inyectado	Tratamiento	Número de animales incluidos	% de animales con metástasis en ganglios linfáticos distales
Células de cáncer de mama humano y fibroblastos humanos inmortalizados	ninguno	3	66 %
Células de cáncer de mama humano	ninguno	3	0 %
Células de cáncer de mama humano	MAb492.1 30 mg/kg dos veces a la semana IV	1	0 %

Especificidad de MAb492.1 por HsQSOX1

La actividad inhibidora de MAb492.1 se ensayó en otras enzimas QSOX1 de mamífero para examinar su especificidad. La QSOX1 de *Mus musculus* recombinante, MmQSOX1, tiene una identidad de secuencia de 79 % con la HsQSOX1 recombinante. Los ensayos de consumo de oxígeno mostraron que MAb492.1 no tuvo ningún efecto en MmQSOX1, incluso a concentraciones micromolares (Figura 24). QSOX1 de *Rattus norvegicus*, RnQSOX1, y de *Cavia porcellus*, CpQSOX1, tienen ambas identidades de secuencia de 79 % con HsQSOX1 y su actividad no se vio tampoco influida por MAb492.1 (Figura 24). El alineamiento de la secuencia del dominio TrxI de HsQSOX1 con la región correspondiente de otras enzimas QSOX1 muestra que las secuencias próximas a los motivos redox activos de CGHC son idénticas (Figura 25). Sin embargo, la región de HsQSOX1 unida a la cadena ligera de anticuerpo y la secuencia de CDR H3 (HsQSOX1₁₀₆₋₁₅₂) revela algunas diferencias en comparación con otras enzimas QSOX1 (Figura 25). En particular, Pro 116, que se ajusta bien en una hendidura entre cadenas laterales de CDR L3 de MAb492.1, se reemplaza con alanina en otras enzimas QSOX1 de mamífero. Otra región que muestra diferencias en la secuencia es V135-V138 de HsQSOX1, correspondiente a Thr₁₃₈-Gly₁₄₁ en MmQSOX1.

Para determinar cómo estas diferencias de la secuencia de aminoácidos afectan a las estructuras de ortólogos de QSOX1, se cristalizó MmQSOX1_{Trx}, y se resolvió su estructura. Estaban presentes dos moléculas de MmQSOX1_{Trx} en la unidad asimétrica. La comparación de la estructura del complejo HsQSOX1_{Trx}-Fab492.1 con la estructura de MmQSOX1_{Trx} (Figura 26) próxima a Pro116 muestra que el resto de alanina que reemplaza Pro116 no puede rellenar la hendidura hidrófoba en un complejo hipotético entre MmQSOX1 y Fab492.1 tan bien como Pro116. Además, el reemplazo de prolina con alanina afecta a la posición de la cadena principal cercana y el rotámetro de Asn117 de MmQSOX1 (correspondiente a Asn114 de HsQSOX1). Por lo tanto, se espera un choque entre Asn117 de MmQSOX1 y Tyr92 de CDR L3 (Figura 26, derecha). Además, el bucle Thr₁₃₈-Gly₁₄₁ de una de las moléculas de MmQSOX1 está más cerca de Tyr100 de CDR H3, que el bucle V₁₃₅-V₁₃₈ de HsQSOX1 (Figura 26, izquierda).

Se construyeron tres mutantes de MmQSOX1 que imitan HsQSOX1 en posiciones distintas basándose en las observaciones anteriores. La inhibición de MAb492.1 se ensayó en estos mutantes para identificar los restos que interfieren con la formación del complejo de MAb492.1-MmQSOX1. La actividad del primer mutante, MmQSOX1 A119P, mostró aproximadamente 40 % de actividad en presencia de MAb492.1 (Figura 27). El segundo mutante, MmQSOX1 TLPG(138-141)VFPV (en lo sucesivo en la presente memoria denominado mutante TLPG) mostró aproximadamente 50 % de actividad en presencia de MAb492.1, y el tercer mutante, que comprende ambas mutaciones mencionadas, fue inhibido por MAb492.1, en la misma medida que HsQSOX1. Estos resultados confirman que solamente algunos restos (hasta cuatro que se mutaron) determinan la especificidad de MAb492.1 por HsQSOX1 en comparación con MmQSOX1.

Basándose en estas observaciones, la generación de variantes de MAb492.1 que inhibe MmQSOX1 y potencialmente otros ortólogos de QSOX1 es posible basándose en algunas mutaciones de las CDR de anticuerpos o regiones circundantes. Sugerencias de mutaciones en MAb492.1 que pueden producir un anticuerpo que inhibe MmQSOX1 (se enumeran en la Tabla 8 a continuación). También podrían emplearse combinaciones de estas mutaciones.

Tabla 8: posibles mutaciones en MAb492.1 para generar un anticuerpo que se dirige a MmQSOX1

CDR	Posibles mutaciones
H3	Tyr100Asn
H3	Tyr100Asp
H3	Tyr100Gly
H3	Tyr100Ser
H3	Ala101Gly
L3	Tyr92Asn

CDR	Posibles mutaciones
L3	Tyr92Asp
L3	Ser93Gly
L3	Ser93Ala

Listado de secuencias

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd.
Fass, Deborah
Grossman, Iris
5 Ilani, Tal
Alon, Assaf

<120> COMPOSICIONES PARA INHIBIR QUIESCIN SULFHIDRIL OXIDASA (QSOX1) Y USOS DE LAS MISMAS

<130> 55583

<150> US 61/607,696

10 <151> 2012-03-07

<150> US 61/665,365

<151> 2012-06-28

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 3316

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ggaggcaggc ggtgccgcgg cgccgggacc cgactcatcc ggtgcttgcg tgtggtggtg      60
agcgcagcgc cgaggatgag gaggtgcaac agcggctccg ggccgcgcc gtcgctgctg      120
ctgtgctgc tgtggctgct cgcggttccc ggcgctaacg cggccccgcg gtcggcgctc      180
tattcgctt ccgaccgct gacgctgctg caggcggaca cggtgccgcg cgcggtgctg      240
ggctcccgca gcgcctgggc cgtggagttc ttgcctcct ggtgcggcca ctgcatgcc      300
ttcgccccga cgtggaaggc gctggccgaa gacgtcaaag cctggaggcc ggccctgtat      360
ctcgccgcc tggactgtgc tgaggagacc aacagtgcag tctgcagaga cttcaacatc      420
cctggcttcc cgactgtgag gttcttcaag gcctttacca agaacggctc gggagcagta      480
ttccagtggt ctggtgctga cgtgcagaca ctgcgggaga ggctcattga cgccctggag      540
tcccatcatg acacgtggcc cccagcctgt ccccaactgg agcctgcaa gctggaggag      600
attgatggat tctttgcgag aaataacgaa gagtacctgg ctctgatctt tgaaaaggga      660
ggctcctacc tgggtagaga ggtggctctg gacctgtccc agcacaaagg cgtggcggtg      720
cgcagggtgc tgaacacaga ggccaatgtg gtgagaaagt ttggtgtcac cgacttcccc      780
tcttgctacc tgctgttccg gaatggctct gtctcccgag tcccctgct catggaatcc      840
aggtccttct ataccgctta cctgcagaga ctctctgggc tcaccaggga ggctgccag      900
accacagttg caccaaccac tgctaacaag atagctccca ctgtttggaa attggcagat      960
cgctccaaga tctacatggc tgacctggaa tctgcactgc actacatcct gcggatagaa     1020

```

20

ES 2 691 931 T3

gtgggcaggt	tcccggtcct	ggaagggcag	cgcttggtgg	ccctgaaaaa	gtttgtggca	1080
gtgctggcca	agtatttccc	tggccggccc	ttagtccaga	acttcctgca	ctccgtgaat	1140
gaatggctca	agaggcagaa	gagaaataaa	attccctaca	gtttctttta	aactgccctg	1200
gacgacagga	aagaggggtgc	cgttcttgcc	aagaaggtga	actggattgg	ctgccagggg	1260
agtgagccgc	atttccgggg	ctttccctgc	tcctgtggg	tcctcttcca	cttcttgact	1320
gtgcaggcag	ctcggcaaaa	tgtagaccac	tcacaggaag	cagccaaggc	caaggaggtc	1380
ctcccagcca	tccgaggtca	cgtgcactac	ttcttcggct	gccgagactg	cgctagccac	1440
ttcgagcaga	tggctgctgc	ctccatgcac	cgggtgggga	gtcccaacgc	cgctgtcctc	1500
tggctctggt	ctagccacaa	caggggtcaat	gctgccttg	caggtgcccc	cagcgaggac	1560
ccccagttcc	ccaaggtgca	gtggccaccc	cgtgaacttt	gttctgcctg	ccacaatgaa	1620
cgcttgatg	tgcccgtgtg	ggacgtggaa	gccaccctca	acttctcaa	ggcccacttc	1680
tccccaagca	acatcatcct	ggacttccct	gcagctgggt	cagctgcccg	gagggatgtg	1740
cagaatgtgg	cagccgcccc	agagctggcg	atgggagccc	tggagctgga	aagccggaat	1800
tcaactctgg	accctgggaa	gcctgagatg	atgaagtccc	ccacaaacac	caccccat	1860
gtgccggctg	agggacctga	ggcaagtoga	ccccgaagc	tgcacctg	cctcagagct	1920
gcaccaggcc	aggagcctcc	tgagcacatg	gcagagcttc	agaggaatga	gcaggagcag	1980
ccgcttgggc	agtggcactt	gagcaagcga	gacacagggg	ctgcattgct	ggctgagtcc	2040
agggctgaga	agaaccgcct	ctggggccct	ttggaggtca	ggcgctggg	ccgcagctcc	2100
aagcagctgg	tgcacatccc	tgagggccag	ctggaggccc	gagctggacg	gggcccaggc	2160
cagtggctgc	aggtgctggg	agggggcttc	tcttacctgg	acatcagcct	ctgtgtgggg	2220
ctctattccc	tgtccttcat	gggcctgctg	gccatgtaca	cctacttcca	ggccaagata	2280
agggccctga	agggccatgc	tggccaccct	gcagcctgaa	ccacctgggg	aggaggccgg	2340
agagggagct	gccatctcta	ggcacctcaa	gccccctgac	cccatccct	ccctccac	2400
cccttgcctc	ttgtctggcc	tagaagtgtg	ggaaattcag	gaaaacgagt	tgtccagt	2460
aagcttcttg	gggttgctag	gacagagagc	tcctttgaca	caaaagacag	gagcagggtc	2520
caggttcccc	tgtgtgcag	ggagggcagc	cccgggcagt	gggcataggg	cagctcagtc	2580
cctggcctct	tagcaccaca	ttcctgtttt	tcagcttatt	tgaagtctg	cctcattctc	2640
actggagcct	cagtctctcc	tgtttggtct	tggccctcaa	ctggggcaag	tgaagccaga	2700
ggagggctcc	ccagctgggt	gggttggaat	ggaactctc	actagctgct	ggggtccgc	2760
ccacctgct	cccttccgga	caatgaagaa	gcctttgcac	cctgggagga	aggaccaccc	2820
cgggccctct	atgcctggcc	agcctccagc	tcctcagacc	tcctgggtgg	ggtttggctt	2880
caggggtggg	tttggaagct	tctggaagtc	gtgctggtct	cccaggtgag	gcaagccatg	2940

ES 2 691 931 T3

gttgctgggc tgtagggtga gtggcttgct tggtagggacc tgacgagttg gtggcatggg	3000
aaggatgtgg gtctctagtg ccttgccctg gcttagctgc aggagaagat ggctgctttc	3060
acttcccccc attgagctct gctccctctg agcctgggtct tttgtccttt tttattttgg	3120
tctccaagat gaatgctcat ctttgagggg tgccaggtag aagctaggga ggggagtgtc	3180
ttctctctcc aggtttcacc ttccagtgtg cagaagttag aagggtctgg cgggggcagt	3240
gccttacaca tgcttgattc ccacgtacc ccctgccttg ggaggtgtgt ggaataaatt	3300
atttttgtta aggcaa	3316

<210> 2

<211> 2583

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

ggaggcaggc ggtgccgcgg cgccgggacc cgaactcatcc ggtgcttgcg tgtggtggtg	60
agcgcagcgc cgaggatgag gaggtgcaac agcggctccg ggccgccgcc gtcgctgctg	120
ctgctgctgc tgtggctgct cgcggttccc ggcgctaacg cggccccgcg gtcggcgctc	180
tattcgccct cgcacccgct gacgctgctg caggcggaca cggcgcgccg cgcggtgctg	240
ggctcccgca gcgcctgggc cgtggagttc ttgcctcct ggtgcggcca ctgcatcgcc	300
ttcgccccga cgtggaaggc gctggccgaa gacgtcaaag cctggaggcc ggccctgtat	360
ctcgccgccc tggactgtgc tgaggagacc aacagtgcag tctgcagaga cttcaacatc	420
cctggcttcc cgactgtgag gttcttcaag gcctttacca agaacggctc gggagcagta	480
tttccagtgg ctggtgctga cgtgcagaca ctgcgggaga ggctcattga cgcctggag	540
tcccatcatg acacgtggcc ccagcctgt cccccactgg agcctgcaa gctggaggag	600
attgatggat tctttgcgag aaataacgaa gagtacctg ctctgatctt tgaaaaggga	660
ggctcctacc tgggtagaga ggtggctctg gacctgtccc agcacaaaagg cgtggcggtg	720
cgcagggtgc tgaacacaga ggccaatgtg gtgagaaagt ttggtgtcac cgacttcccc	780
tcttgtacc tgctgttccg gaatggctct gtctcccag tccccgtgct catggaatcc	840
aggtccttct ataccgtta cctgcagaga ctctctgggc tcaccaggga ggctgccag	900
accacagttg caccaaccac tgctaacaag atagctccca ctgtttggaa attgacagat	960
cgtccaaga tctacatggc tgacctggaa tctgcactgc actacatcct gcggatagaa	1020
gtgggcaggc tcccgttcct ggaagggcag cgctggttg ccctgaaaaa gtttgtggca	1080
gtgctggcca agtatttccc tggccggccc ttagtccaga acttcctgca ctccgtgaat	1140
gaatggctca agaggcagaa gagaaataaa attccctaca gtttctttaa aactgcctg	1200
gacgacagga aagagggtgc cgttcttgcc aagaaggta actggattgg ctgccagggg	1260

ES 2 691 931 T3

```

agtgagccgc atttcggggg ctttccctgc tcctgtggg tcctcttcca cttcttgact 1320
gtgcaggcag ctoggcaaaa tgtagaccac tcacaggaag cagccaaggc caaggaggtc 1380
ctcccagcca tccgaggcta cgtgcactac ttcttcggct gccgagactg cgctagccac 1440
ttcgagcaga tggctgctgc ctccatgcac cgggtgggga gtcccaacgc cgctgtcctc 1500
tggctctggg ctagccacaa cagggccaat gctgccttg caggtgcccc cagcgaggac 1560
ccccagttcc ccaagggtgca gtggccaccc cgtgaacttt gttctgcctg ccacaatgaa 1620
cgctggatg tgcccgctg ggacgtggaa gccaccctca acttcctcaa ggccacttc 1680
tccccaagca acatcatcct ggacttccct gcagctgggt cagctgcccg gagggatgtg 1740
cagaatgtgg cagccgcccc agagctggcg atgggagccc tggagctgga aagccggaat 1800
tcaactctgg accctgggaa gcctgagatg atgaagtccc ccacaaacac caccacacat 1860
gtgccggctg agggacctga gcttatattga agtctgcct cattctcact ggagcctcag 1920
tctctcctgc ttggtcttgg cctcaactg gggcaagtga agccagagga gggccccca 1980
gctgggtggg ctggaatgga actcctcact agctgctggg gctccgcccc ccctgctccc 2040
ttccggacaa tgaagaagcc ttgacacct gggaggaagg accaccccg gcctctatg 2100
cctggccagc ctccagctcc tcagacctcc tgggtggggg ttggcttcag ggtggggttt 2160
ggaagcttct ggaagtctg ctggtctccc aggtgaggca agccatggtt gctgggctgt 2220
agggtgagtg gcttgcttgg tgggacctga cgagttggg gcatgggaag gatgtgggtc 2280
tctagtgcct tgccctggct tagctgcagg agaagatggc tgctttcact tccccccatt 2340
gagctctgct ccctctgagc ctggtctttt gtcccttttt attttggtct ccaagatgaa 2400
tgctcatctt tggaggggtg caggtagaag ctagggaggg gagtgtcttc tctctccagg 2460
ttcaccttc cagtgtgcag aagttagaag ggtctggcgg gggcagtgcc ttacacatgc 2520
ttgattccca cgctaccccc tgccttggga ggtgtgtgga ataaattatt tttgttaagg 2580
caa 2583

```

<210> 3

<211> 747

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Arg Arg Cys Asn Ser Gly Ser Gly Pro Pro Pro Ser Leu Leu Leu
1           5           10           15

```

```

Leu Leu Leu Trp Leu Leu Ala Val Pro Gly Ala Asn Ala Ala Pro Arg
20           25           30

```

ES 2 691 931 T3

Ser Ala Leu Tyr Ser Pro Ser Asp Pro Leu Thr Leu Leu Gln Ala Asp
 35 40 45
 Thr Val Arg Gly Ala Val Leu Gly Ser Arg Ser Ala Trp Ala Val Glu
 50 55 60
 Phe Phe Ala Ser Trp Cys Gly His Cys Ile Ala Phe Ala Pro Thr Trp
 65 70 75 80
 Lys Ala Leu Ala Glu Asp Val Lys Ala Trp Arg Pro Ala Leu Tyr Leu
 85 90 95
 Ala Ala Leu Asp Cys Ala Glu Glu Thr Asn Ser Ala Val Cys Arg Asp
 100 105 110
 Phe Asn Ile Pro Gly Phe Pro Thr Val Arg Phe Phe Lys Ala Phe Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gly Ser Gly Ala Val Phe Pro Val Ala Gly Ala Asp Val Gln
 130 135 140
 Thr Leu Arg Glu Arg Leu Ile Asp Ala Leu Glu Ser His His Asp Thr
 145 150 155 160
 Trp Pro Pro Ala Cys Pro Pro Leu Glu Pro Ala Lys Leu Glu Glu Ile
 165 170 175
 Asp Gly Phe Phe Ala Arg Asn Asn Glu Glu Tyr Leu Ala Leu Ile Phe
 180 185 190
 Glu Lys Gly Gly Ser Tyr Leu Gly Arg Glu Val Ala Leu Asp Leu Ser
 195 200 205
 Gln His Lys Gly Val Ala Val Arg Arg Val Leu Asn Thr Glu Ala Asn
 210 215 220
 Val Val Arg Lys Phe Gly Val Thr Asp Phe Pro Ser Cys Tyr Leu Leu
 225 230 235 240
 Phe Arg Asn Gly Ser Val Ser Arg Val Pro Val Leu Met Glu Ser Arg
 245 250 255
 Ser Phe Tyr Thr Ala Tyr Leu Gln Arg Leu Ser Gly Leu Thr Arg Glu
 260 265 270
 Ala Ala Gln Thr Thr Val Ala Pro Thr Thr Ala Asn Lys Ile Ala Pro
 275 280 285

ES 2 691 931 T3

Thr Val Trp Lys Leu Ala Asp Arg Ser Lys Ile Tyr Met Ala Asp Leu
 290 295 300
 Glu Ser Ala Leu His Tyr Ile Leu Arg Ile Glu Val Gly Arg Phe Pro
 305 310 315 320
 Val Leu Glu Gly Gln Arg Leu Val Ala Leu Lys Lys Phe Val Ala Val
 325 330 335
 Leu Ala Lys Tyr Phe Pro Gly Arg Pro Leu Val Gln Asn Phe Leu His
 340 345 350
 Ser Val Asn Glu Trp Leu Lys Arg Gln Lys Arg Asn Lys Ile Pro Tyr
 355 360 365
 Ser Phe Phe Lys Thr Ala Leu Asp Asp Arg Lys Glu Gly Ala Val Leu
 370 375 380
 Ala Lys Lys Val Asn Trp Ile Gly Cys Gln Gly Ser Glu Pro His Phe
 385 390 395 400
 Arg Gly Phe Pro Cys Ser Leu Trp Val Leu Phe His Phe Leu Thr Val
 405 410 415
 Gln Ala Ala Arg Gln Asn Val Asp His Ser Gln Glu Ala Ala Lys Ala
 420 425 430
 Lys Glu Val Leu Pro Ala Ile Arg Gly Tyr Val His Tyr Phe Phe Gly
 435 440 445
 Cys Arg Asp Cys Ala Ser His Phe Glu Gln Met Ala Ala Ala Ser Met
 450 455 460
 His Arg Val Gly Ser Pro Asn Ala Ala Val Leu Trp Leu Trp Ser Ser
 465 470 475 480
 His Asn Arg Val Asn Ala Arg Leu Ala Gly Ala Pro Ser Glu Asp Pro
 485 490 495
 Gln Phe Pro Lys Val Gln Trp Pro Pro Arg Glu Leu Cys Ser Ala Cys
 500 505 510
 His Asn Glu Arg Leu Asp Val Pro Val Trp Asp Val Glu Ala Thr Leu
 515 520 525
 Asn Phe Leu Lys Ala His Phe Ser Pro Ser Asn Ile Ile Leu Asp Phe
 530 535 540

ES 2 691 931 T3

Pro Ala Ala Gly Ser Ala Ala Arg Arg Asp Val Gln Asn Val Ala Ala
545 550 555 560

Ala Pro Glu Leu Ala Met Gly Ala Leu Glu Leu Glu Ser Arg Asn Ser
565 570 575

Thr Leu Asp Pro Gly Lys Pro Glu Met Met Lys Ser Pro Thr Asn Thr
580 585 590

Thr Pro His Val Pro Ala Glu Gly Pro Glu Ala Ser Arg Pro Pro Lys
595 600 605

Leu His Pro Gly Leu Arg Ala Ala Pro Gly Gln Glu Pro Pro Glu His
610 615 620

Met Ala Glu Leu Gln Arg Asn Glu Gln Glu Gln Pro Leu Gly Gln Trp
625 630 635 640

His Leu Ser Lys Arg Asp Thr Gly Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ser Arg
645 650 655

Ala Glu Lys Asn Arg Leu Trp Gly Pro Leu Glu Val Arg Arg Val Gly
660 665 670

Arg Ser Ser Lys Gln Leu Val Asp Ile Pro Glu Gly Gln Leu Glu Ala
675 680 685

Arg Ala Gly Arg Gly Arg Gly Gln Trp Leu Gln Val Leu Gly Gly Gly
690 695 700

Phe Ser Tyr Leu Asp Ile Ser Leu Cys Val Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
705 710 715 720

Phe Met Gly Leu Leu Ala Met Tyr Thr Tyr Phe Gln Ala Lys Ile Arg
725 730 735

Ala Leu Lys Gly His Ala Gly His Pro Ala Ala
740 745

<210> 4

<211> 604

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Arg Arg Cys Asn Ser Gly Ser Gly Pro Pro Pro Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15

ES 2 691 931 T3

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

ES 2 691 931 T3

260	265	270
Ala Ala Gln Thr Thr Val Ala Pro Thr Thr Ala Asn Lys Ile Ala Pro 275 280 285		
Thr Val Trp Lys Leu Ala Asp Arg Ser Lys Ile Tyr Met Ala Asp Leu 290 295 300		
Glu Ser Ala Leu His Tyr Ile Leu Arg Ile Glu Val Gly Arg Phe Pro 305 310 315 320		
Val Leu Glu Gly Gln Arg Leu Val Ala Leu Lys Lys Phe Val Ala Val 325 330 335		
Leu Ala Lys Tyr Phe Pro Gly Arg Pro Leu Val Gln Asn Phe Leu His 340 345 350		
Ser Val Asn Glu Trp Leu Lys Arg Gln Lys Arg Asn Lys Ile Pro Tyr 355 360 365		
Ser Phe Phe Lys Thr Ala Leu Asp Asp Arg Lys Glu Gly Ala Val Leu 370 375 380		
Ala Lys Lys Val Asn Trp Ile Gly Cys Gln Gly Ser Glu Pro His Phe 385 390 395 400		
Arg Gly Phe Pro Cys Ser Leu Trp Val Leu Phe His Phe Leu Thr Val 405 410 415		
Gln Ala Ala Arg Gln Asn Val Asp His Ser Gln Glu Ala Ala Lys Ala 420 425 430		
Lys Glu Val Leu Pro Ala Ile Arg Gly Tyr Val His Tyr Phe Phe Gly 435 440 445		
Cys Arg Asp Cys Ala Ser His Phe Glu Gln Met Ala Ala Ala Ser Met 450 455 460		
His Arg Val Gly Ser Pro Asn Ala Ala Val Leu Trp Leu Trp Ser Ser 465 470 475 480		
His Asn Arg Val Asn Ala Arg Leu Ala Gly Ala Pro Ser Glu Asp Pro 485 490 495		
Gln Phe Pro Lys Val Gln Trp Pro Pro Arg Glu Leu Cys Ser Ala Cys 500 505 510		

