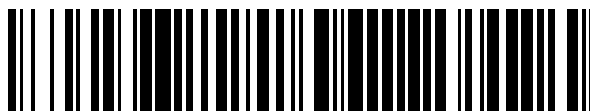


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 797**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013** **PCT/US2013/076877**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15094330**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013** **E 13899506 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** **EP 3083697**

54 Título: **Anticuerpos específicos de la alfa-enolasa y métodos de uso en terapias contra el cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2019

73 Titular/es:
DEVELOPMENT CENTER FOR BIOTECHNOLOGY
(50.0%)
No. 101, Lane 169, Kangning Street
New Taipei City, 221, TW y
NATIONAL HEALTH RESEARCH INSTITUTES
(50.0%)

72 Inventor/es:
TSAI, SHIH-CHONG;
SHIH, NENG-YAO;
YUAN, TA-TUNG;
LIU, KO-JIUNN;
TSENG, SHIH-CHI;
HU, CHIH-YUNG;
WANG, HSIN-YUN y
CHEN, LI-TZONG

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 729 797 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos específicos de la alfa-enolasa y métodos de uso en terapias