ES 2 691 931 T3

His Asn Glu Arg Leu Asp Val Pro Val Trp Asp Val Glu Ala Thr Leu
515 520 525

Asn Phe Leu Lys Ala His Phe Ser Pro Ser Asn Ile Ile Leu Asp Phe
530 535 540

Pro Ala Ala Gly Ser Ala Ala Arg Arg Asp Val Gln Asn Val Ala Ala
545 550 555 560

Ala Pro Glu Leu Ala Met Gly Ala Leu Glu Leu Glu Ser Arg Asn Ser
565 570 575

Thr Leu Asp Pro Gly Lys Pro Glu Met Met Lys Ser Pro Thr Asn Thr
580 585 590

Thr Pro His Val Pro Ala Glu Gly Pro Glu Leu Ile
595 600

<210> 5

<211> 1576

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos de QSOX humana (133-546)

<400> 5

```

atgggccatc atcaccacca tcaccatatg tcggcgctct attcgccctc cgaccgcgtg      60
acgtgtctgc aggcggacac ggtgcgcggc gcggtgtctg gctcccgcag cgctggggcc      120
gtggagttct tcgcctcctg gtgcggccac tgcacgcctc tcgcccgcac gtggaaggcg      180
ctggcogaag acgtcaaagc ctggaggccg gccctgtatc tcgcccgcct ggactgtgct      240
gaggagacca acagtgcagt ctgcagagac ttcaacatcc ctggcttccc gactgtgagg      300
ttcttcaagg cctttaccaa gaacggctca ggagcagtat ttccagtggc tgggtgtgac      360
gtgcagacgc tgcgggagag gctcattgac gccctggagt cccatcatga cacgtggccc      420
ccagcctgtc cccactgga gcctgccaag ctggaggaga ttgatggatt ctttgcgaga      480
aataacgaag agtacctggc tctgatcttt gaaaaggag gtcctacct ggctagagag      540
gtggctcttg acctgtccca gcacaaaggc gtggcggcgc gcagggtgct gaacacagag      600
gccaatgtgg tgagaaagtt tgggtgcacc gacttcccct cttgctacct gctgttccgg      660
aatggctctg tctcccagat ccccgctgctc atggaatcca ggtccttcta taccgcttac      720
ctgcagagac tctctgggct aaccaggag gctgccaga ccacagttgc accaaccact      780
gctaacaaga tagctccac tgtttgaaa ttggcagatc gctccaagat ctacatggct      840
gacctggaat ctgcactgca ctacatcctg cggatagaag tgggcagggt cccggctoctg      900

```

10

ES 2 691 931 T3

```

gaagggcagc gcctggtggc cctgaaaaag tttgtggcag tgctggccaa gtatttccct      960
ggccggccct tagtccagaa cttcctgcac tccgtgaatg aatggctcaa gaggcagaag      1020
agaaataaaa ttccctacag tttctttaaa actgccctgg acgacaggaa agagggtgcc      1080
gttctcgcca agaaggtgaa ctggattggc tgcaggggga gtgagccgca tttccggggc      1140
tttccctgct ccctgtgggt tcttttccac ttcttgactg tgcaggcagc tcggcaaaat      1200
gtagaccact cacaggaagc agccaaggcc aaggagggtcc tcccagccat ccgaggctac      1260
gtgcactact tcttcggctg ccgagactgc gctagccact tcgagcagat ggctgctgcc      1320
tccatgcacc ggggtggggag tcccaacgcc gctgtcctct ggctctggtc tagccacaac      1380
agggtaaatg ctgccttgc aggtgcccc agcgaggacc ccagttccc caaggtgcag      1440
tgccacccc gtgaactttg ttctgcctgc cacaatgaac gcctggatgt gcccggtgtg      1500
gacgtggaag ccaccctcaa cttcctcaag gcccaattct cccaagcaa catcatcctg      1560
gacttccctg cataag                                     1576

```

<210> 6

<211> 524

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de QSOX humana (133-546)

<400> 6

```

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

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

Leu Gly Ser Arg Ser Ala Trp Ala Val Glu Phe Phe Ala Ser Trp Cys
                35                40                45

Gly His Cys Ile Ala Phe Ala Pro Thr Trp Lys Ala Leu Ala Glu Asp
                50                55                60

Val Lys Ala Trp Arg Pro Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Leu Asp Cys Ala
65                70                75                80

Glu Glu Thr Asn Ser Ala Val Cys Arg Asp Phe Asn Ile Pro Gly Phe
                85                90                95

Pro Thr Val Arg Phe Phe Lys Ala Phe Thr Lys Asn Gly Ser Gly Ala
                100                105                110

```

10

ES 2 691 931 T3

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

ES 2 691 931 T3

```

Ile Gly Cys Gln Gly Ser Glu Pro His Phe Arg Gly Phe Pro Cys Ser
 370                      375                      380

Leu Trp Val Leu Phe His Phe Leu Thr Val Gln Ala Ala Arg Gln Asn
385                      390                      395                      400

Val Asp His Ser Gln Glu Ala Ala Lys Ala Lys Glu Val Leu Pro Ala
                      405                      410                      415

Ile Arg Gly Tyr Val His Tyr Phe Phe Gly Cys Arg Asp Cys Ala Ser
                      420                      425                      430

His Phe Glu Gln Met Ala Ala Ala Ser Met His Arg Val Gly Ser Pro
                      435                      440                      445

Asn Ala Ala Val Leu Trp Leu Trp Ser Ser His Asn Arg Val Asn Ala
450                      455                      460

Arg Leu Ala Gly Ala Pro Ser Glu Asp Pro Gln Phe Pro Lys Val Gln
465                      470                      475                      480

Trp Pro Pro Arg Glu Leu Cys Ser Ala Cys His Asn Glu Arg Leu Asp
                      485                      490                      495

Val Pro Val Trp Asp Val Glu Ala Thr Leu Asn Phe Leu Lys Ala His
500                      505                      510

Phe Ser Pro Ser Asn Ile Ile Leu Asp Phe Pro Ala
515                      520

```

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos ligera variable de MAb492.1

<400> 7

```

Asp Val Val Met Thr Gln Thr His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1                      5                      10                      15

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

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

```

10

ES 2 691 931 T3

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos pesada variable de MAb492.1

<400> 8

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Thr Asp Tyr Lys Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

10 <210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS

<400> 9

Asp Val Val Met Thr Gln Thr His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg

<210> 10
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS
 <400> 10
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Thr Ile Cys Lys
 20
 <210> 11
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS
 15 <400> 11
 Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys
 1 5 10 15
 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS
 <400> 12
 Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 1 5 10 15
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS
 <400> 13
 Leu Leu Ile His Ser Ala Ser Tyr Arg
 1 5
 <210> 14
 <211> 16
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS
 <400> 14
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 <210> 15
 <211> 17

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS

5 <400> 15

Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser
1 5 10 15

Gln

<210> 16
<211> 17
<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS

<400> 16

Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile His Ser Ala Ser
1 5 10 15

Tyr

15 <210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS

<400> 17

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe
1 5 10

<210> 18
<211> 12
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS

<400> 18

30 Ser Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
1 5 10

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS

<400> 19

Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn Trp
1 5

40 <210> 20
<211> 15

ES 2 691 931 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS
 5 <400> 20
 Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 1 5 10 15
 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS
 <400> 21
 Asp Tyr Lys Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu
 1 5 10
 15 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS
 <400> 22
 Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe
 1 5 10 15
 <210> 23
 <211> 18
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS
 <400> 23
 Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp
 1 5 10 15
 30 Gly Arg
 <210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS
 <400> 24
 Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg
 1 5 10
 40 <210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS

<400> 25

5 Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Thr Asp Tyr
1 5 10 15
Lys

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido representativo de MAb492.1 detectado por LC-MS/MS

<400> 26

15 Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg
1 5 10

<210> 27

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de MAb492.1

<400> 27

Asp Val Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

ES 2 691 931 T3

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 28

<211> 484

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de MAb492.1

<400> 28

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Thr Asp Tyr Lys Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
115 120 125

10

ES 2 691 931 T3

Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu
 165 170 175

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr
 180 185 190

Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro
 210 215 220

Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp
 260 265 270

Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met
 290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser
 305 310 315 320

Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 325 330 335

Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln
 340 345 350

Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe
 355 360 365

Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu
 370 375 380

ES 2 691 931 T3

Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe
385 390 395 400

Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
405 410 415

Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
420 425 430

Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Gln Leu Asp Glu Thr Cys
435 440 445

Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu Asp Gly Leu Trp Thr Thr Ile Thr
450 455 460

Ile Phe Ile Ser Leu Phe Leu Leu Ser Val Cys Tyr Ser Ala Ala Val
465 470 475 480

Thr Leu Phe Lys

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera de MAb492.1

<400> 29

Gln Asp Val Ser Thr Ala
1 5

10 <210> 30

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera de MAb492.1

<400> 30

Ser Ala Ser
1

<210> 31

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera de MAb492.1

<400> 31

Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Leu Thr
1 5

25

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

ES 2 691 931 T3

<223> Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada de MAb492.1

<400> 32

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly
1 5

<210> 33

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada de MAb492.1

10 <400> 33

Ile Trp Gly Asp Gly Arg Thr
1 5

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada de MAb492.1

<400> 34

Ala Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Ala Tyr
1 5 10

20 <210> 35

<211> 747

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Producto de la escisión con tripsina de QSOX1 (Banda inferior)

<400> 35

Met Arg Arg Cys Asn Ser Gly Ser Gly Pro Pro Pro Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15

ES 2 691 931 T3

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

ES 2 691 931 T3

260	265	270
Ala Ala Gln Thr Thr Val Ala Pro Thr Thr Ala Asn Lys Ile Ala Pro 275 280 285		
Thr Val Trp Lys Leu Ala Asp Arg Ser Lys Ile Tyr Met Ala Asp Leu 290 295 300		
Glu Ser Ala Leu His Tyr Ile Leu Arg Ile Glu Val Gly Arg Phe Pro 305 310 315 320		
Val Leu Glu Gly Gln Arg Leu Val Ala Leu Lys Lys Phe Val Ala Val 325 330 335		
Leu Ala Lys Tyr Phe Pro Gly Arg Pro Leu Val Gln Asn Phe Leu His 340 345 350		
Ser Val Asn Glu Trp Leu Lys Arg Gln Lys Arg Asn Lys Ile Pro Tyr 355 360 365		
Ser Phe Phe Lys Thr Ala Leu Asp Asp Arg Lys Glu Gly Ala Val Leu 370 375 380		
Ala Lys Lys Val Asn Trp Ile Gly Cys Gln Gly Ser Glu Pro His Phe 385 390 395 400		
Arg Gly Phe Pro Cys Ser Leu Trp Val Leu Phe His Phe Leu Thr Val 405 410 415		
Gln Ala Ala Arg Gln Asn Val Asp His Ser Gln Glu Ala Ala Lys Ala 420 425 430		
Lys Glu Val Leu Pro Ala Ile Arg Gly Tyr Val His Tyr Phe Phe Gly 435 440 445		
Cys Arg Asp Cys Ala Ser His Phe Glu Gln Met Ala Ala Ala Ser Met 450 455 460		
His Arg Val Gly Ser Pro Asn Ala Ala Val Leu Trp Leu Trp Ser Ser 465 470 475 480		
His Asn Arg Val Asn Ala Arg Leu Ala Gly Ala Pro Ser Glu Asp Pro 485 490 495		
Gln Phe Pro Lys Val Gln Trp Pro Pro Arg Glu Leu Cys Ser Ala Cys 500 505 510		

ES 2 691 931 T3

His Asn Glu Arg Leu Asp Val Pro Val Trp Asp Val Glu Ala Thr Leu
 515 520 525
 Asn Phe Leu Lys Ala His Phe Ser Pro Ser Asn Ile Ile Leu Asp Phe
 530 535 540
 Pro Ala Ala Gly Ser Ala Ala Arg Arg Asp Val Gln Asn Val Ala Ala
 545 550 555 560
 Ala Pro Glu Leu Ala Met Gly Ala Leu Glu Leu Glu Ser Arg Asn Ser
 565 570 575
 Thr Leu Asp Pro Gly Lys Pro Glu Met Met Lys Ser Pro Thr Asn Thr
 580 585 590
 Thr Pro His Val Pro Ala Glu Gly Pro Glu Ala Ser Arg Pro Pro Lys
 595 600 605
 Leu His Pro Gly Leu Arg Ala Ala Pro Gly Gln Glu Pro Pro Glu His
 610 615 620
 Met Ala Glu Leu Gln Arg Asn Glu Gln Glu Gln Pro Leu Gly Gln Trp
 625 630 635 640
 His Leu Ser Lys Arg Asp Thr Gly Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ser Arg
 645 650 655
 Ala Glu Lys Asn Arg Leu Trp Gly Pro Leu Glu Val Arg Arg Val Gly
 660 665 670
 Arg Ser Ser Lys Gln Leu Val Asp Ile Pro Glu Gly Gln Leu Glu Ala
 675 680 685
 Arg Ala Gly Arg Gly Arg Gly Gln Trp Leu Gln Val Leu Gly Gly Gly
 690 695 700
 Phe Ser Tyr Leu Asp Ile Ser Leu Cys Val Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 705 710 715 720
 Phe Met Gly Leu Leu Ala Met Tyr Thr Tyr Phe Gln Ala Lys Ile Arg
 725 730 735
 Ala Leu Lys Gly His Ala Gly His Pro Ala Ala
 740 745

<210> 36

<211> 747

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Producto de la escisión con quimiotripsina de QSOX1 (Banda inferior)

<400> 36

ES 2 691 931 T3

Met	Arg	Arg	Cys	Asn	Ser	Gly	Ser	Gly	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	1	5	10	15
Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Leu	Ala	Val	Pro	Gly	Ala	Asn	Ala	Ala	Pro	Arg	20	25	30	
Ser	Ala	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Ala	Asp	35	40	45	
Thr	Val	Arg	Gly	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Arg	Ser	Ala	Trp	Ala	Val	Glu	50	55	60	
Phe	Phe	Ala	Ser	Trp	Cys	Gly	His	Cys	Ile	Ala	Phe	Ala	Pro	Thr	Trp	65	70	75	80
Lys	Ala	Leu	Ala	Glu	Asp	Val	Lys	Ala	Trp	Arg	Pro	Ala	Leu	Tyr	Leu	85	90	95	
Ala	Ala	Leu	Asp	Cys	Ala	Glu	Glu	Thr	Asn	Ser	Ala	Val	Cys	Arg	Asp	100	105	110	
Phe	Asn	Ile	Pro	Gly	Phe	Pro	Thr	Val	Arg	Phe	Phe	Lys	Ala	Phe	Thr	115	120	125	
Lys	Asn	Gly	Ser	Gly	Ala	Val	Phe	Pro	Val	Ala	Gly	Ala	Asp	Val	Gln	130	135	140	
Thr	Leu	Arg	Glu	Arg	Leu	Ile	Asp	Ala	Leu	Glu	Ser	His	His	Asp	Thr	145	150	155	160
Trp	Pro	Pro	Ala	Cys	Pro	Pro	Leu	Glu	Pro	Ala	Lys	Leu	Glu	Glu	Ile	165	170	175	
Asp	Gly	Phe	Phe	Ala	Arg	Asn	Asn	Glu	Glu	Tyr	Leu	Ala	Leu	Ile	Phe	180	185	190	
Glu	Lys	Gly	Gly	Ser	Tyr	Leu	Gly	Arg	Glu	Val	Ala	Leu	Asp	Leu	Ser	195	200	205	
Gln	His	Lys	Gly	Val	Ala	Val	Arg	Arg	Val	Leu	Asn	Thr	Glu	Ala	Asn	210	215	220	

ES 2 691 931 T3

Val Val Arg Lys Phe Gly Val Thr Asp Phe Pro Ser Cys Tyr Leu Leu
 225 230 235 240
 Phe Arg Asn Gly Ser Val Ser Arg Val Pro Val Leu Met Glu Ser Arg
 245 250 255
 Ser Phe Tyr Thr Ala Tyr Leu Gln Arg Leu Ser Gly Leu Thr Arg Glu
 260 265 270
 Ala Ala Gln Thr Thr Val Ala Pro Thr Thr Ala Asn Lys Ile Ala Pro
 275 280 285
 Thr Val Trp Lys Leu Ala Asp Arg Ser Lys Ile Tyr Met Ala Asp Leu
 290 295 300
 Glu Ser Ala Leu His Tyr Ile Leu Arg Ile Glu Val Gly Arg Phe Pro
 305 310 315 320
 Val Leu Glu Gly Gln Arg Leu Val Ala Leu Lys Lys Phe Val Ala Val
 325 330 335
 Leu Ala Lys Tyr Phe Pro Gly Arg Pro Leu Val Gln Asn Phe Leu His
 340 345 350
 Ser Val Asn Glu Trp Leu Lys Arg Gln Lys Arg Asn Lys Ile Pro Tyr
 355 360 365
 Ser Phe Phe Lys Thr Ala Leu Asp Asp Arg Lys Glu Gly Ala Val Leu
 370 375 380
 Ala Lys Lys Val Asn Trp Ile Gly Cys Gln Gly Ser Glu Pro His Phe
 385 390 395 400
 Arg Gly Phe Pro Cys Ser Leu Trp Val Leu Phe His Phe Leu Thr Val
 405 410 415
 Gln Ala Ala Arg Gln Asn Val Asp His Ser Gln Glu Ala Ala Lys Ala
 420 425 430
 Lys Glu Val Leu Pro Ala Ile Arg Gly Tyr Val His Tyr Phe Phe Gly
 435 440 445
 Cys Arg Asp Cys Ala Ser His Phe Glu Gln Met Ala Ala Ala Ser Met
 450 455 460
 His Arg Val Gly Ser Pro Asn Ala Ala Val Leu Trp Leu Trp Ser Ser
 465 470 475 480

ES 2 691 931 T3

His Asn Arg Val Asn Ala Arg Leu Ala Gly Ala Pro Ser Glu Asp Pro
 485 490 495
 Gln Phe Pro Lys Val Gln Trp Pro Pro Arg Glu Leu Cys Ser Ala Cys
 500 505 510
 His Asn Glu Arg Leu Asp Val Pro Val Trp Asp Val Glu Ala Thr Leu
 515 520 525
 Asn Phe Leu Lys Ala His Phe Ser Pro Ser Asn Ile Ile Leu Asp Phe
 530 535 540
 Pro Ala Ala Gly Ser Ala Ala Arg Arg Asp Val Gln Asn Val Ala Ala
 545 550 555 560
 Ala Pro Glu Leu Ala Met Gly Ala Leu Glu Leu Glu Ser Arg Asn Ser
 565 570 575
 Thr Leu Asp Pro Gly Lys Pro Glu Met Met Lys Ser Pro Thr Asn Thr
 580 585 590
 Thr Pro His Val Pro Ala Glu Gly Pro Glu Ala Ser Arg Pro Pro Lys
 595 600 605
 Leu His Pro Gly Leu Arg Ala Ala Pro Gly Gln Glu Pro Pro Glu His
 610 615 620
 Met Ala Glu Leu Gln Arg Asn Glu Gln Glu Gln Pro Leu Gly Gln Trp
 625 630 635 640
 His Leu Ser Lys Arg Asp Thr Gly Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ser Arg
 645 650 655
 Ala Glu Lys Asn Arg Leu Trp Gly Pro Leu Glu Val Arg Arg Val Gly
 660 665 670
 Arg Ser Ser Lys Gln Leu Val Asp Ile Pro Glu Gly Gln Leu Glu Ala
 675 680 685
 Arg Ala Gly Arg Gly Arg Gly Gln Trp Leu Gln Val Leu Gly Gly Gly
 690 695 700
 Phe Ser Tyr Leu Asp Ile Ser Leu Cys Val Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 705 710 715 720
 Phe Met Gly Leu Leu Ala Met Tyr Thr Tyr Phe Gln Ala Lys Ile Arg
 725 730 735
 Ala Leu Lys Gly His Ala Gly His Pro Ala Ala
 740 745

<210> 37

<211> 747

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Producto de la escisión con tripsina de QSOX1 (Banda superior)

ES 2 691 931 T3

<400> 37

Met	Arg	Arg	Cys	Asn	Ser	Gly	Ser	Gly	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	1	5	10	15
Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Leu	Ala	Val	Pro	Gly	Ala	Asn	Ala	Ala	Pro	Arg	20	25	30	
Ser	Ala	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Ala	Asp	35	40	45	
Thr	Val	Arg	Gly	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Arg	Ser	Ala	Trp	Ala	Val	Glu	50	55	60	
Phe	Phe	Ala	Ser	Trp	Cys	Gly	His	Cys	Ile	Ala	Phe	Ala	Pro	Thr	Trp	65	70	75	80
Lys	Ala	Leu	Ala	Glu	Asp	Val	Lys	Ala	Trp	Arg	Pro	Ala	Leu	Tyr	Leu	85	90	95	
Ala	Ala	Leu	Asp	Cys	Ala	Glu	Glu	Thr	Asn	Ser	Ala	Val	Cys	Arg	Asp	100	105	110	
Phe	Asn	Ile	Pro	Gly	Phe	Pro	Thr	Val	Arg	Phe	Phe	Lys	Ala	Phe	Thr	115	120	125	
Lys	Asn	Gly	Ser	Gly	Ala	Val	Phe	Pro	Val	Ala	Gly	Ala	Asp	Val	Gln	130	135	140	
Thr	Leu	Arg	Glu	Arg	Leu	Ile	Asp	Ala	Leu	Glu	Ser	His	His	Asp	Thr	145	150	155	160
Trp	Pro	Pro	Ala	Cys	Pro	Pro	Leu	Glu	Pro	Ala	Lys	Leu	Glu	Glu	Ile	165	170	175	
Asp	Gly	Phe	Phe	Ala	Arg	Asn	Asn	Glu	Glu	Tyr	Leu	Ala	Leu	Ile	Phe	180	185	190	

ES 2 691 931 T3

Glu Lys Gly Gly Ser Tyr Leu Gly Arg Glu Val Ala Leu Asp Leu Ser
 195 200 205
 Gln His Lys Gly Val Ala Val Arg Arg Val Leu Asn Thr Glu Ala Asn
 210 215 220
 Val Val Arg Lys Phe Gly Val Thr Asp Phe Pro Ser Cys Tyr Leu Leu
 225 230 235 240
 Phe Arg Asn Gly Ser Val Ser Arg Val Pro Val Leu Met Glu Ser Arg
 245 250 255
 Ser Phe Tyr Thr Ala Tyr Leu Gln Arg Leu Ser Gly Leu Thr Arg Glu
 260 265 270
 Ala Ala Gln Thr Thr Val Ala Pro Thr Thr Ala Asn Lys Ile Ala Pro
 275 280 285
 Thr Val Trp Lys Leu Ala Asp Arg Ser Lys Ile Tyr Met Ala Asp Leu
 290 295 300
 Glu Ser Ala Leu His Tyr Ile Leu Arg Ile Glu Val Gly Arg Phe Pro
 305 310 315 320
 Val Leu Glu Gly Gln Arg Leu Val Ala Leu Lys Lys Phe Val Ala Val
 325 330 335
 Leu Ala Lys Tyr Phe Pro Gly Arg Pro Leu Val Gln Asn Phe Leu His
 340 345 350
 Ser Val Asn Glu Trp Leu Lys Arg Gln Lys Arg Asn Lys Ile Pro Tyr
 355 360 365
 Ser Phe Phe Lys Thr Ala Leu Asp Asp Arg Lys Glu Gly Ala Val Leu
 370 375 380
 Ala Lys Lys Val Asn Trp Ile Gly Cys Gln Gly Ser Glu Pro His Phe
 385 390 395 400
 Arg Gly Phe Pro Cys Ser Leu Trp Val Leu Phe His Phe Leu Thr Val
 405 410 415
 Gln Ala Ala Arg Gln Asn Val Asp His Ser Gln Glu Ala Ala Lys Ala
 420 425 430
 Lys Glu Val Leu Pro Ala Ile Arg Gly Tyr Val His Tyr Phe Phe Gly
 435 440 445

ES 2 691 931 T3

Cys	Arg	Asp	Cys	Ala	Ser	His	Phe	Glu	Gln	Met	Ala	Ala	Ala	Ser	Met
450						455					460				
His	Arg	Val	Gly	Ser	Pro	Asn	Ala	Ala	Val	Leu	Trp	Leu	Trp	Ser	Ser
465					470					475					480
His	Asn	Arg	Val	Asn	Ala	Arg	Leu	Ala	Gly	Ala	Pro	Ser	Glu	Asp	Pro
				485					490					495	
Gln	Phe	Pro	Lys	Val	Gln	Trp	Pro	Pro	Arg	Glu	Leu	Cys	Ser	Ala	Cys
			500					505						510	
His	Asn	Glu	Arg	Leu	Asp	Val	Pro	Val	Trp	Asp	Val	Glu	Ala	Thr	Leu
		515					520					525			
Asn	Phe	Leu	Lys	Ala	His	Phe	Ser	Pro	Ser	Asn	Ile	Ile	Leu	Asp	Phe
	530					535					540				
Pro	Ala	Ala	Gly	Ser	Ala	Ala	Arg	Arg	Asp	Val	Gln	Asn	Val	Ala	Ala
545					550					555					560
Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Met	Gly	Ala	Leu	Glu	Leu	Glu	Ser	Arg	Asn	Ser
				565					570					575	
Thr	Leu	Asp	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Met	Met	Lys	Ser	Pro	Thr	Asn	Thr
			580					585						590	
Thr	Pro	His	Val	Pro	Ala	Glu	Gly	Pro	Glu	Ala	Ser	Arg	Pro	Pro	Lys
		595					600					605			
Leu	His	Pro	Gly	Leu	Arg	Ala	Ala	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Pro	Glu	His
	610					615					620				
Met	Ala	Glu	Leu	Gln	Arg	Asn	Glu	Gln	Glu	Gln	Pro	Leu	Gly	Gln	Trp
625					630					635					640
His	Leu	Ser	Lys	Arg	Asp	Thr	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Glu	Ser	Arg
				645					650					655	
Ala	Glu	Lys	Asn	Arg	Leu	Trp	Gly	Pro	Leu	Glu	Val	Arg	Arg	Val	Gly
			660					665					670		
Arg	Ser	Ser	Lys	Gln	Leu	Val	Asp	Ile	Pro	Glu	Gly	Gln	Leu	Glu	Ala
		675					680					685			
Arg	Ala	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Gln	Trp	Leu	Gln	Val	Leu	Gly	Gly	Gly

ES 2 691 931 T3

690 695 700

Phe Ser Tyr Leu Asp Ile Ser Leu Cys Val Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
705 710 715 720

Phe Met Gly Leu Leu Ala Met Tyr Thr Tyr Phe Gln Ala Lys Ile Arg
725 730 735

Ala Leu Lys Gly His Ala Gly His Pro Ala Ala
740 745

<210> 38

<211> 747

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Producto de la escisión con quimiotripsina de QSOX1 (Banda superior)

<400> 38

Met Arg Arg Cys Asn Ser Gly Ser Gly Pro Pro Pro Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Trp Leu Leu Ala Val Pro Gly Ala Asn Ala Ala Pro Arg
20 25 30

Ser Ala Leu Tyr Ser Pro Ser Asp Pro Leu Thr Leu Leu Gln Ala Asp
35 40 45

Thr Val Arg Gly Ala Val Leu Gly Ser Arg Ser Ala Trp Ala Val Glu
50 55 60

Phe Phe Ala Ser Trp Cys Gly His Cys Ile Ala Phe Ala Pro Thr Trp
65 70 75 80

Lys Ala Leu Ala Glu Asp Val Lys Ala Trp Arg Pro Ala Leu Tyr Leu
85 90 95

Ala Ala Leu Asp Cys Ala Glu Glu Thr Asn Ser Ala Val Cys Arg Asp
100 105 110

Phe Asn Ile Pro Gly Phe Pro Thr Val Arg Phe Phe Lys Ala Phe Thr
115 120 125

Lys Asn Gly Ser Gly Ala Val Phe Pro Val Ala Gly Ala Asp Val Gln
130 135 140

Thr Leu Arg Glu Arg Leu Ile Asp Ala Leu Glu Ser His His Asp Thr
145 150 155 160

ES 2 691 931 T3

Trp Pro Pro Ala Cys Pro Pro Leu Glu Pro Ala Lys Leu Glu Glu Ile
 165 170 175
 Asp Gly Phe Phe Ala Arg Asn Asn Glu Glu Tyr Leu Ala Leu Ile Phe
 180 185 190
 Glu Lys Gly Gly Ser Tyr Leu Gly Arg Glu Val Ala Leu Asp Leu Ser
 195 200 205
 Gln His Lys Gly Val Ala Val Arg Arg Val Leu Asn Thr Glu Ala Asn
 210 215 220
 Val Val Arg Lys Phe Gly Val Thr Asp Phe Pro Ser Cys Tyr Leu Leu
 225 230 235 240
 Phe Arg Asn Gly Ser Val Ser Arg Val Pro Val Leu Met Glu Ser Arg
 245 250 255
 Ser Phe Tyr Thr Ala Tyr Leu Gln Arg Leu Ser Gly Leu Thr Arg Glu
 260 265 270
 Ala Ala Gln Thr Thr Val Ala Pro Thr Thr Ala Asn Lys Ile Ala Pro
 275 280 285
 Thr Val Trp Lys Leu Ala Asp Arg Ser Lys Ile Tyr Met Ala Asp Leu
 290 295 300
 Glu Ser Ala Leu His Tyr Ile Leu Arg Ile Glu Val Gly Arg Phe Pro
 305 310 315 320
 Val Leu Glu Gly Gln Arg Leu Val Ala Leu Lys Lys Phe Val Ala Val
 325 330 335
 Leu Ala Lys Tyr Phe Pro Gly Arg Pro Leu Val Gln Asn Phe Leu His
 340 345 350
 Ser Val Asn Glu Trp Leu Lys Arg Gln Lys Arg Asn Lys Ile Pro Tyr
 355 360 365
 Ser Phe Phe Lys Thr Ala Leu Asp Asp Arg Lys Glu Gly Ala Val Leu
 370 375 380
 Ala Lys Lys Val Asn Trp Ile Gly Cys Gln Gly Ser Glu Pro His Phe
 385 390 395 400
 Arg Gly Phe Pro Cys Ser Leu Trp Val Leu Phe His Phe Leu Thr Val

ES 2 691 931 T3

405				410				415							
Gln	Ala	Ala	Arg 420	Gln	Asn	Val	Asp	His 425	Ser	Gln	Glu	Ala	Ala 430	Lys	Ala
Lys	Glu	Val 435	Leu	Pro	Ala	Ile	Arg 440	Gly	Tyr	Val	His	Tyr 445	Phe	Phe	Gly
Cys	Arg 450	Asp	Cys	Ala	Ser	His 455	Phe	Glu	Gln	Met	Ala 460	Ala	Ala	Ser	Met
His 465	Arg	Val	Gly	Ser	Pro 470	Asn	Ala	Ala	Val	Leu 475	Trp	Leu	Trp	Ser	Ser 480
His	Asn	Arg	Val	Asn 485	Ala	Arg	Leu	Ala	Gly 490	Ala	Pro	Ser	Glu	Asp 495	Pro
Gln	Phe	Pro	Lys 500	Val	Gln	Trp	Pro	Pro 505	Arg	Glu	Leu	Cys	Ser	Ala	Cys
His	Asn	Glu 515	Arg	Leu	Asp	Val	Pro 520	Val	Trp	Asp	Val	Glu 525	Ala	Thr	Leu
Asn	Phe 530	Leu	Lys	Ala	His	Phe 535	Ser	Pro	Ser	Asn	Ile 540	Ile	Leu	Asp	Phe
Pro 545	Ala	Ala	Gly	Ser	Ala 550	Ala	Arg	Arg	Asp	Val 555	Gln	Asn	Val	Ala	Ala 560
Ala	Pro	Glu	Leu	Ala 565	Met	Gly	Ala	Leu	Glu 570	Leu	Glu	Ser	Arg	Asn 575	Ser
Thr	Leu	Asp 580	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu 585	Met	Met	Lys	Ser	Pro	Thr 590	Asn	Thr
Thr	Pro	His 595	Val	Pro	Ala	Glu	Gly 600	Pro	Glu	Ala	Ser	Arg 605	Pro	Pro	Lys
Leu	His 610	Pro	Gly	Leu	Arg	Ala 615	Ala	Pro	Gly	Gln	Glu 620	Pro	Pro	Glu	His
Met 625	Ala	Glu	Leu	Gln	Arg 630	Asn	Glu	Gln	Glu	Gln 635	Pro	Leu	Gly	Gln	Trp 640
His	Leu	Ser	Lys	Arg 645	Asp	Thr	Gly	Ala	Ala 650	Leu	Leu	Ala	Glu	Ser 655	Arg

ES 2 691 931 T3

Ala Glu Lys Asn Arg Leu Trp Gly Pro Leu Glu Val Arg Arg Val Gly
660 665 670

Arg Ser Ser Lys Gln Leu Val Asp Ile Pro Glu Gly Gln Leu Glu Ala
675 680 685

Arg Ala Gly Arg Gly Arg Gly Gln Trp Leu Gln Val Leu Gly Gly Gly
690 695 700

Phe Ser Tyr Leu Asp Ile Ser Leu Cys Val Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
705 710 715 720

Phe Met Gly Leu Leu Ala Met Tyr Thr Tyr Phe Gln Ala Lys Ile Arg
725 730 735

Ala Leu Lys Gly His Ala Gly His Pro Ala Ala
740 745

<210> 39

<211> 36

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 39

ggtcagtaca tatgtcggcg ctctattcgc cttccg 36

10 <210> 40

<211> 38

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 40

tatgtggatc cttatgcagg gaagtcagg atgatgtt 38

<210> 41

<211> 613

20 <212> PRT

<213> Cavia porcellus

<400> 41

Met Thr Gly Cys Gly Arg Arg Ser Gly Trp Leu Pro Pro Leu Arg Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Gly Gly Pro Gly Val Gly Ala Ala Gln
20 25 30

ES 2 691 931 T3

Leu Ala Ala Leu Tyr Ser Ala Ser Asp Pro Leu Thr Leu Leu Gln Ala
 35 40 45
 Asp Thr Val Arg Ser Thr Val Leu Asn Ser Pro Ser Ala Trp Ala Val
 50 55 60
 Glu Phe Phe Ala Ser Trp Cys Gly His Cys Ile Ala Phe Ala Pro Thr
 65 70 75 80
 Trp Lys Ala Leu Ala Lys Asp Ile Lys Asp Trp Arg Pro Ala Leu Asn
 85 90 95
 Leu Ala Ala Leu Asn Cys Ala Asp Glu Thr Asn Asn Ala Val Cys Arg
 100 105 110
 Asp Phe Asn Ile Ala Gly Phe Pro Ser Val Arg Phe Phe Lys Ala Phe
 115 120 125
 Ser Lys Asn Ser Thr Gly Thr Thr Leu Pro Val Ala Gly Ala Asn Val
 130 135 140
 Gln Met Leu Arg Glu Arg Leu Ile Asp Ala Leu Glu Ser His His Asp
 145 150 155 160
 Thr Trp Pro Ser Ala Cys Pro Pro Leu Glu Pro Val Lys Pro Lys Glu
 165 170 175
 Ile Asp Thr Phe Phe Ala Arg Asn Asn Gln Glu Tyr Leu Val Leu Ile
 180 185 190
 Phe Glu Gln Glu Asn Ser Tyr Leu Gly Arg Glu Val Thr Leu Asp Leu
 195 200 205
 Ser Gln His His Asp Leu Val Val Arg Arg Val Leu Ser Thr Glu Ala
 210 215 220
 Asn Val Val Arg Lys Phe Gly Val Ala Asp Phe Pro Ser Cys Tyr Leu
 225 230 235 240
 Leu Phe Arg Asn Gly Ser Val Ser Arg Val Pro Val Leu Val Glu Ser
 245 250 255
 Arg Arg Phe Tyr Thr Ala Tyr Leu Gln Arg Leu Ser Glu Val Thr Arg
 260 265 270
 Glu Gly Thr Pro Thr Pro Ala Val Pro Thr Ile Ser Asp Gln Ile Ala
 275 280 285

ES 2 691 931 T3

Pro Thr Val Trp Lys Phe Ala Asp Arg Ser Lys Ile Tyr Met Ala Asp
 290 295 300
 Leu Glu Ser Ala Leu His Tyr Ile Leu Arg Val Glu Val Gly Arg Phe
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Glu Gly Gln Arg Leu Met Ala Leu Lys Lys Phe Val Thr
 325 330 335
 Val Leu Thr Lys Tyr Phe Pro Gly Gln Pro Leu Val Arg Asn Phe Leu
 340 345 350
 Gln Ser Thr Asn Glu Trp Leu Lys Arg Gln His Lys Lys Lys Met Pro
 355 360 365
 Tyr Ser Phe Phe Lys Thr Ala Met Asp Ser Arg Asn Glu Glu Ala Val
 370 375 380
 Ile Thr Lys Glu Val Asn Trp Val Gly Cys Gln Gly Ser Glu Ser His
 385 390 395 400
 Phe Arg Gly Phe Pro Cys Ser Leu Trp Ile Leu Phe His Phe Leu Thr
 405 410 415
 Val Gln Ala Ser Gln Lys Asn Ala Glu Ser Ser Gln Lys Pro Ala Asn
 420 425 430
 Gly Gln Glu Val Leu Gln Ala Ile Arg Asn Tyr Val Arg Phe Phe Phe
 435 440 445
 Gly Cys Arg Asp Cys Ala Asn His Phe Glu Gln Met Ala Ala Gly Ser
 450 455 460
 Met His Arg Val Lys Ser Pro Asn Asp Ala Val Leu Trp Leu Trp Thr
 465 470 475 480
 Ser His Asn Arg Val Asn Ala Arg Leu Ala Gly Ala Pro Ser Glu Asp
 485 490 495
 Pro Gln Phe Pro Lys Val Gln Trp Pro Pro Pro Glu Leu Cys Ser Ala
 500 505 510
 Cys His Asn Glu Leu Ser Gly Glu Pro Val Trp Asp Val Asp Ala Thr
 515 520 525
 Leu Arg Phe Leu Lys Thr His Phe Ser Pro Ser Asn Ile Val Leu Asn
 530 535 540

ES 2 691 931 T3

Phe Pro Pro Ala Glu Pro Ala Ser Arg Ser Ser Val His Ser Trp Gly
545 550 555 560

Ala Thr Pro His Leu Glu Leu Asp Ala Leu Gly Leu Val Thr Arg Asn
565 570 575

Ser Ala Leu Ala Leu Glu Arg Ala Glu Ile Ser Glu Ser Pro Gly Ser
580 585 590

Asn Ala Met Pro Asn Ile Pro Ala Glu Arg Pro Glu Leu Phe Glu Ala
595 600 605

Leu Ser His Ser Arg
610

<210> 42

<211> 750

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 42

Met Arg Arg Cys Gly Arg His Ser Gly Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Ser Val Pro Gly Ala Tyr Ala
20 25 30

Ala Arg Leu Ser Val Leu Tyr Ser Ser Ser Asp Pro Leu Thr Leu Leu
35 40 45

Asp Ala Asp Thr Val Arg Pro Ala Val Leu Gly Ser Ser Ser Ala Trp
50 55 60

Ala Val Glu Phe Phe Ala Ser Trp Cys Gly His Cys Ile Ala Phe Ala
65 70 75 80

Pro Thr Trp Lys Glu Leu Ala Asn Asp Val Lys Asp Trp Arg Pro Ala
85 90 95

Leu Asn Leu Ala Val Leu Asp Cys Ala Asp Glu Thr Asn Ser Ala Val
100 105 110

Cys Arg Glu Phe Asn Ile Ala Gly Phe Pro Thr Val Arg Phe Phe Lys
115 120 125

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

ES 2 691 931 T3

Asn	Val	Gln	Thr	Leu	Arg	Met	Arg	Leu	Ile	Asp	Ala	Leu	Glu	Ser	His
145					150					155					160
Arg	Asp	Thr	Trp	Pro	Pro	Ala	Cys	Pro	Pro	Leu	Glu	Pro	Ala	Lys	Leu
				165					170					175	
Lys	Asp	Ile	Asn	Glu	Phe	Phe	Thr	Arg	Ser	Lys	Ala	Glu	Tyr	Leu	Ala
			180					185					190		
Leu	Ile	Phe	Glu	Arg	Glu	Asp	Ser	Tyr	Leu	Gly	Arg	Glu	Val	Thr	Leu
		195					200					205			
Asp	Leu	Ser	Gln	Phe	His	Ala	Val	Ala	Val	Arg	Arg	Val	Leu	Asn	Ser
210						215					220				
Glu	Ser	Asp	Val	Val	Ser	Lys	Phe	Ala	Val	Thr	Asp	Phe	Pro	Ser	Cys
225					230					235					240
Tyr	Leu	Leu	Leu	Arg	Asn	Gly	Ser	Val	Ser	Arg	Val	Pro	Val	Leu	Val
				245					250					255	
Glu	Ser	Arg	Pro	Phe	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Arg	Gly	Leu	Pro	Gly	Leu
			260					265					270		
Thr	Arg	Glu	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Ala	Pro	Val	Thr	Pro	Asp	Lys
		275						280					285		
Ile	Ala	Pro	Thr	Val	Trp	Lys	Phe	Ala	Asp	Arg	Ser	Lys	Ile	Tyr	Met
290						295					300				
Ala	Asp	Leu	Glu	Ser	Ala	Leu	His	Tyr	Ile	Leu	Arg	Val	Glu	Val	Gly
305					310					315					320
Lys	Phe	Ser	Val	Leu	Glu	Gly	Gln	Arg	Leu	Val	Ala	Leu	Lys	Lys	Phe
				325					330					335	
Val	Ala	Val	Leu	Ala	Lys	Tyr	Phe	Pro	Gly	Gln	Pro	Leu	Val	Gln	Asn
			340					345					350		
Phe	Leu	His	Ser	Ile	Asn	Asp	Trp	Leu	Gln	Lys	Gln	Gln	Lys	Lys	Lys
		355					360					365			
Ile	Pro	Tyr	Ser	Tyr	Phe	Lys	Ala	Ala	Leu	Asp	Ser	Arg	Lys	Glu	Asn
370						375					380				
Ala	Val	Leu	Ala	Glu	Lys	Val	Asn	Trp	Ile	Gly	Cys	Gln	Gly	Ser	Glu

ES 2 691 931 T3

385		390		395		400									
Pro	His	Phe	Arg	Gly	Phe	Pro	Cys	Ser	Leu	Trp	Val	Leu	Phe	His	Phe
				405					410					415	
Leu	Thr	Val	Gln	Ala	His	Arg	Tyr	Ser	Glu	Ala	His	Pro	Gln	Glu	Pro
			420					425					430		
Ala	Asp	Gly	Gln	Glu	Val	Leu	Gln	Ala	Met	Arg	Ser	Tyr	Val	Gln	Ser
		435						440				445			
Phe	Phe	Gly	Cys	Arg	Asp	Cys	Ala	Asn	His	Phe	Glu	Gln	Met	Ala	Ala
	450					455					460				
Ala	Ser	Met	His	Gln	Val	Lys	Ser	Pro	Ser	Asn	Ala	Val	Leu	Trp	Leu
	465					470				475					480
Trp	Thr	Ser	His	Asn	Arg	Val	Asn	Ala	Arg	Leu	Ser	Gly	Ala	Leu	Ser
				485					490					495	
Glu	Asp	Pro	Gln	Phe	Pro	Lys	Val	Gln	Trp	Pro	Pro	Arg	Glu	Leu	Cys
			500					505					510		
Ser	Ala	Cys	His	Asn	Glu	Val	Asn	Gly	Gln	Val	Pro	Leu	Trp	Asp	Leu
		515						520				525			
Gly	Ala	Thr	Leu	Asn	Phe	Leu	Lys	Ala	His	Phe	Ser	Pro	Ala	Asn	Ile
	530					535					540				
Val	Arg	Asp	Pro	Pro	Ala	Pro	Gly	Pro	Ala	Ser	Arg	Arg	Gly	Thr	Gln
	545				550					555					560
Asp	Pro	Glu	Ala	Ser	Pro	Asn	Leu	Val	Met	Asp	Thr	Leu	Lys	Leu	Glu
				565					570				575		
Thr	Gly	Asn	Ser	Val	Leu	Gly	His	Glu	Gln	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Ser
			580					585					590		
Pro	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Asp	Val	Pro	Ala	Gly	Lys	Pro	Glu	Ala	Ser
		595						600				605			
Gly	Pro	Gln	Glu	Leu	Asn	Ala	Gly	Leu	Ser	Met	Gly	Gly	Ala	Ser	Pro
	610					615					620				
Gly	Gln	Gly	Pro	Pro	Glu	His	Thr	Glu	Glu	Leu	Leu	Arg	Asp	Val	Gln
	625				630					635					640

ES 2 691 931 T3

Glu Asn Ala Gln Gly Gln Gln His Leu Ser Lys Arg Asp Thr Glu Ala
645 650 655

Leu Leu Leu Pro Glu Val Asn His Leu Gln Gly Pro Leu Ala Pro Arg
660 665 670

Arg Gly Gly His Ser Pro Lys Gln Leu Ala Ser Ile Leu Glu Gly Glu
675 680 685

Pro Glu Ala Leu Ala Ile Gln Gly Arg Arg Gln Trp Leu Gln Val Leu
690 695 700

Gly Gly Gly Val Ser Phe Leu Asp Ile Ser Leu Cys Val Gly Leu Tyr
705 710 715 720

Ser Val Ser Phe Met Gly Leu Leu Ala Met Tyr Thr Tyr Phe Arg Ala
725 730 735

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

<210> 43

<211> 748

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 43

Met Arg Arg Cys Gly Arg Leu Ser Gly Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Pro Leu Leu Phe Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Ala
20 25 30

Ala Arg Leu Ser Val Leu Tyr Ser Ser Ser Asp Pro Leu Thr Leu Leu
35 40 45

Asp Ala Asp Ser Val Arg Pro Thr Val Leu Gly Ser Ser Ser Ala Trp
50 55 60

Ala Val Glu Phe Phe Ala Ser Trp Cys Gly His Cys Ile Ala Phe Ala
65 70 75 80

Pro Thr Trp Lys Glu Leu Ala Asn Asp Val Lys Asp Trp Arg Pro Ala
85 90 95

Leu Asn Leu Ala Val Leu Asp Cys Ala Glu Glu Thr Asn Ser Ala Val
100 105 110

ES 2 691 931 T3

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

ES 2 691 931 T3

Ile Pro Tyr Ser Phe Phe Lys Ala Ala Leu Asp Ser Arg Lys Glu Asp
 370 375 380
 Ala Val Leu Thr Glu Lys Val Asn Trp Val Gly Cys Gln Gly Ser Glu
 385 390 395 400
 Pro His Phe Arg Gly Phe Pro Cys Ser Leu Trp Val Leu Phe His Phe
 405 410 415
 Leu Thr Val Gln Ala Asn Arg Tyr Ser Glu Ala His Pro Gln Glu Pro
 420 425 430
 Ala Asp Gly Gln Glu Val Leu Gln Ala Met Arg Ser Tyr Val Gln Phe
 435 440 445
 Phe Phe Gly Cys Arg Asp Cys Ala Asp His Phe Glu Gln Met Ala Ala
 450 455 460
 Ala Ser Met His Gln Val Arg Ser Pro Ser Asn Ala Ile Leu Trp Leu
 465 470 475 480
 Trp Thr Ser His Asn Arg Val Asn Ala Arg Leu Ser Gly Ala Leu Ser
 485 490 495
 Glu Asp Pro His Phe Pro Lys Val Gln Trp Pro Pro Arg Glu Leu Cys
 500 505 510
 Ser Ala Cys His Asn Glu Leu Asn Gly Gln Val Pro Leu Trp Asp Leu
 515 520 525
 Gly Ala Thr Leu Asn Phe Leu Lys Ala His Phe Ser Pro Ala Asn Ile
 530 535 540
 Val Ile Asp Ser Ser Ala Ser Arg His Thr Gly Arg Arg Gly Ser Pro
 545 550 555 560
 Glu Ala Thr Pro Glu Leu Val Met Asp Thr Leu Lys Leu Glu Ser Arg
 565 570 575
 Asn Ser Val Leu Gly His Glu Gln Ala Ala Ser Ala Glu Ser Pro Gly
 580 585 590
 Ala Thr Ala Leu Asp Val Pro Ala Glu Lys Pro Glu Ala Ser Gly Pro
 595 600 605
 Gln Glu Leu Tyr Thr Gly Leu Arg Met Gly Gly Ala Ser Pro Gly Gln
 610 615 620

ES 2 691 931 T3

Gly	Pro	Pro	Glu	Arg	Met	Glu	Asp	His	Gln	Arg	Asp	Met	Gln	Glu	Asn	625	630	635	640
Ala	Pro	Gly	Gln	Gln	His	Leu	Ser	Lys	Arg	Asp	Thr	Glu	Ala	Leu	Phe	645	650	655	
Leu	Pro	Glu	Val	Asn	His	Leu	Gln	Gly	Pro	Leu	Glu	Leu	Arg	Arg	Gly	660	665	670	
Gly	Arg	Ser	Pro	Lys	Gln	Leu	Ala	Pro	Ile	Leu	Glu	Glu	Glu	Pro	Glu	675	680	685	
Ala	Leu	Ala	Ile	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Trp	Leu	Gln	Val	Leu	Gly	Gly	690	695	700	
Gly	Ile	Ser	His	Leu	Asp	Ile	Ser	Leu	Cys	Val	Gly	Leu	Tyr	Ser	Val	705	710	715	720
Ser	Phe	Met	Gly	Leu	Leu	Ala	Met	Tyr	Thr	Tyr	Phe	Arg	Ala	Arg	Leu	725	730	735	
Arg	Thr	Pro	Lys	Gly	His	Ala	Ser	Tyr	Pro	Thr	Ala	740	745						

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-QSOX1 que inhibe la actividad de QSOX1, para su uso en el tratamiento de un tumor o tumor sólido metastásico.

2. Un anticuerpo monoclonal aislado MAb492.1 que comprende CDR de las SEQ ID NO: 29-34.

5 3. Un anticuerpo monocatenario aislado scFV492.1 que comprende CDR de las SEQ ID NO: 29-34.

4. El anticuerpo monoclonal o monocatenario aislado de las reivindicaciones 2 o 3 o una cantidad terapéuticamente eficaz del mismo para su uso como un medicamento.

5. El anticuerpo monoclonal o monocatenario aislado de las reivindicaciones 2 o 3 o una cantidad terapéuticamente eficaz del mismo para su uso en el tratamiento de tumor o tumor sólido metastásico.

10

FIG. 1A

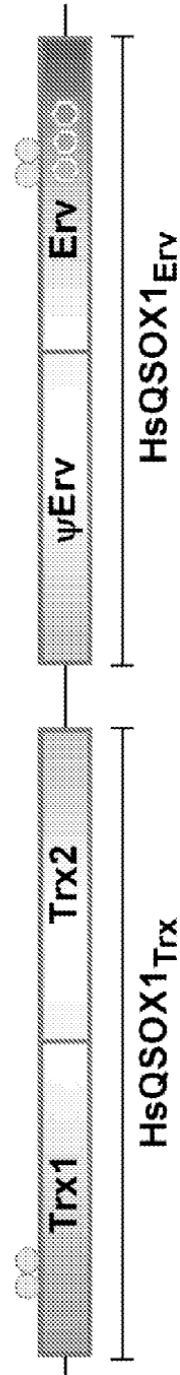
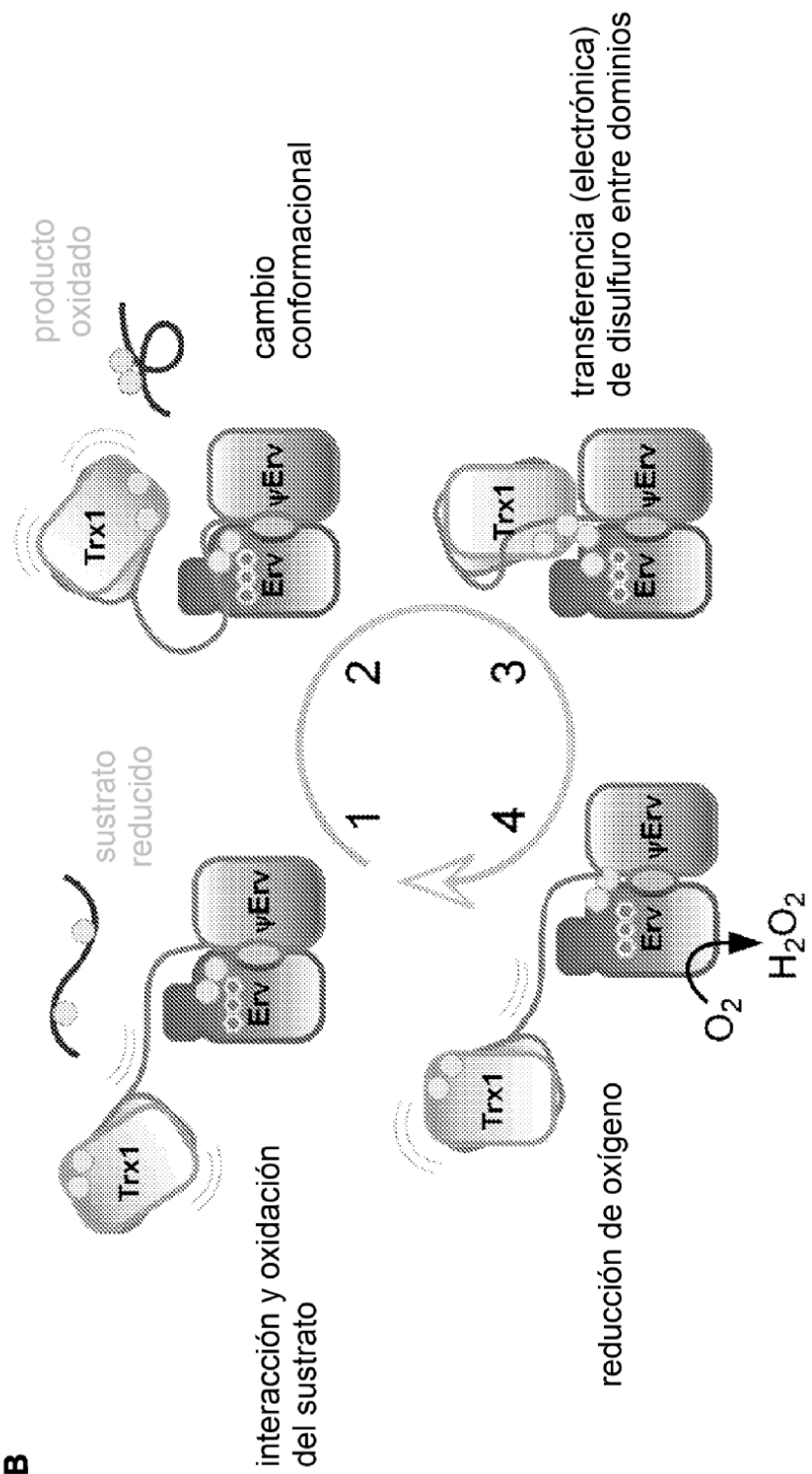
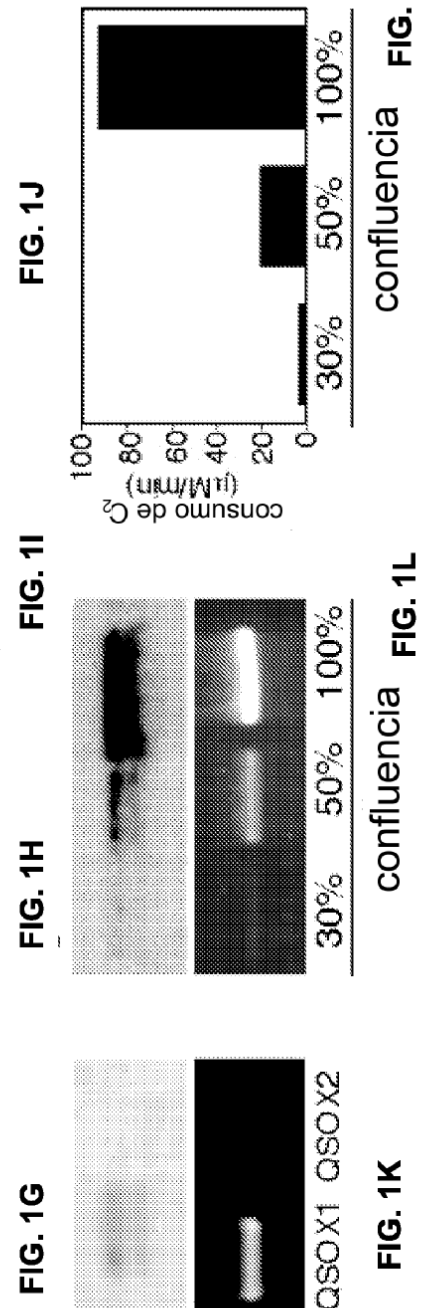
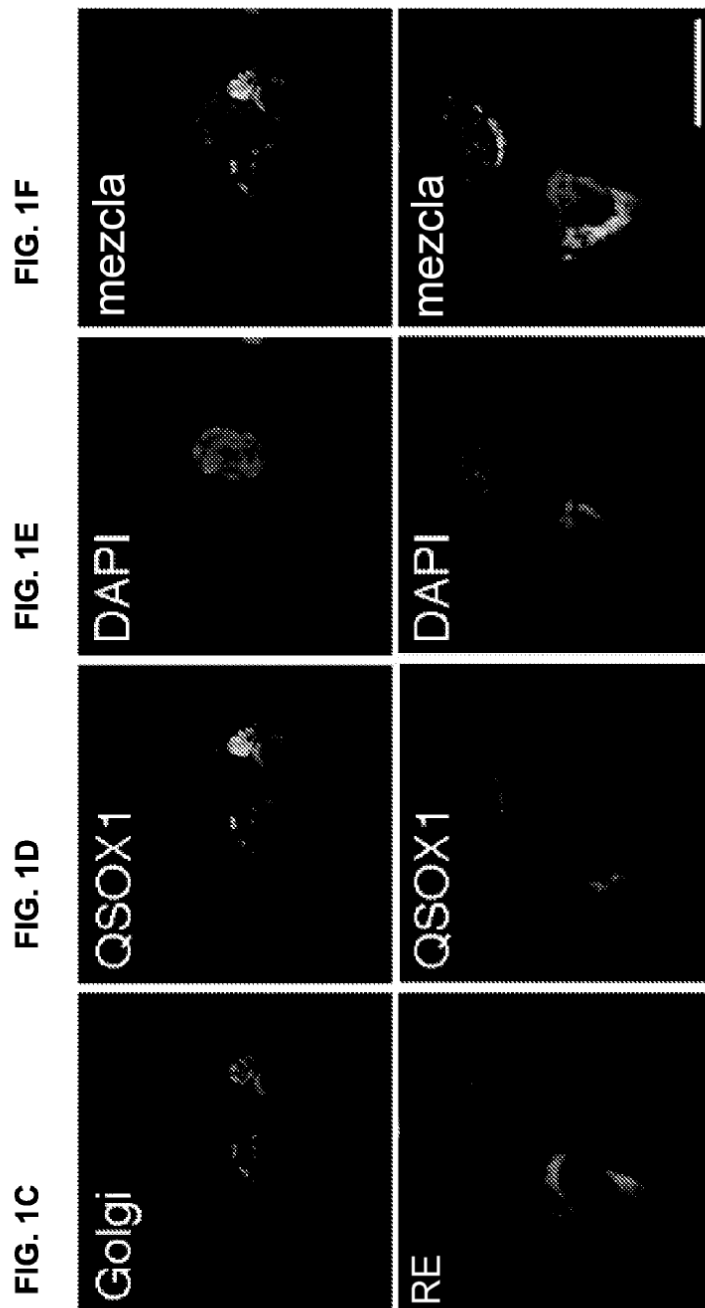
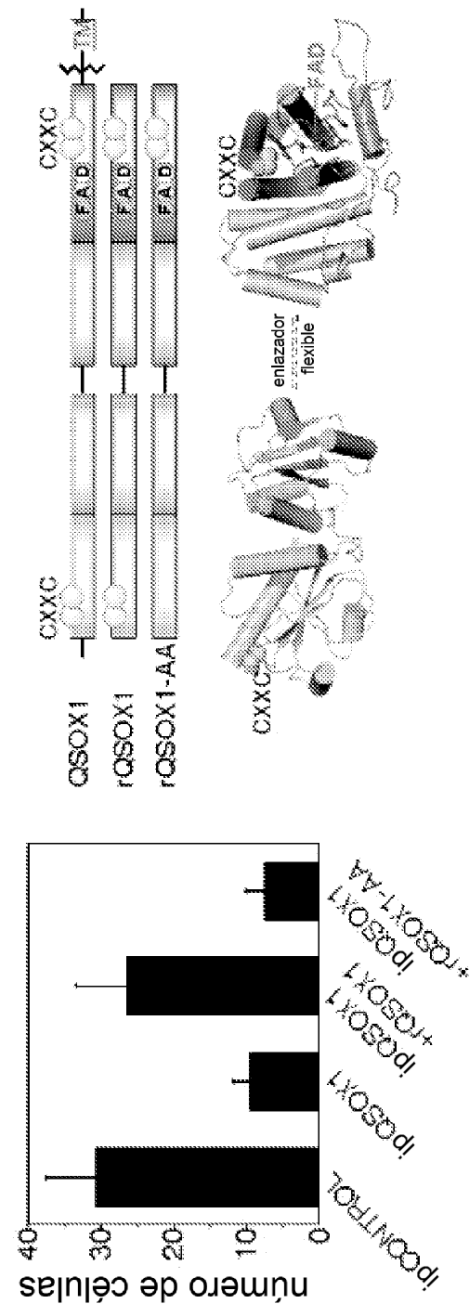
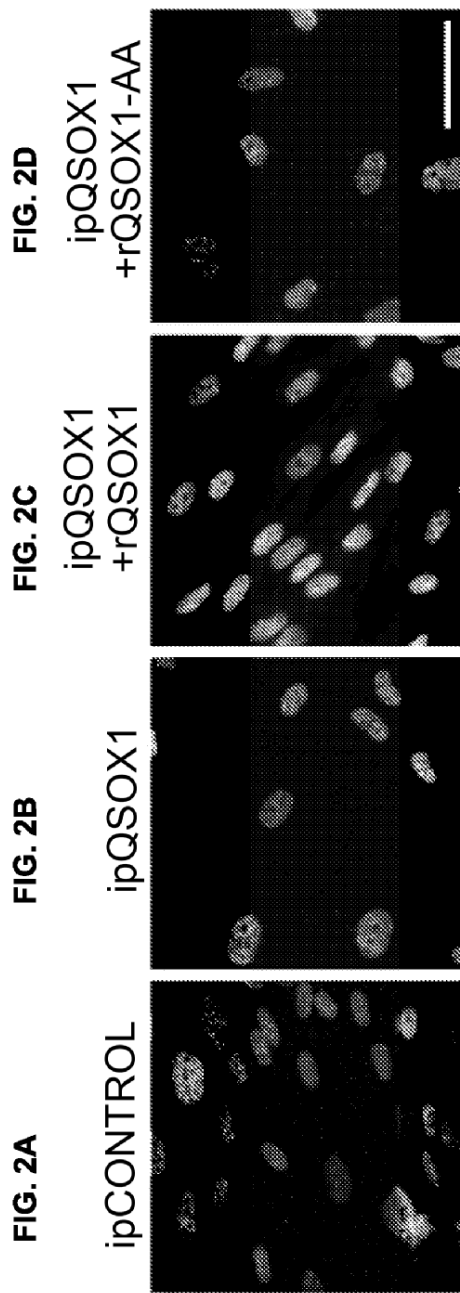


FIG. 1B







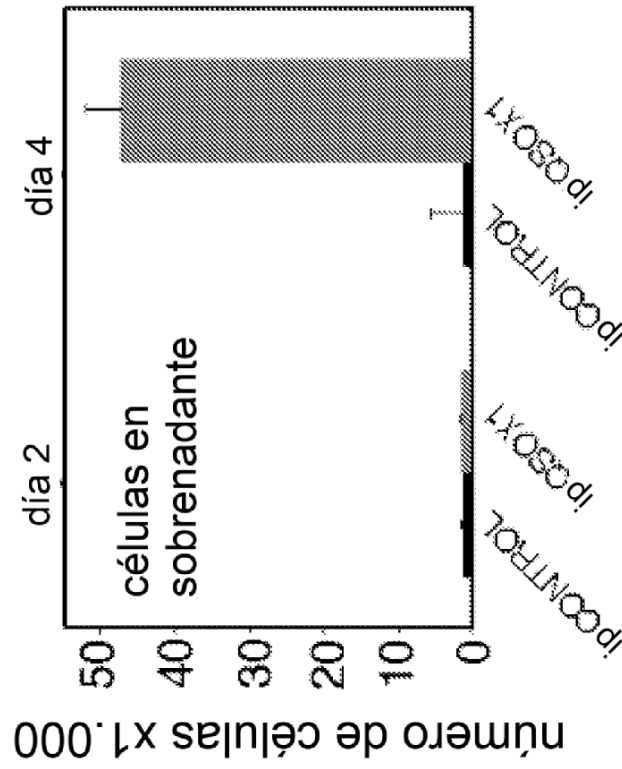


FIG. 2H

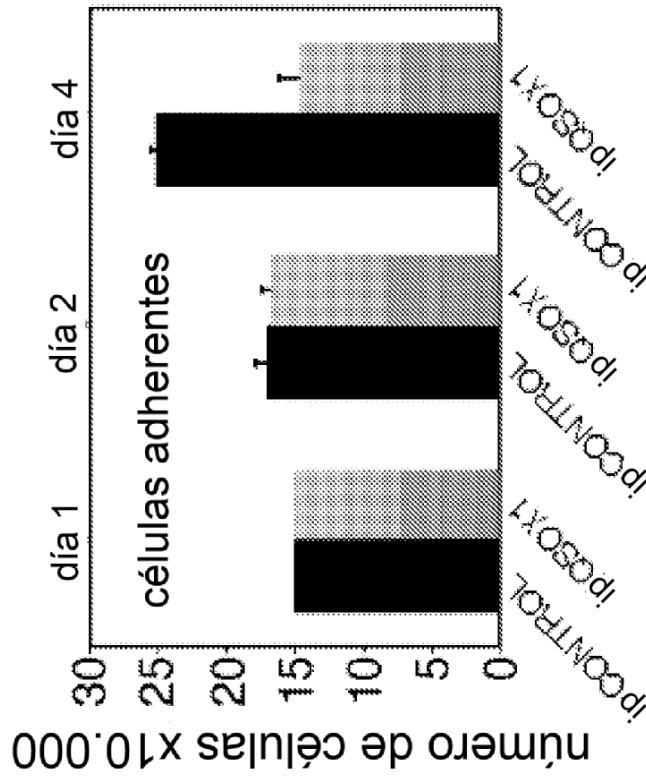


FIG. 2G

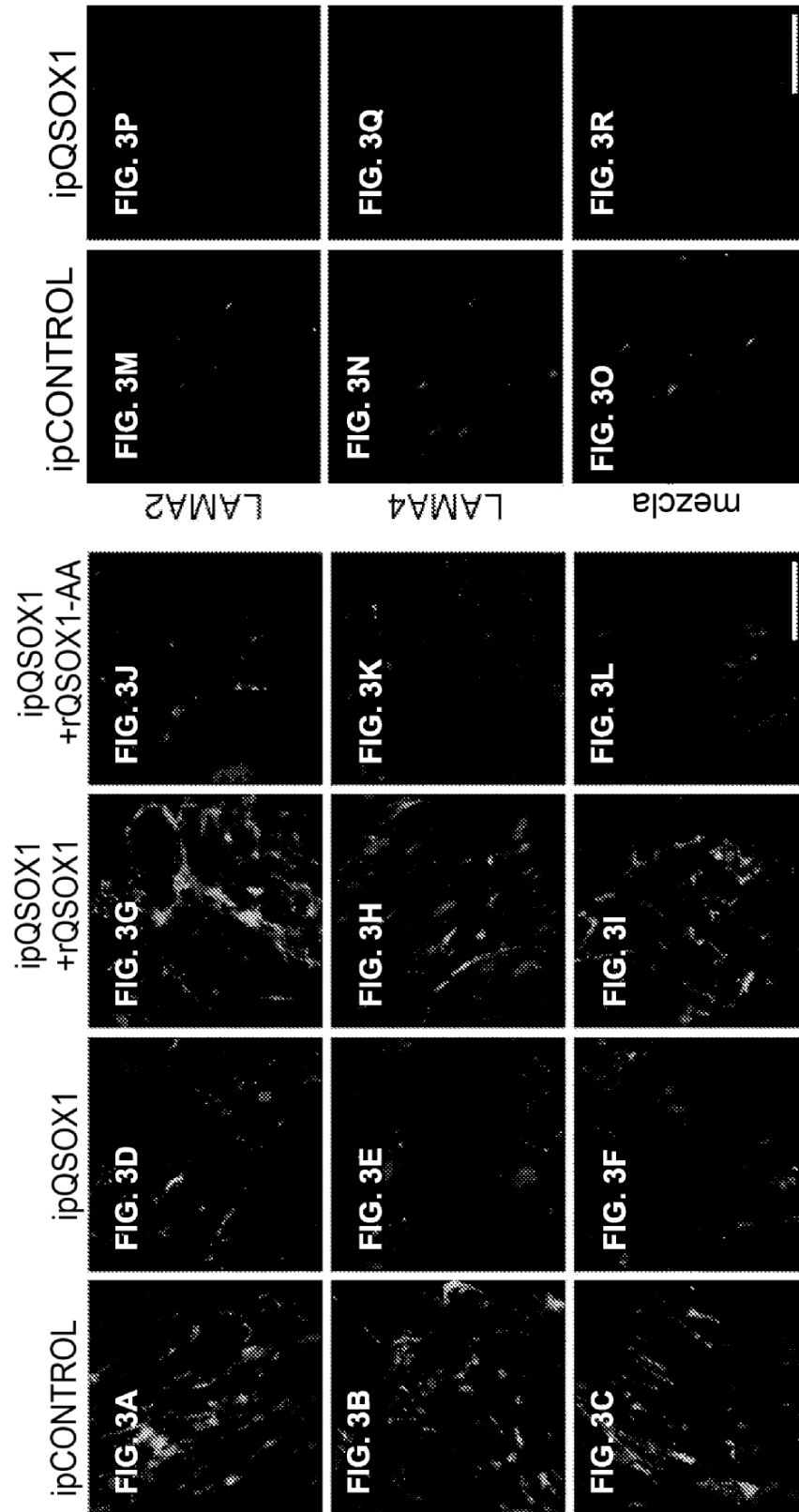


FIG. 4C

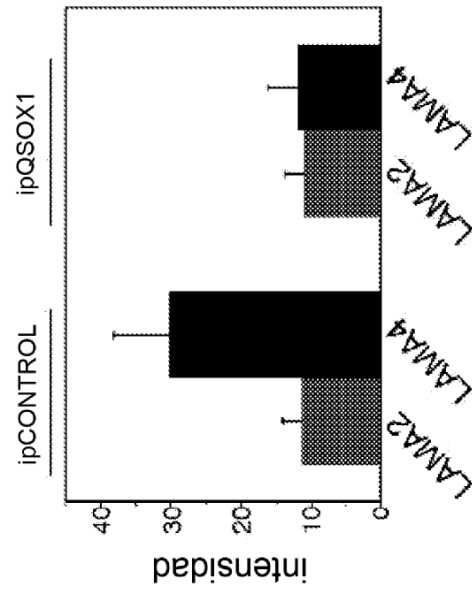


FIG. 4B

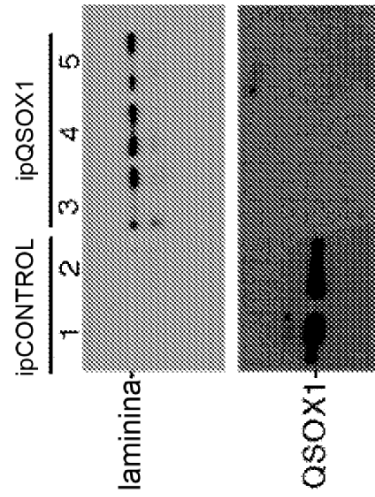
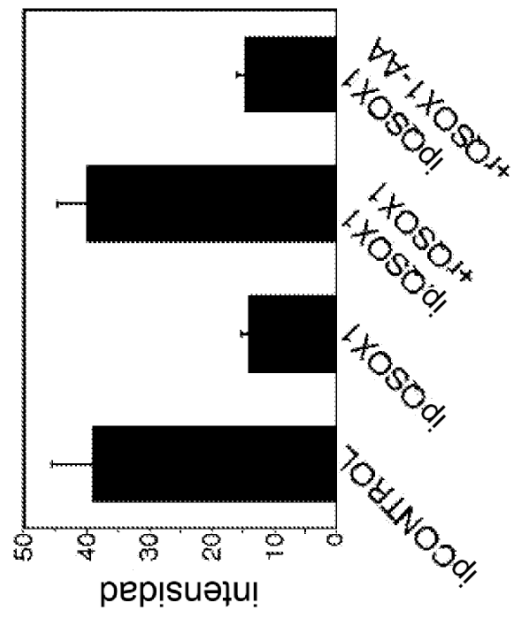


FIG. 4A



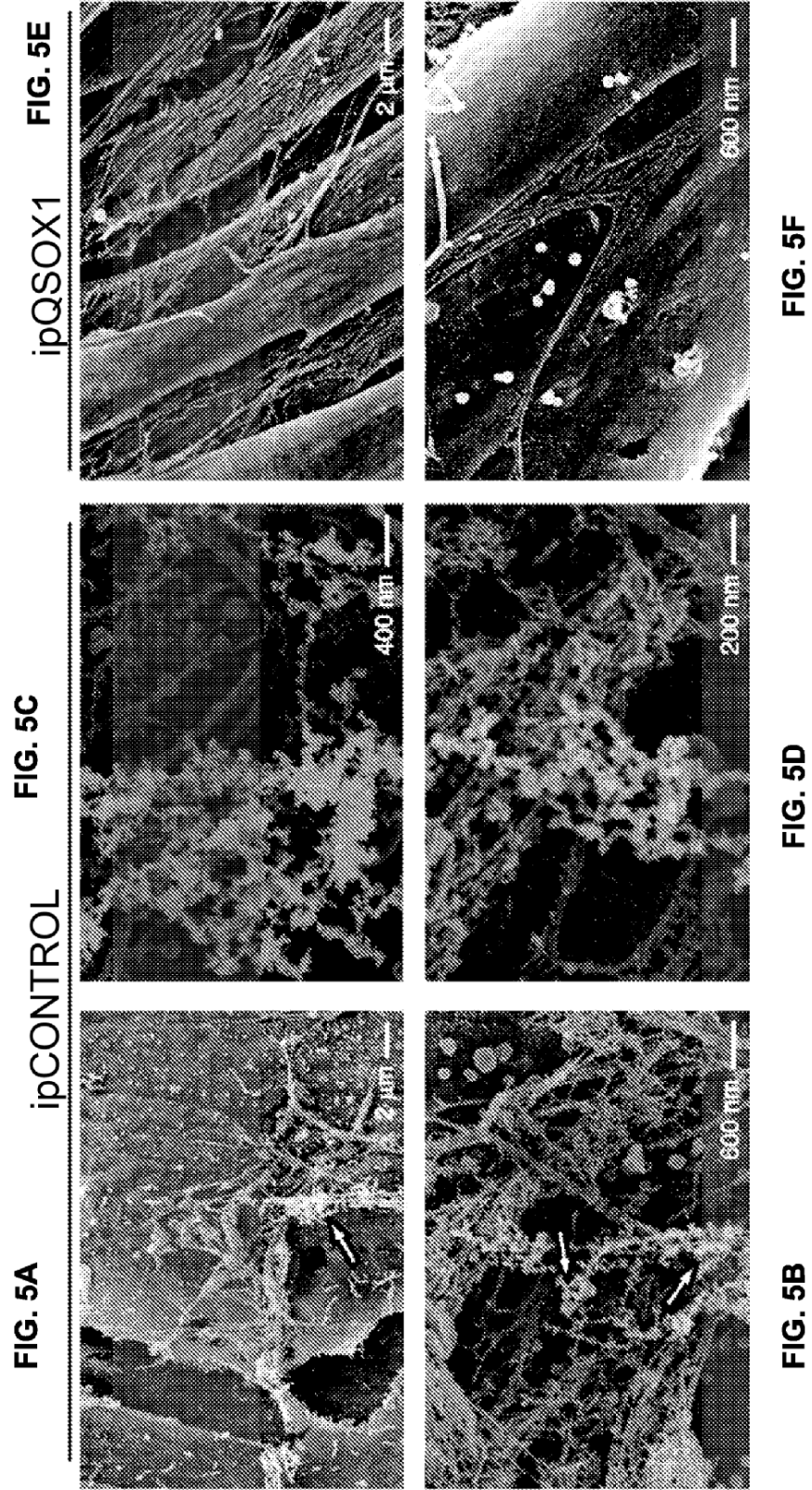
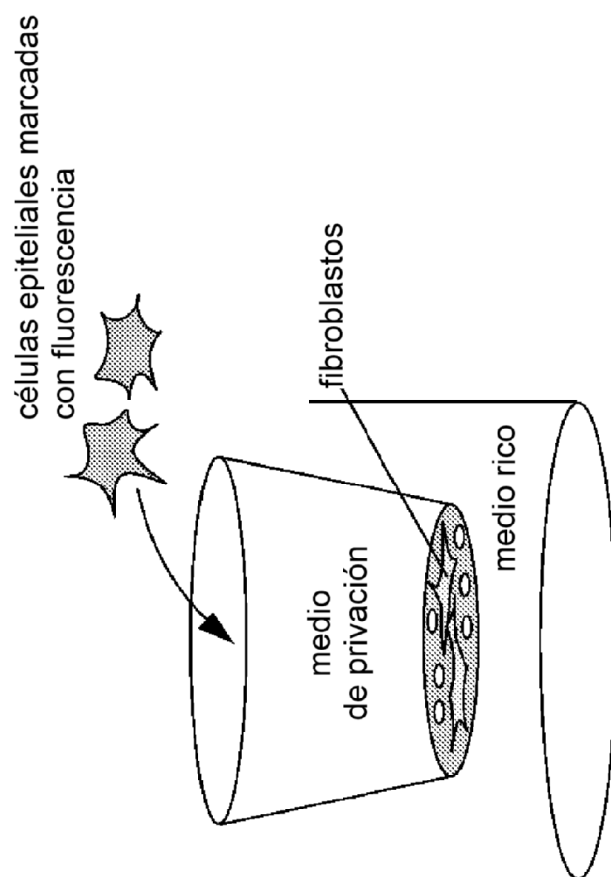


FIG. 5G



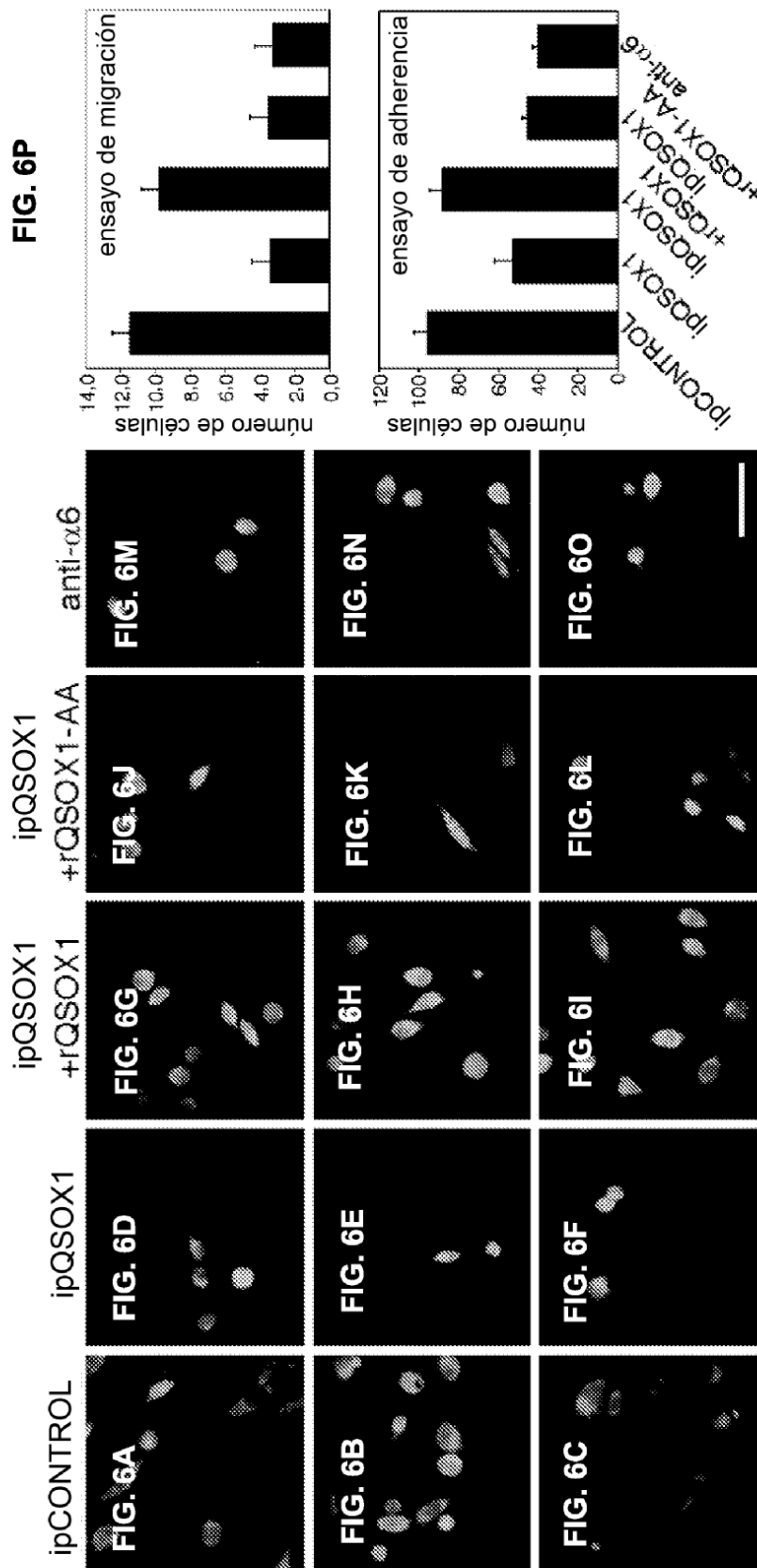


FIG. 6R

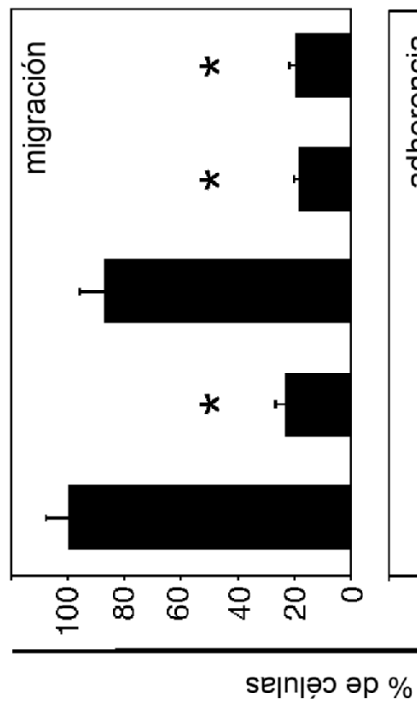


FIG. 6S

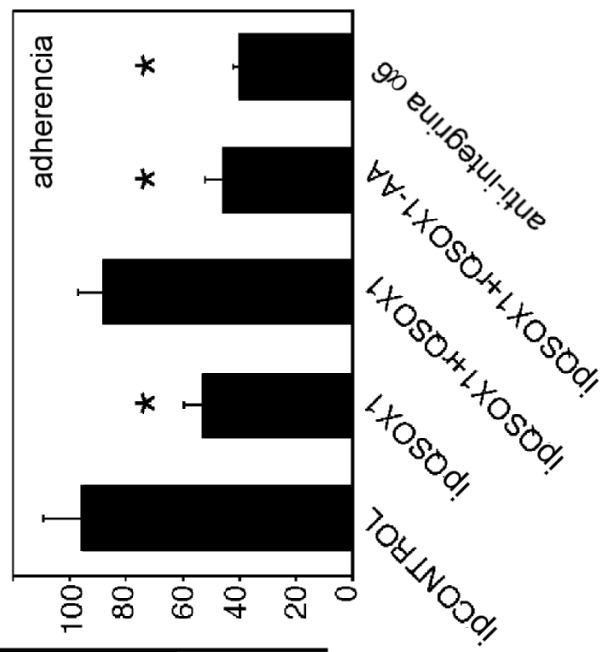
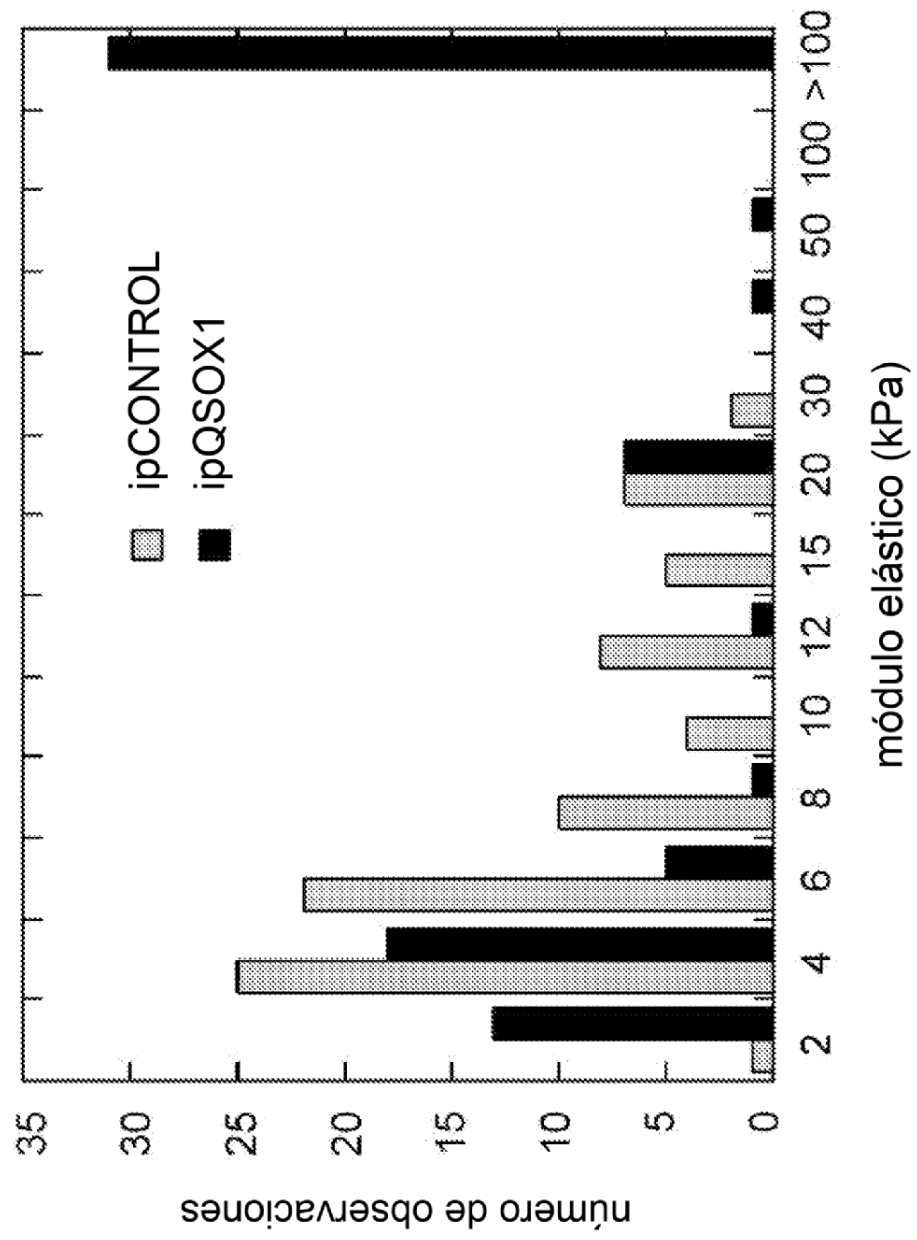


FIG. 6T



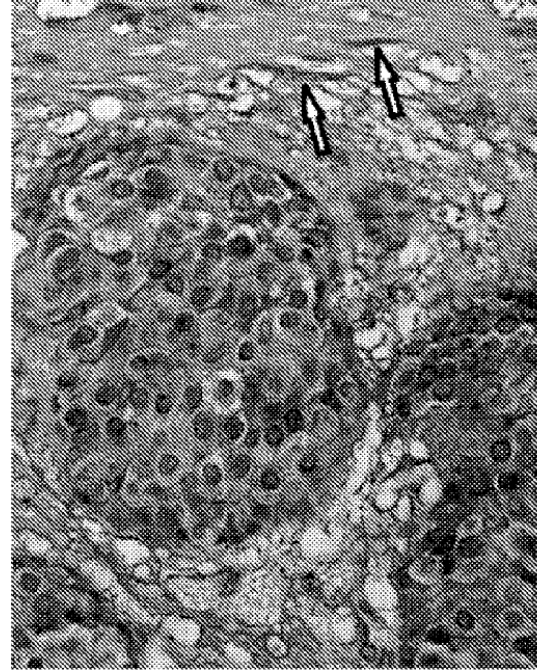
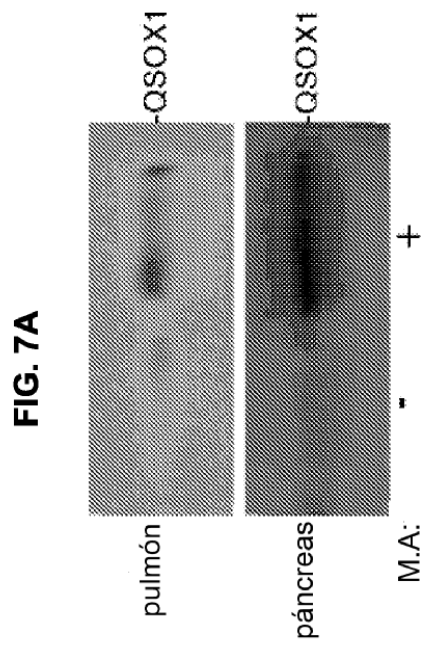
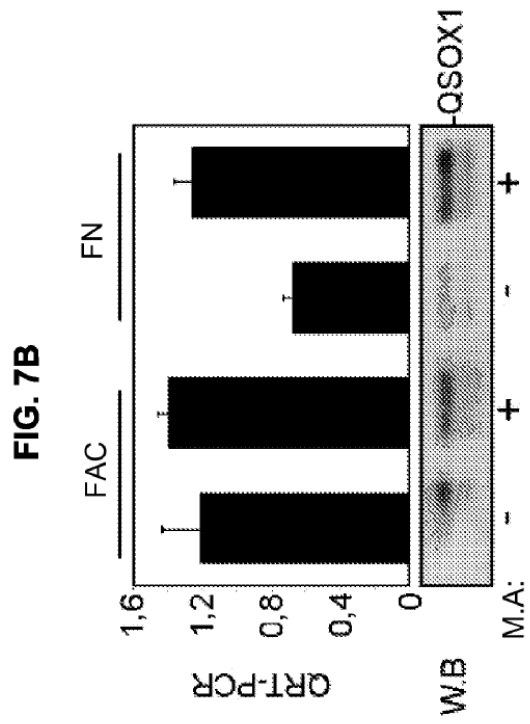


FIG. 7D

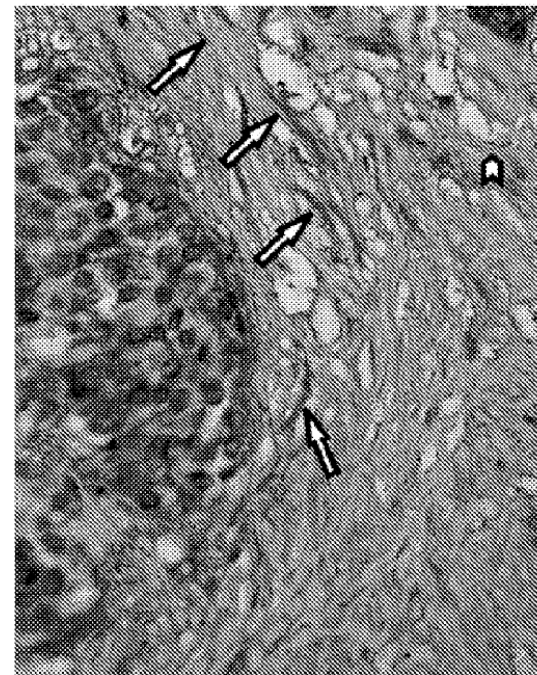
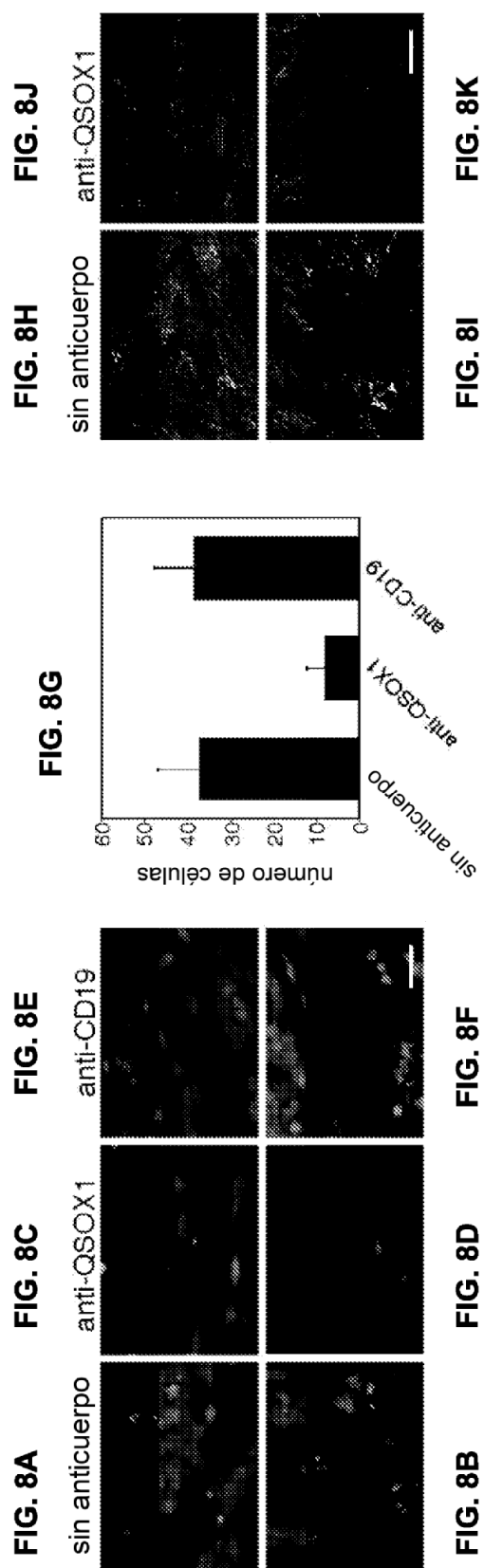


FIG. 7C



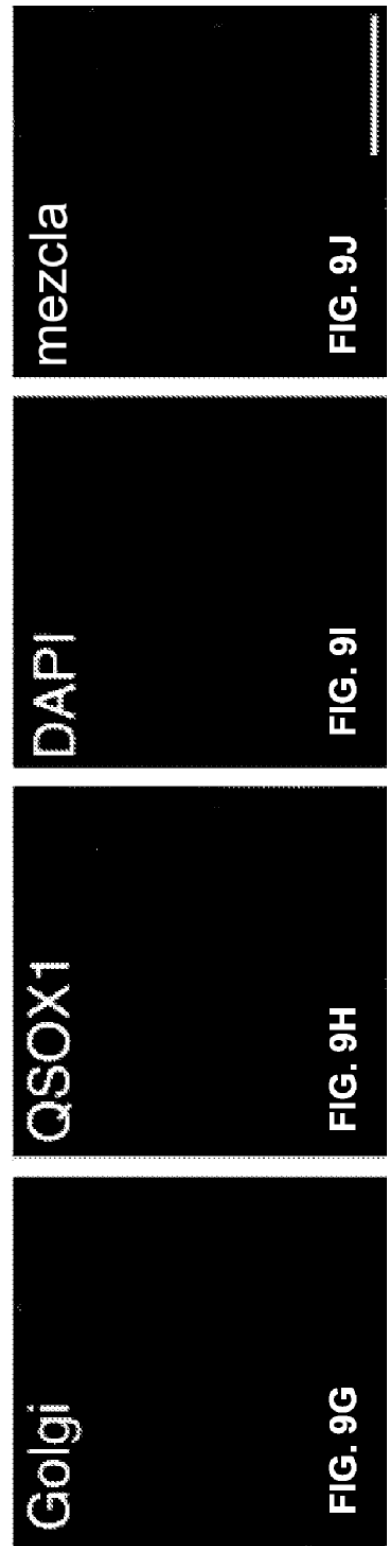


FIG. 9K

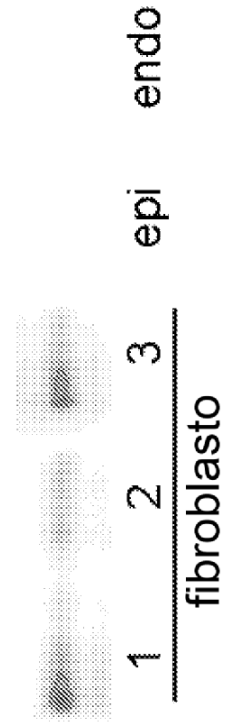
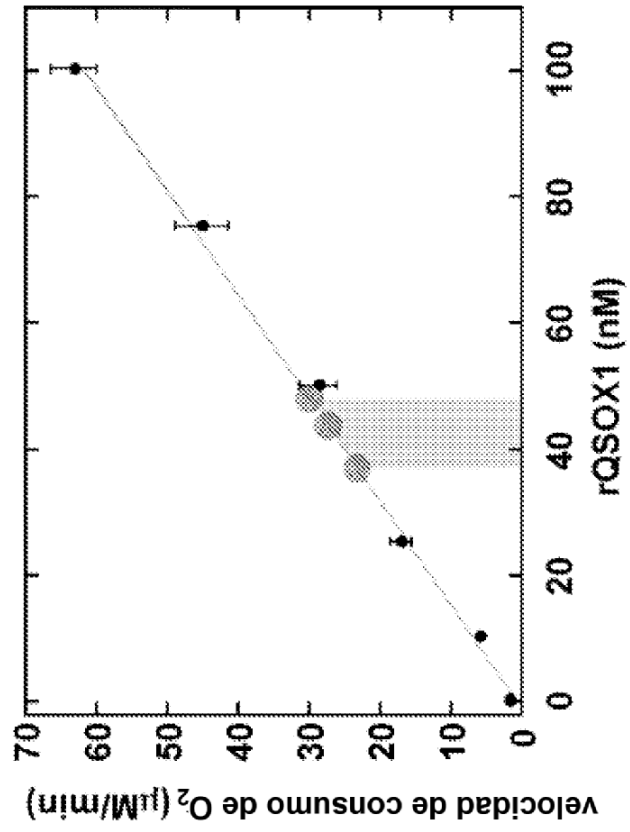


FIG. 9L

Escisión por tripsina de banda inferior de QSOX1

FIG. 10A

SEQ ID NO: 35

1 MRRNSGSGPPPSLLILLWLLAVPGANAAPRSALYSPSDPLTLLQADTV
 51 RGAVLGSRSAWAVEFFASWCGHCIAFAPTWKALAEDVKAWRPALYLAALD
 101 CAKEETNSAVCRDNIPEGFTTVRFKAFYTKNGSGAVFVAGADVQTLRERL
 151 IDALESHHDTWPPACPPLEPAKLEEDGFFARNNEEYLALIFEKGGSYLG
 201 REVALDLSQKGVAVRRVLTANVVRKFGVDFPSCYLLFRNGSVSRVP
 251 VLMESSFTYTAILQRLSGLTREAAQTTPATTANKIAPTVMKLADRSKIY
 301 MADLESALHYILRIEVGRFFVLEGQRLVALKKFVAVLAKYFFGRPLVQNF
 351 LHSVNEWLKRQKRNIPIYSFFKTALDDRKEGAVLAKVNNWICQCGSEPHF
 401 RGFPCLMWLFHFLTVQAARQNVDSQEAAKAKEVLPALRGYVHYFFGCR
 451 DCASHFEQMAAASMRVGSFNAAVLWLNSSHNVNARLAGAPSEDPOFPK
 501 VQWPPRELCSACHNERLDVPMVDVEATNLFKAHFSPSNIILDFFPAAGSA
 551 ARRDVQNVAAPELAMGALELESNSITLDPGKPEMMKSPNTTTPHVPAG-P_{ELI} (604)
 601 PEASRPPLKHPGLRAAPGQEPPEHMAELQRNEQEPGLQWHLSKRDGTAA
 651 LLAESRAEKNRLWGLPEVRRVGRSSKQLVDIPEGQLEARAGRGRGQWLQV
 701 LGGGFSYLDISLCVGLYSLSEFMGLLAMTYTFOAKIRALKGHAGHPAA (747)

Escisión por quimotripsina de banda inferior de QSOX1

FIG. 10B

SEQ ID NO: 36

1 MRRNSGSGPPPSLLILLWLLAVPGANAAPRSALYSPSDPLTLLQADTV
 51 RGAVLGSRSAWAVEFFASWCGHCIAFAPTWKALAEDVKAWRPALYLAALD
 101 CAKEETNSAVCRDNIPEGFTTVRFKAFYTKNGSGAVFVAGADVQTLRERL
 151 IDALESHHDTWPPACPPLEPAKLEEDGFFARNNEEYLALIFEKGGSYLG
 201 REVALDLSQKGVAVRRVLTANVVRKFGVDFPSCYLLFRNGSVSRVP
 251 VLMESSFTYTAILQRLSGLTREAAQTTPATTANKIAPTVMKLADRSKIY
 301 MADLESALHYILRIEVGRFFVLEGQRLVALKKFVAVLAKYFFGRPLVQNF
 351 LHSVNEWLKRQKRNIPIYSFFKTALDDRKEGAVLAKVNNWICQCGSEPHF
 401 RGFPCLMWLFHFLTVQAARQNVDSQEAAKAKEVLPALRGYVHYFFGCR
 451 DCASHFEQMAAASMRVGSFNAAVLWLNSSHNVNARLAGAPSEDPOFPK
 501 VQWPPRELCSACHNERLDVPMVDVEATNLFKAHFSPSNIILDFFPAAGSA
 551 ARRDVQNVAAPELAMGALELESNSITLDPGKPEMMKSPNTTTPHVPAG-P_{ELI} (604)
 601 PEASRPPLKHPGLRAAPGQEPPEHMAELQRNEQEPGLQWHLSKRDGTAA
 651 LLAESRAEKNRLWGLPEVRRVGRSSKQLVDIPEGQLEARAGRGRGQWLQV
 701 LGGGFSYLDISLCVGLYSLSEFMGLLAMTYTFOAKIRALKGHAGHPAA (747)

Escisión por tripsina de banda superior de QSOX1

FIG. 10C

1 MRRNCSGPPPSLLLLLLWLLAVPGANAAPRSALYSFSDPLTLLOADTV
51 RGAVLGSRSAWAVEFFASWCGHCIAFAPTWKALAEADVKAWRPALLYLAALD
101 CAEETNSAVCRDFTNIPGFTTVREFFKAFTHKSGCAVFFVACADVQTLRERL
151 IDALESHHDTWPPACPPLEPAKLEEIDGFFARNNEEYIALIFKCGSYLG
201 REVALDLSQHKGVAVRVLNTEANVVRKFGVTDFFSCYLLFFRNGSVSRVP
251 VLMESESFYTYAILQRLSGLTREAAQTVAPTTANKIAPTVMKLAADRSKIY
301 MADLESALHYILRIEVRFFVLEQQRVALKKFAVAVLAKYFFPGRPLVQNF
351 LHSVNEWLKRQKRNKIPIYSFTKTALDDRKEGAVLAKKVNWIGCQSGSEPHF
401 RGFPCLMWLFHFLTVQAARQNVDSQEAAKAKEVLPAIRGYVHYFTGCR
451 DCASHFEQMAAASMHVRVGSFNAAVLWLSHSHNRVNARLAGAPSEDQFPFK
501 VQWPPERELCSACHNERLDVPVWDVEATLNFKAHESFENIILDFFAAGSA
551 ARROVQNVAAAFELAMGALELESNSTDGPKPEMKSPNTTTPHVPAG-PELI (604)
601 PEASRPPKLHPGLRAAPGOEPPHMAELORNEQEQPLQWHLSKRDTGAA
651 LLAESRAEKNRLWGPLEVRVRGRSSKQLVDIPEGQLEARAGRGQWLQV
701 LGGGFSYLDISLCVGLYSLSFMGLLAMITYYQAKIRALKGHAGHPAA (747)

SEQ ID NO: 37

Escisión por quimotripsina de banda superior de QSOX1

FIG. 10D

1 MRRNCSGPPPSLLLLLLWLLAVPGANAAPRSALYSFSDPLTLLOADTV
51 RGAVLGSRSAWAVEFFASWCGHCIAFAPTWKALAEADVKAWRPALLYLAALD
101 CAEETNSAVCRDFTNIPGFTTVREFFKAFTHKSGCAVFFVACADVQTLRERL
151 IDALESHHDTWPPACPPLEPAKLEEIDGFFARNNEEYIALIFKCGSYLG
201 REVALDLSQHKGVAVRVLNTEANVVRKFGVTDFFSCYLLFFRNGSVSRVP
251 VLMESESFYTYAILQRLSGLTREAAQTVAPTTANKIAPTVMKLAADRSKIY
301 MADLESALHYILRIEVRFFVLEQQRVALKKFAVAVLAKYFFPGRPLVQNF
351 LHSVNEWLKRQKRNKIPIYSFTKTALDDRKEGAVLAKKVNWIGCQSGSEPHF
401 RGFPCLMWLFHFLTVQAARQNVDSQEAAKAKEVLPAIRGYVHYFTGCR
451 DCASHFEQMAAASMHVRVGSFNAAVLWLSHSHNRVNARLAGAPSEDQFPFK
501 VQWPPERELCSACHNERLDVPVWDVEATLNFKAHESFENIILDFFAAGSA
551 ARROVQNVAAAFELAMGALELESNSTDGPKPEMKSPNTTTPHVPAG-PELI (604)
601 PEASRPPKLHPGLRAAPGOEPPHMAELORNEQEQPLQWHLSKRDTGAA
651 LLAESRAEKNRLWGPLEVRVRGRSSKQLVDIPEGQLEARAGRGQWLQV
701 LGGGFSYLDISLCVGLYSLSFMGLLAMITYYQAKIRALKGHAGHPAA (747)

SEQ ID NO: 38

FIG. 11A

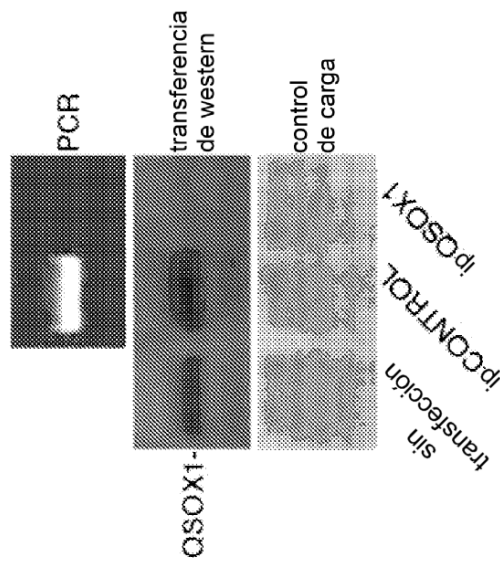


FIG. 11B

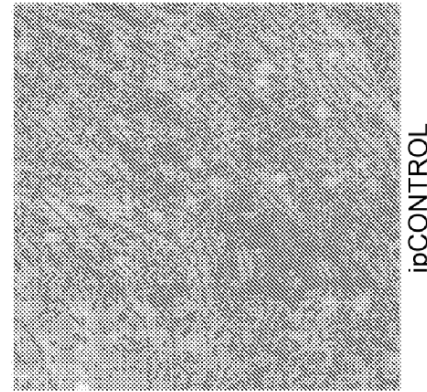
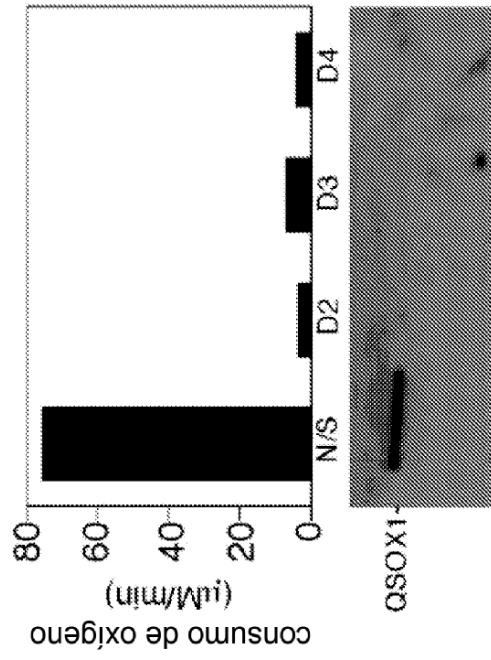


FIG. 11C

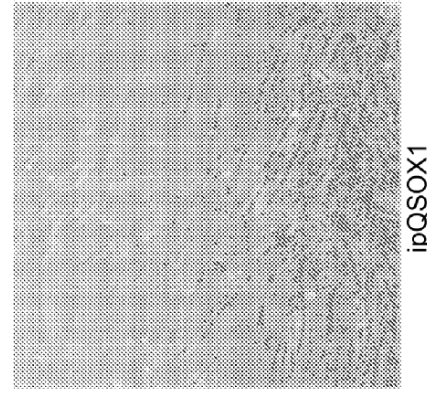


FIG. 11D

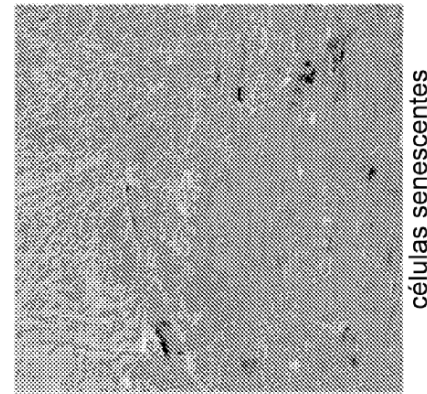


FIG. 11E

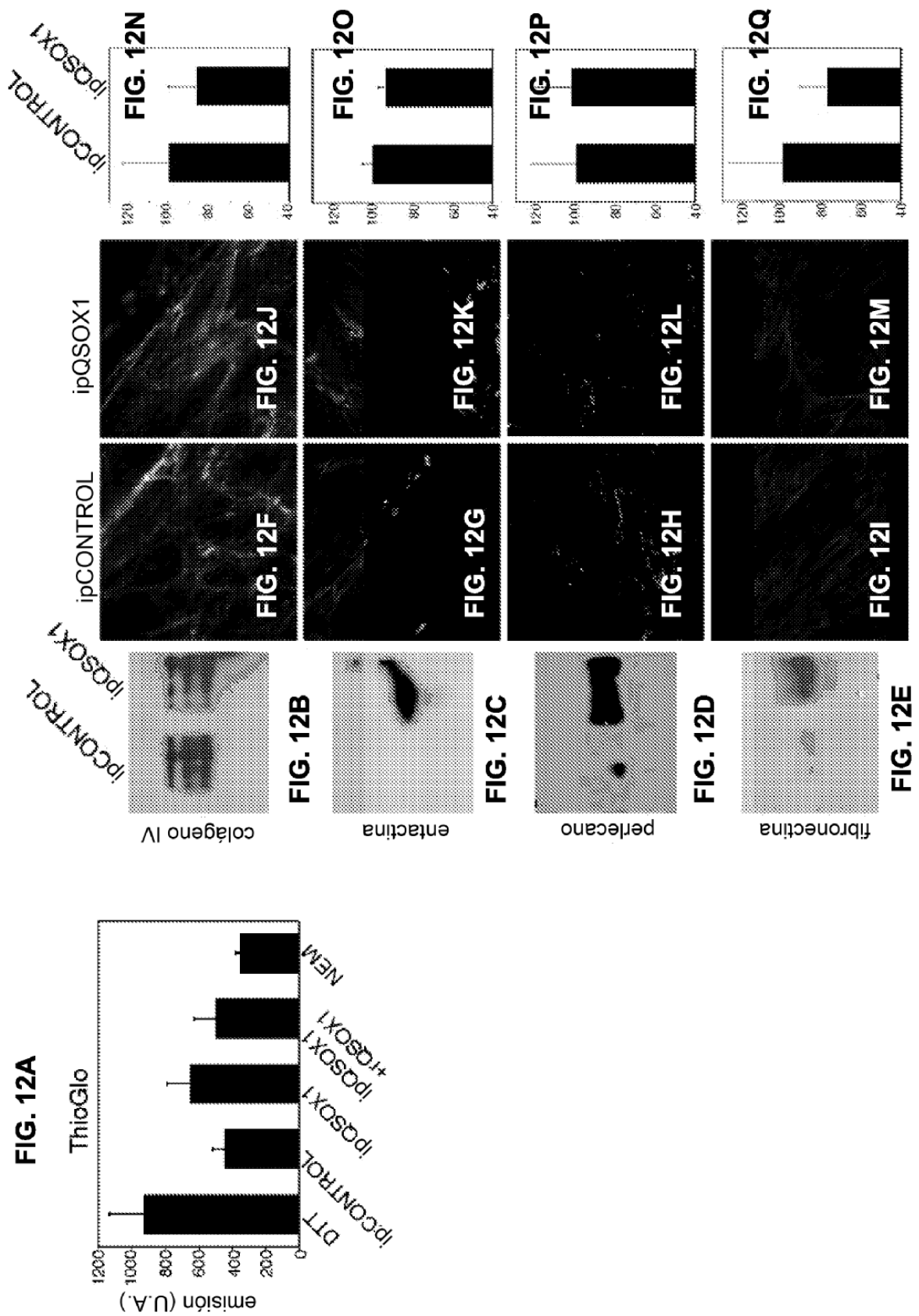


FIG. 13A

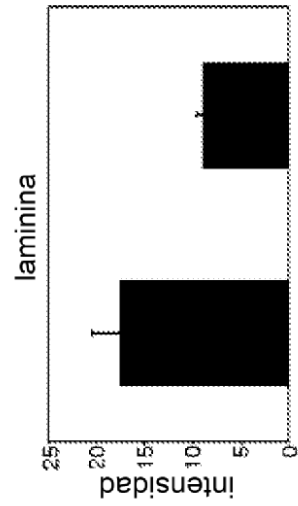


FIG. 13B

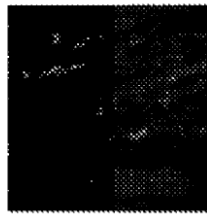


FIG. 13D



FIG. 13C

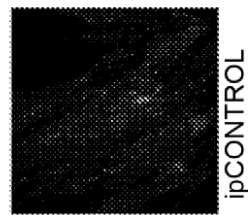
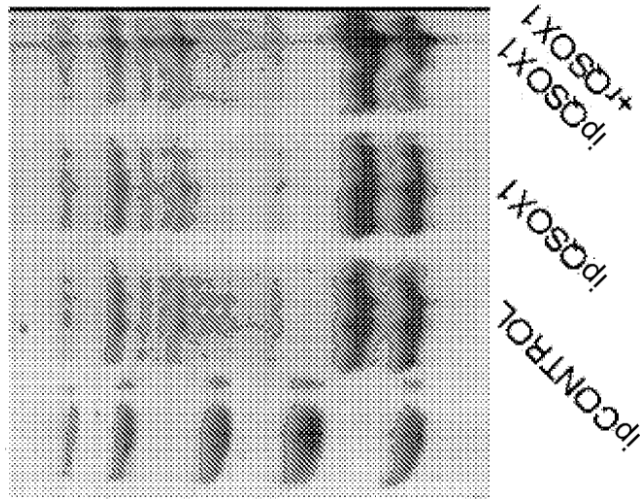


FIG. 13E



FIG. 13F

contenido de proteínas en MEC



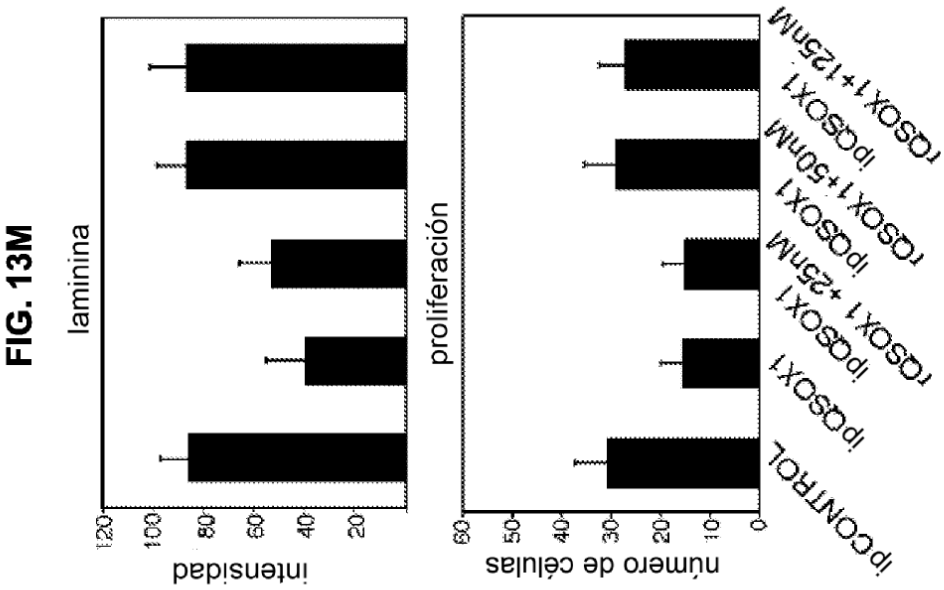


FIG. 13N

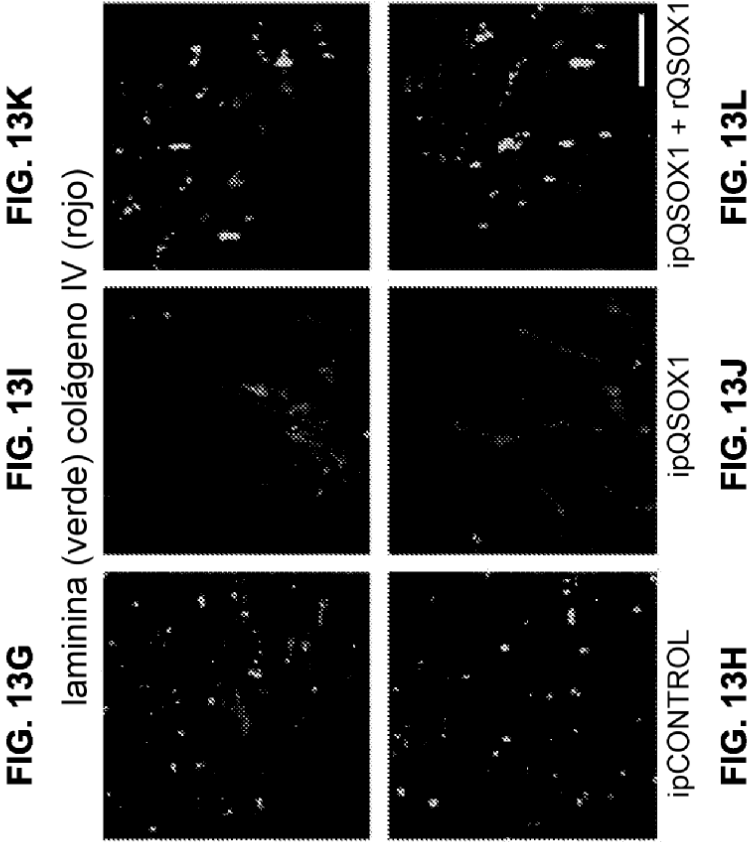


FIG. 14

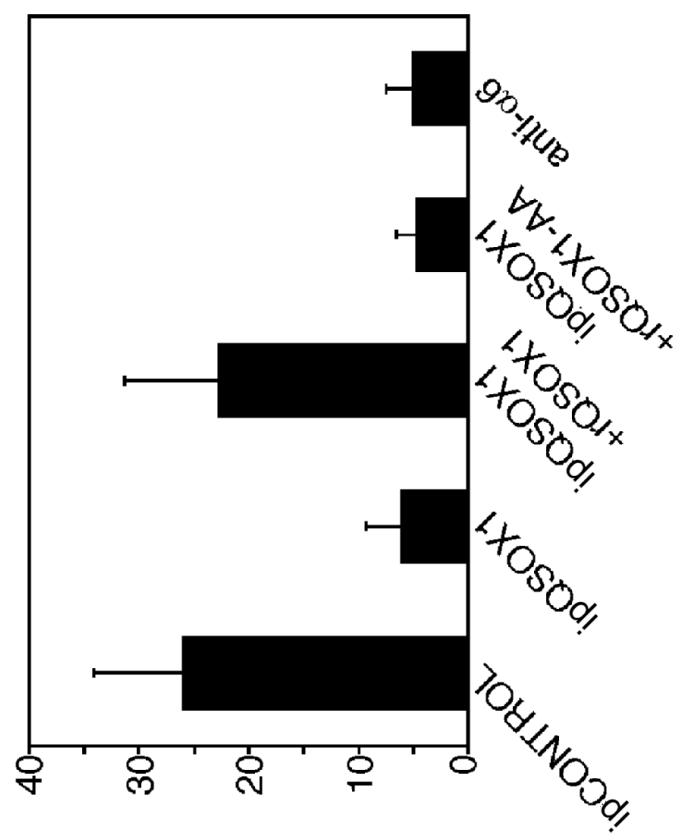


FIG. 15A

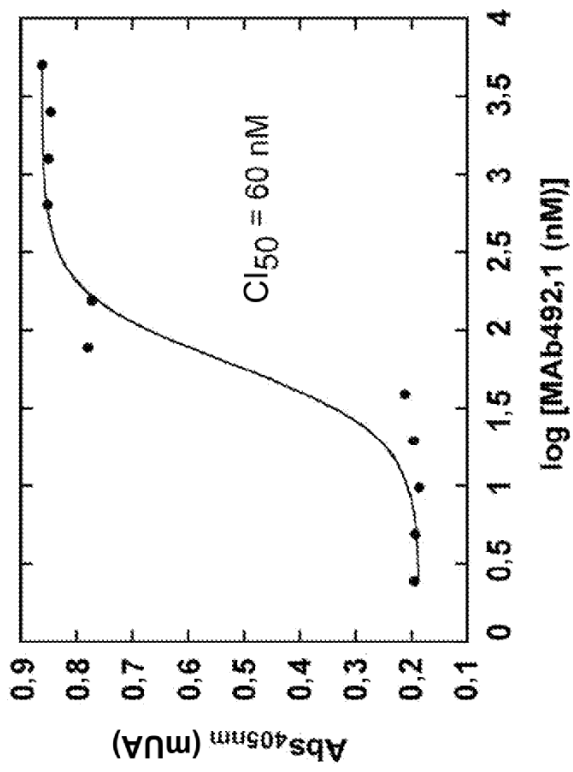


FIG. 15B

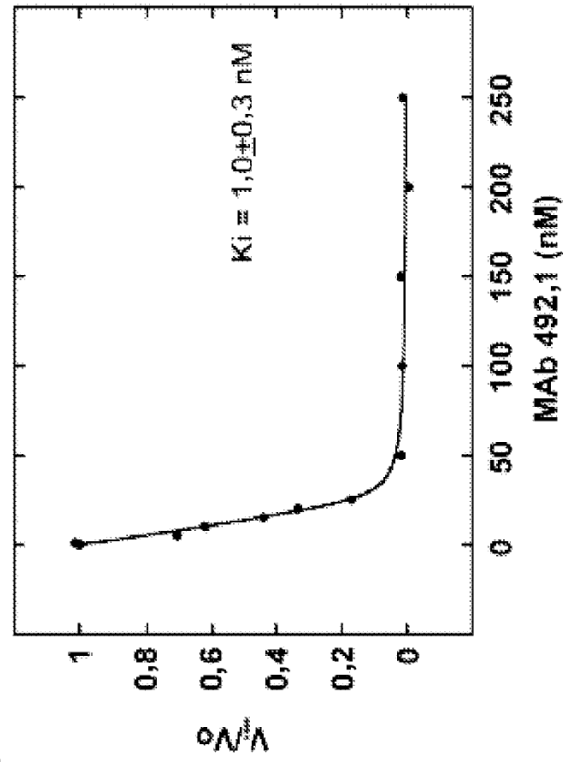


FIG. 15C

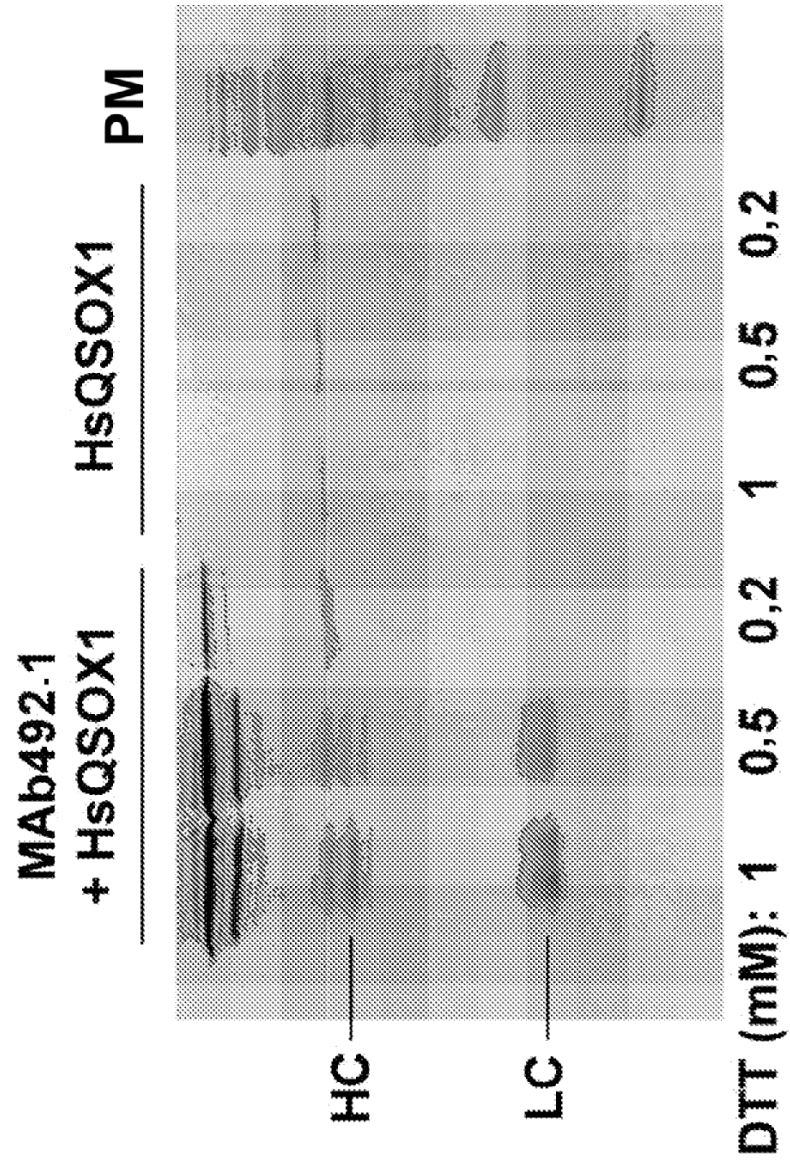
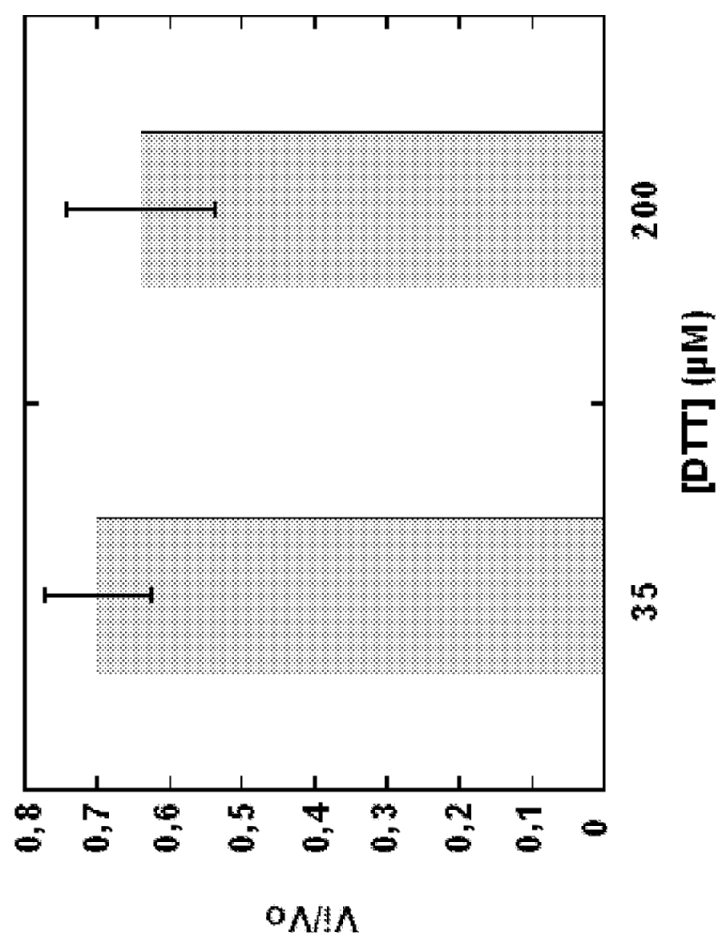


FIG. 15D



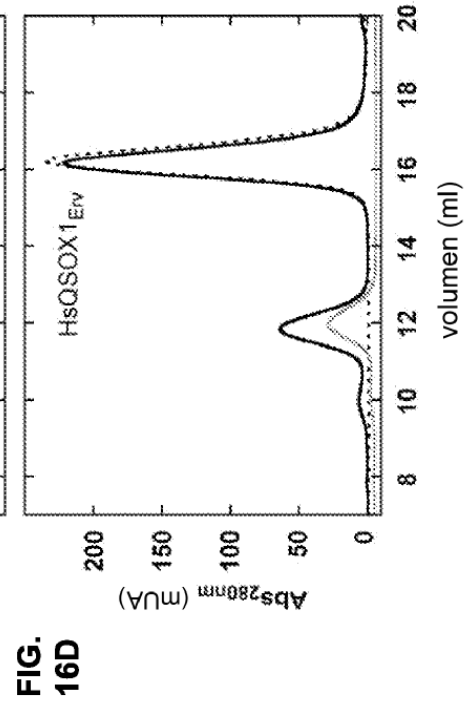
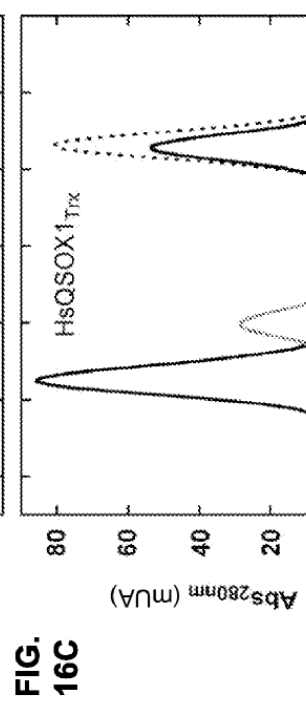
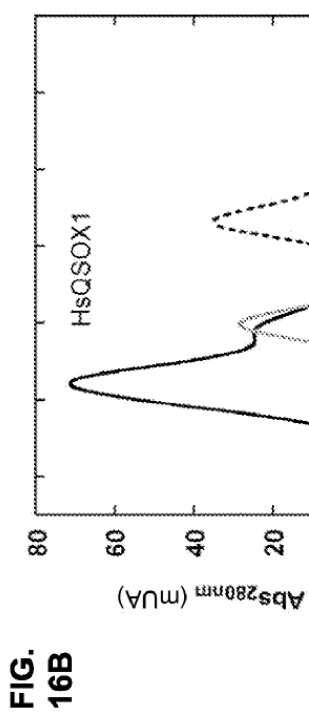
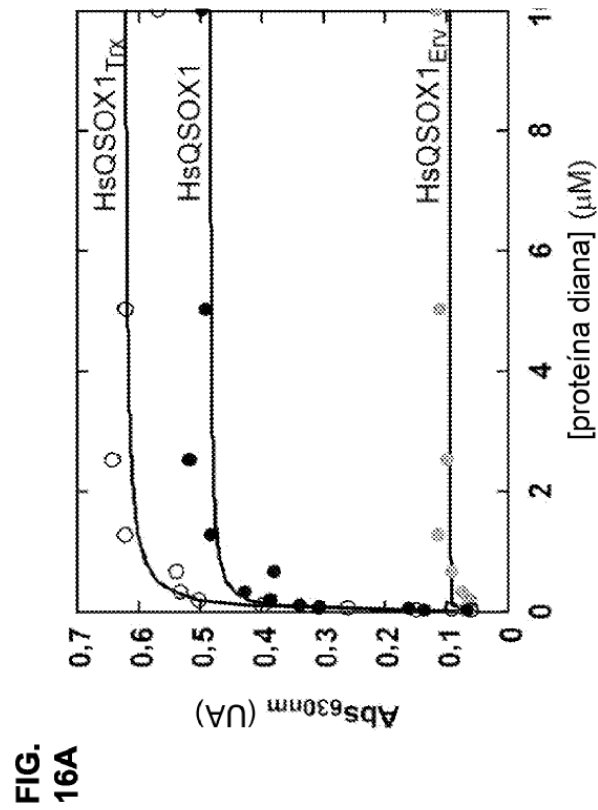


FIG. 17

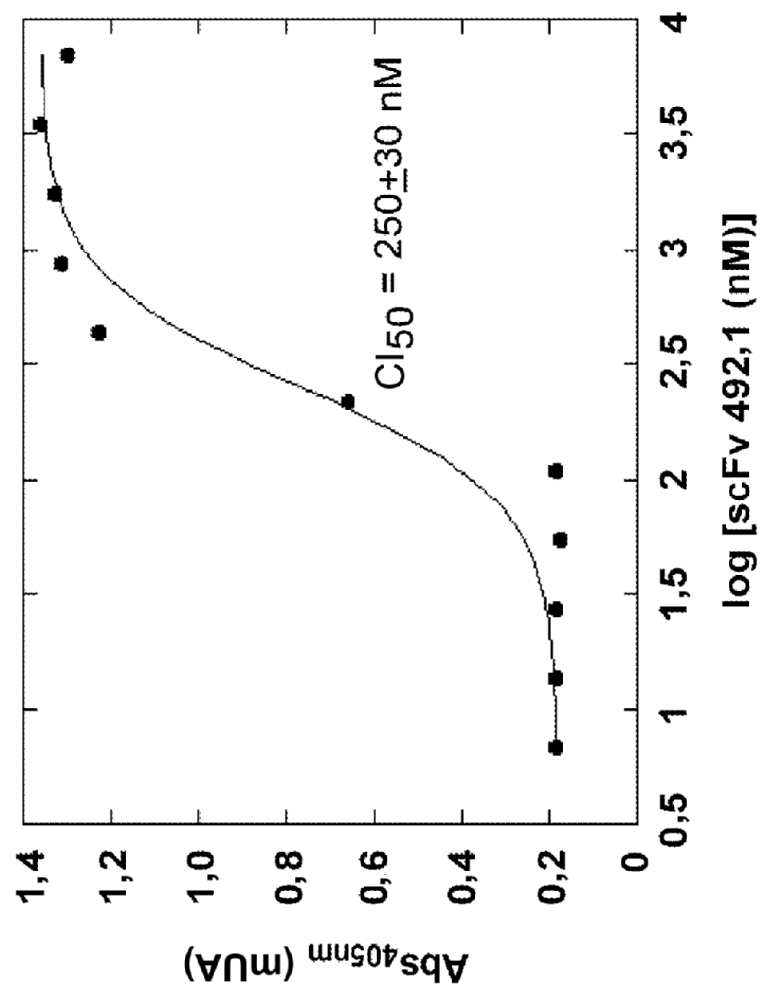


FIG. 18

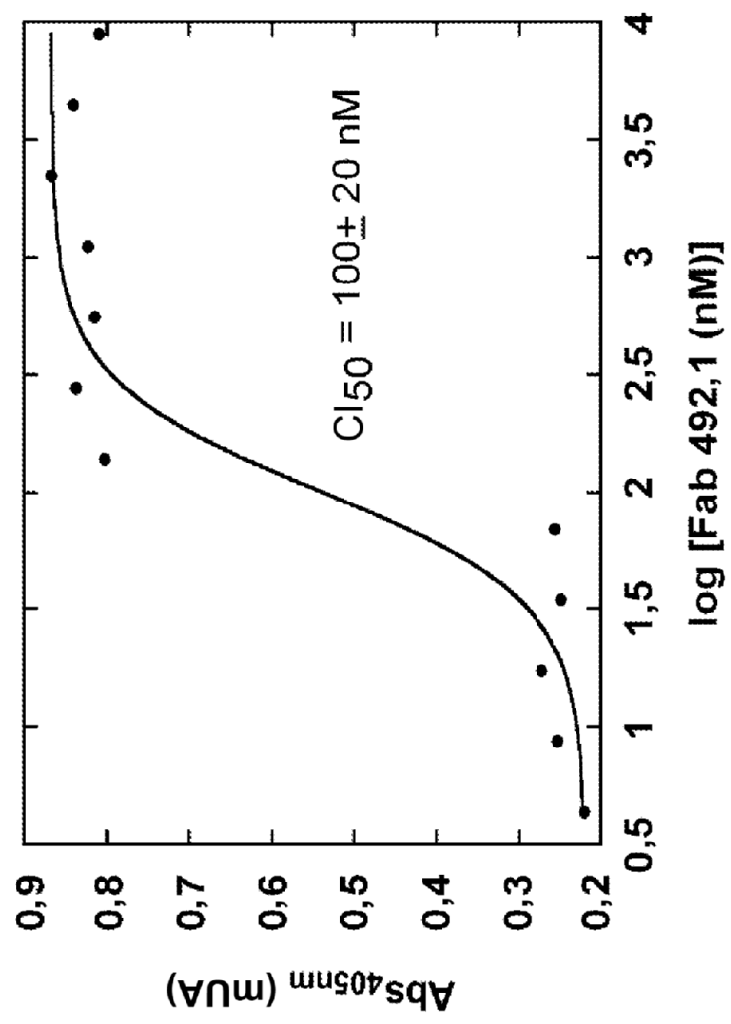
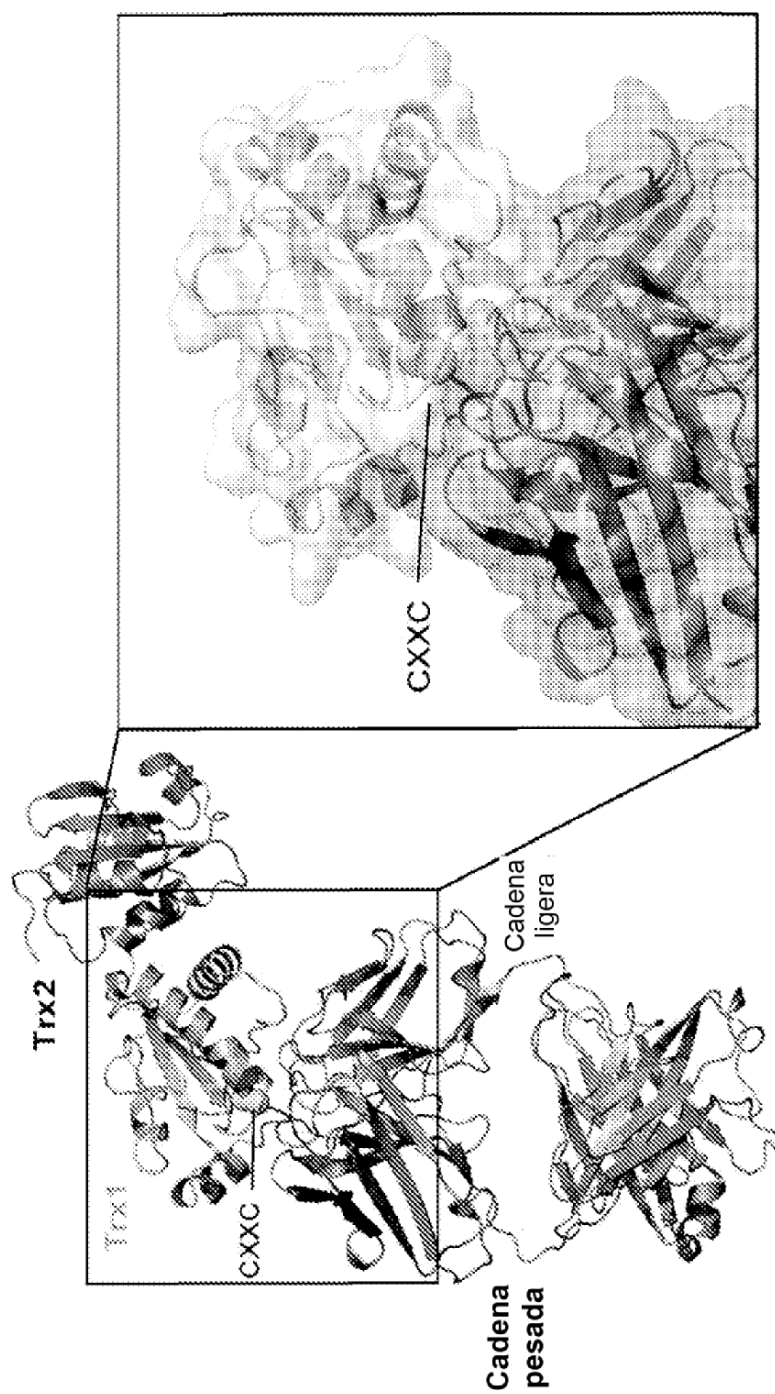


FIG. 19A



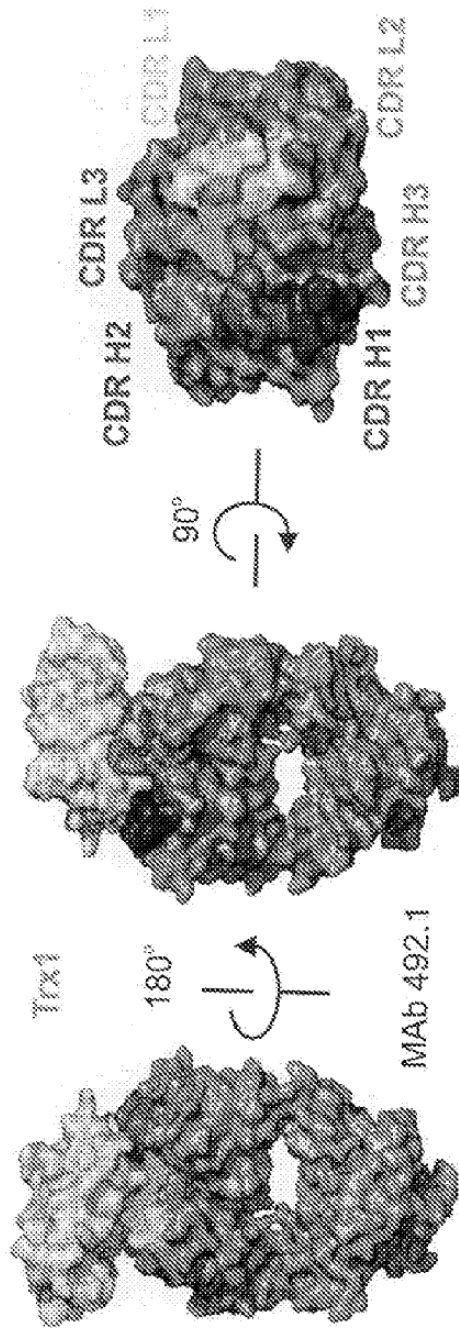


FIG. 19B

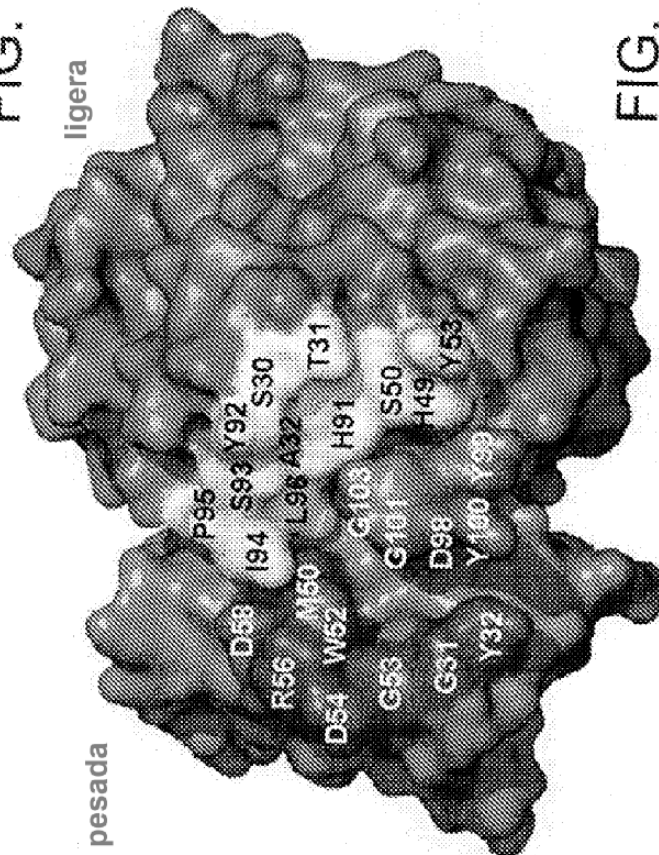
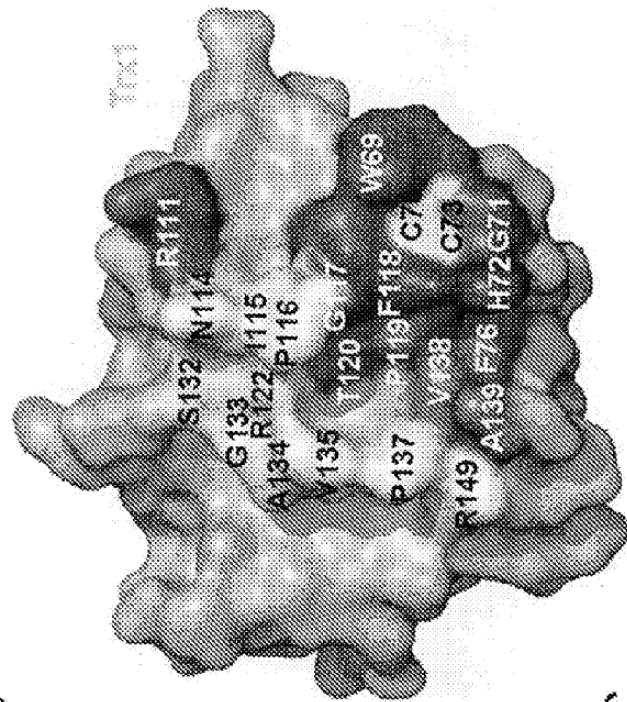


FIG. 19C



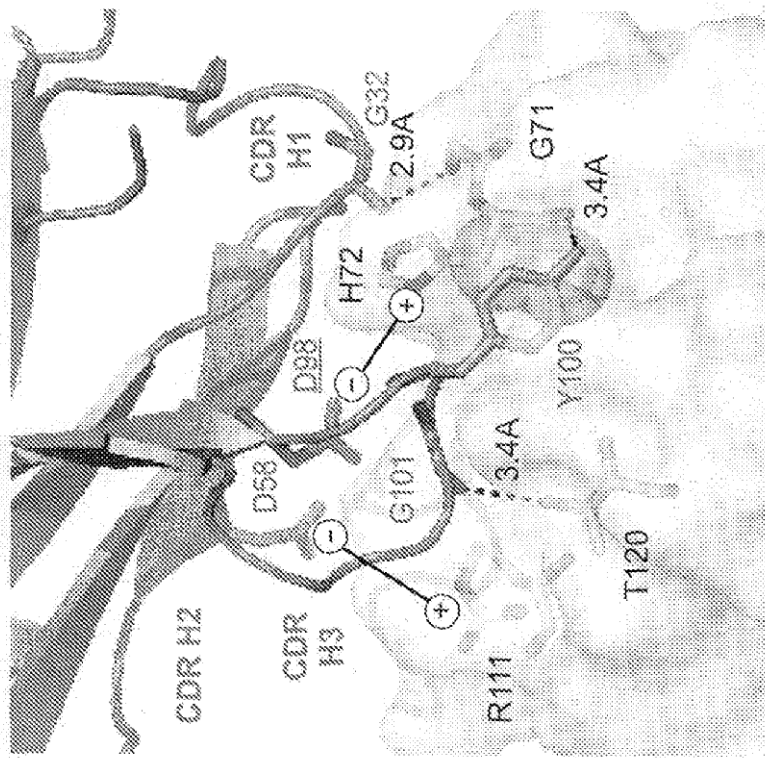


FIG. 20B

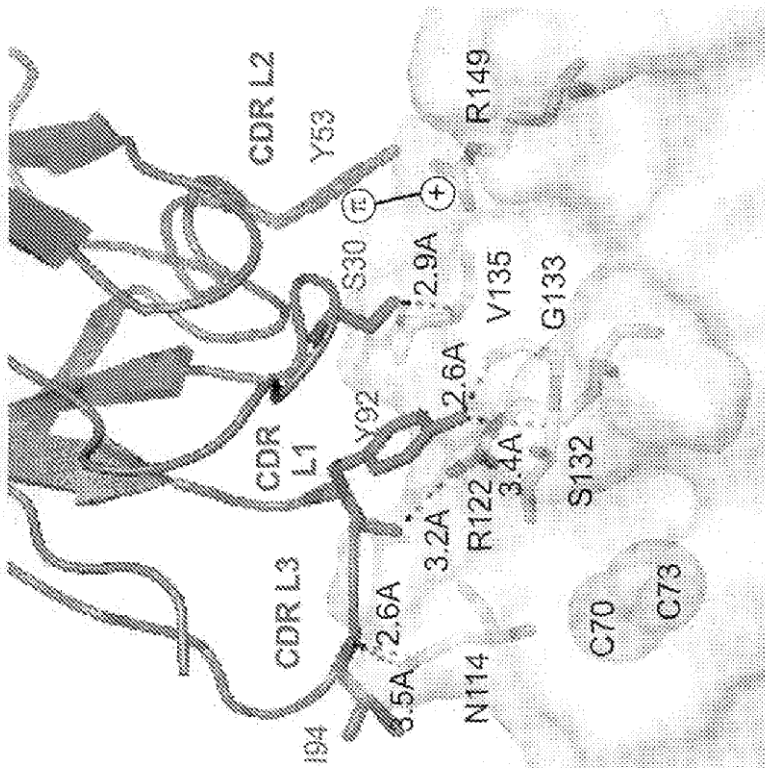


FIG. 20A

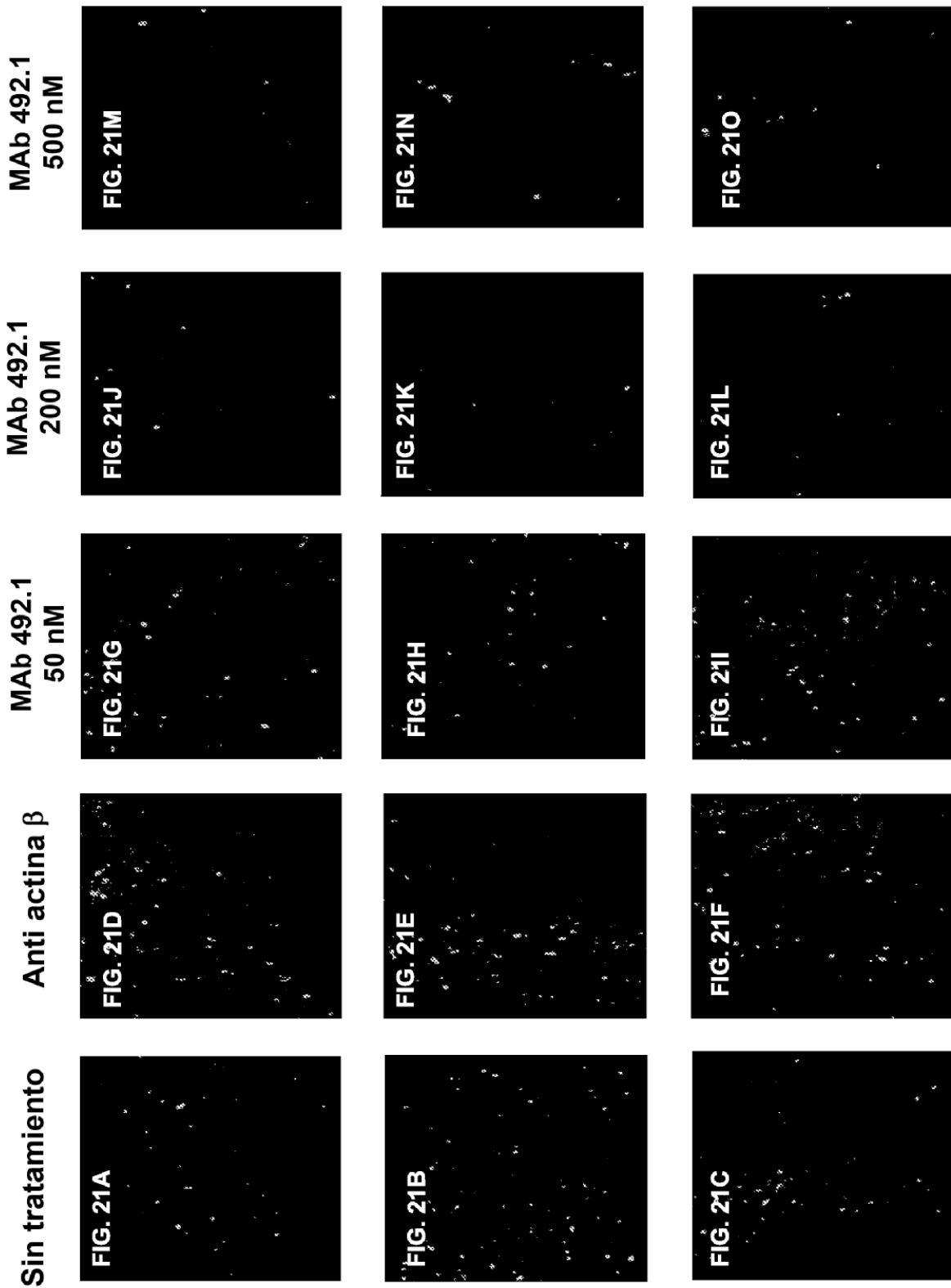


FIG. 22

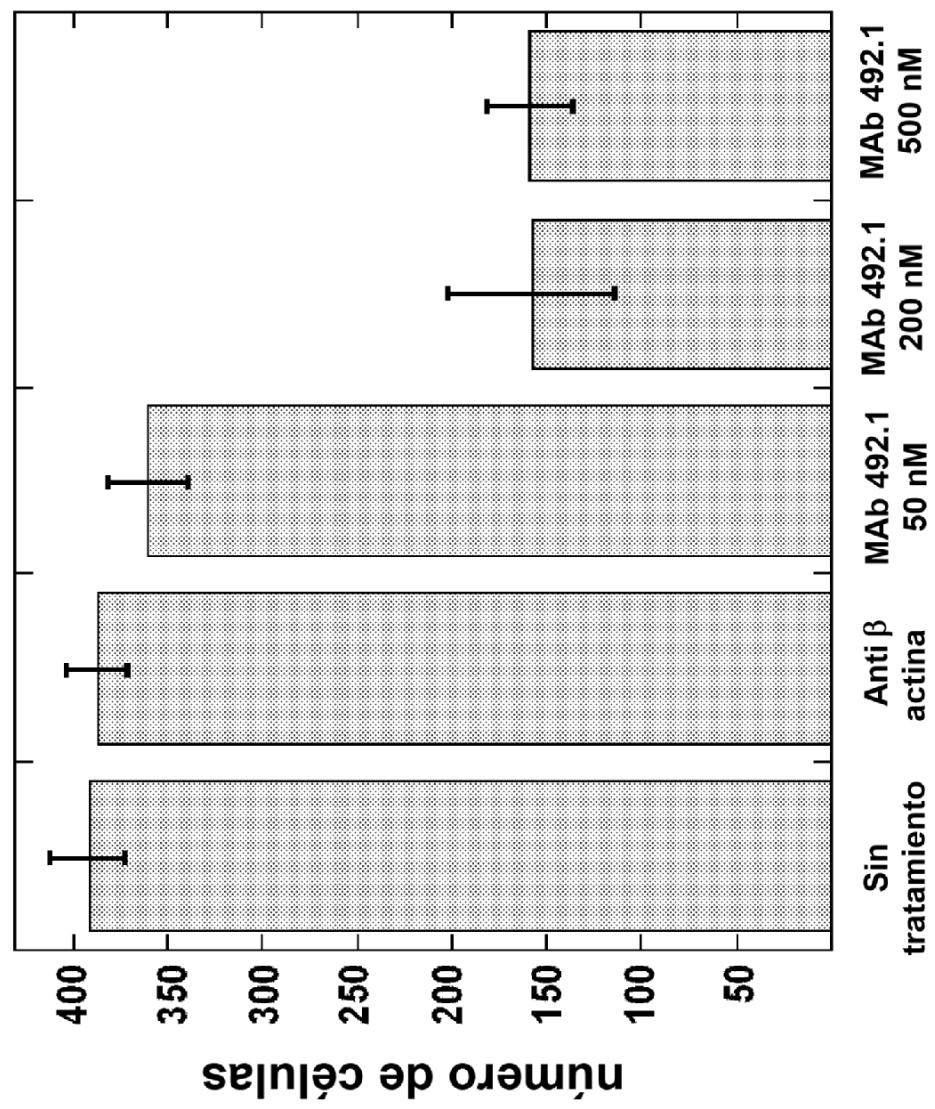


FIG. 23

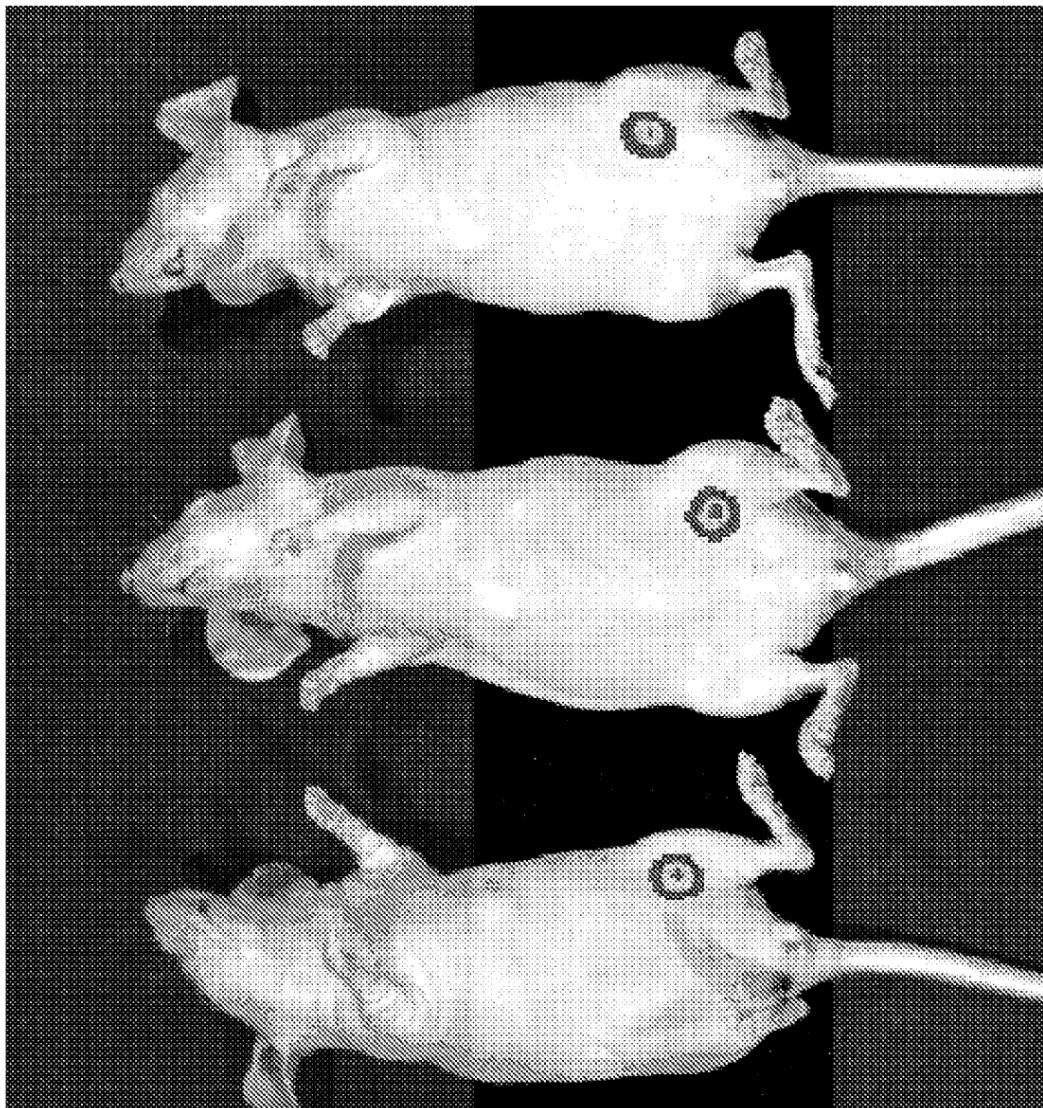
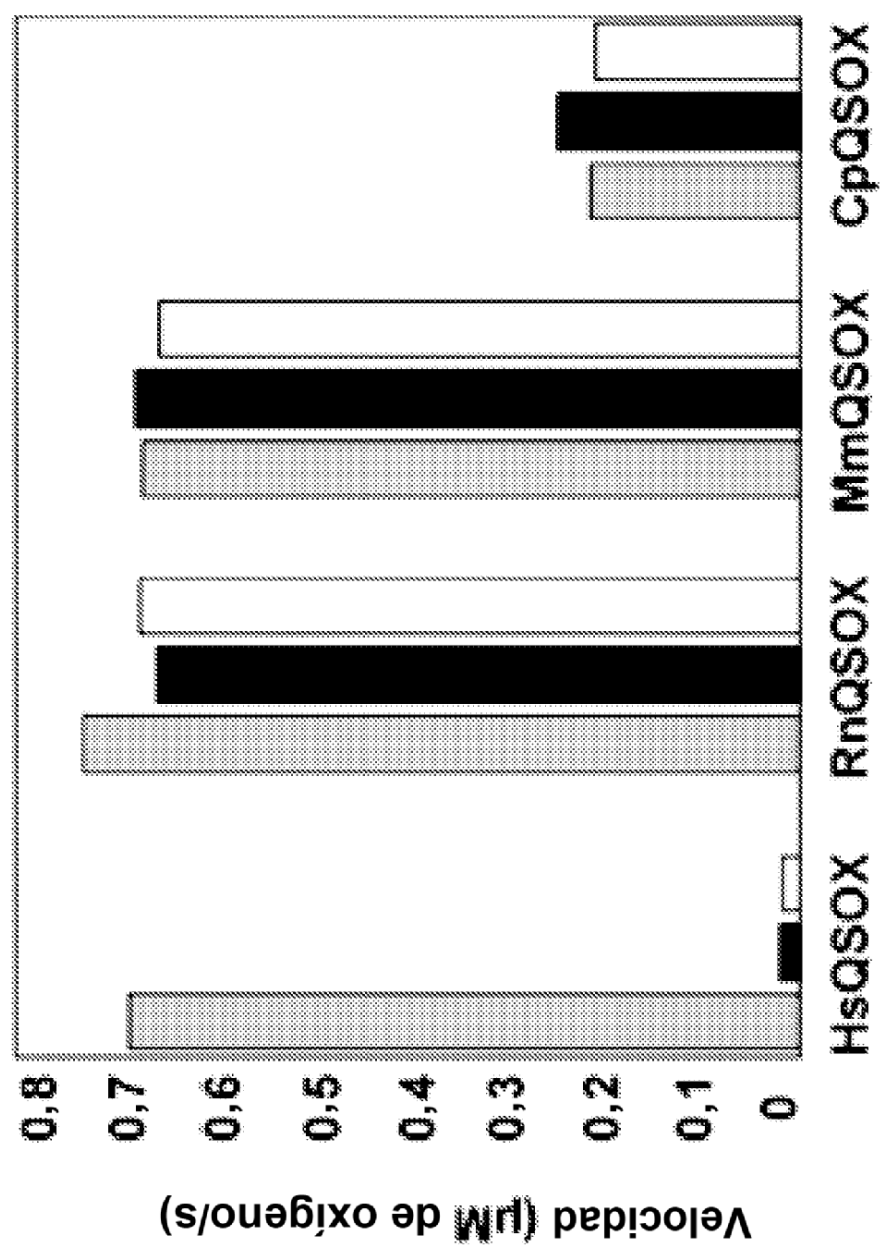


FIG. 24



SEQ ID NO:

Ser humano	69	WC	HC	CI	A	F	A	P	T	79...108	AV	C	R	D	F	N	I	P	G	F	P	T	V	R	F	F	K	A	F	T	K	N	G	S	G	A	V	F	P	P	A	G	A	D	V	Q	T	L	R	149
Cobaya	69	WC	HC	CI	A	F	A	P	T	80...109	AV	C	R	D	F	N	I	A	G	F	P	S	V	R	F	F	K	A	F	S	K	N	S	T	G	T	T	L	P	V	A	G	A	N	V	Q	M	L	R	150
Rata	69	WC	HC	CI	A	F	A	P	T	82...111	AV	C	R	E	F	N	I	A	G	F	P	T	V	R	F	F	K	A	F	S	K	N	G	T	G	T	A	L	P	A	A	G	A	N	V	Q	T	L	R	152
Ratón	69	WC	HC	CI	A	F	A	P	T	82...111	AV	C	R	E	F	N	I	A	G	F	P	T	V	R	F	F	K	A	F	T	K	N	G	S	G	A	T	L	P	C	A	G	A	N	V	Q	T	L	R	152

FIG. 26

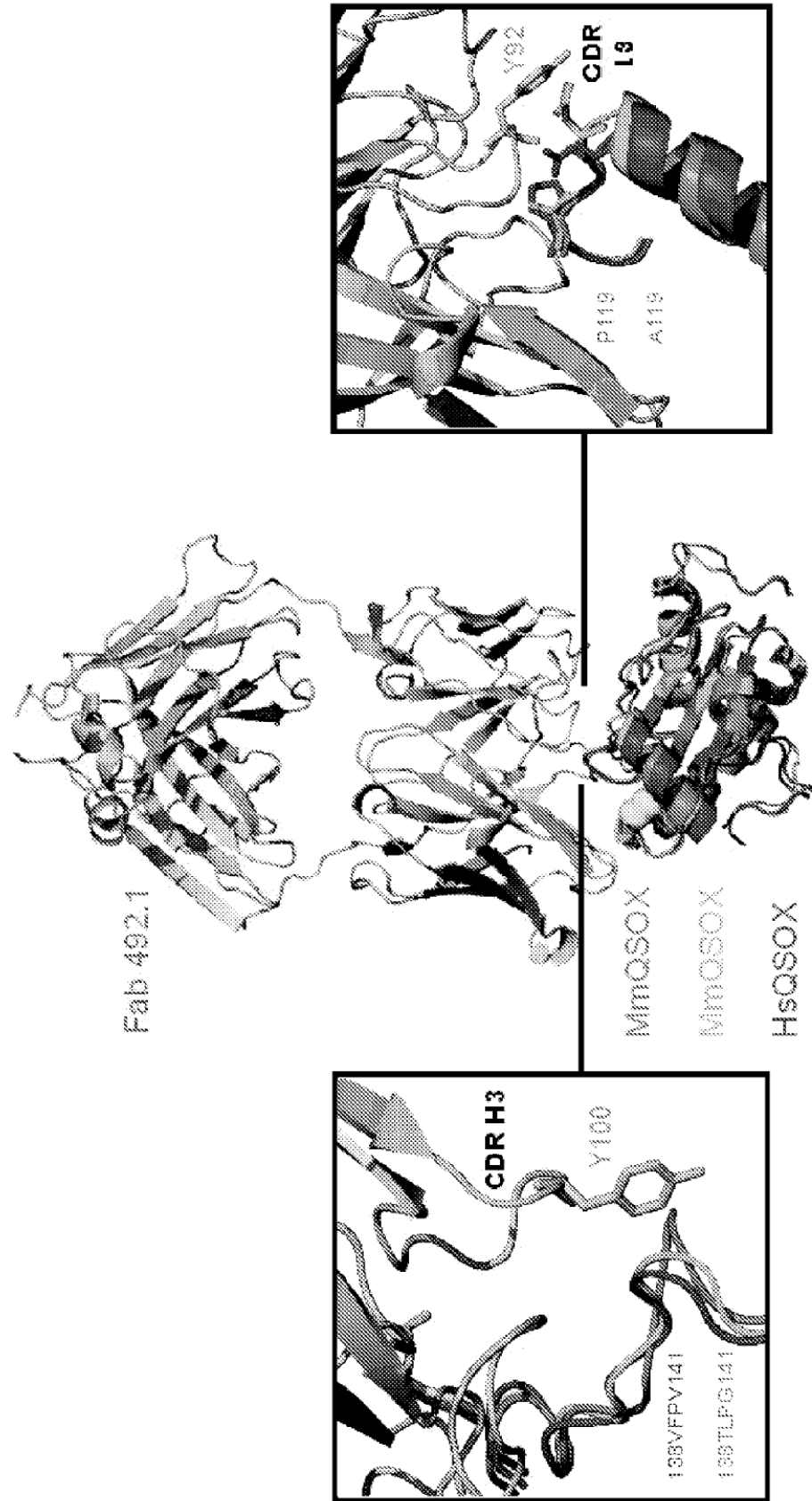


FIG. 27

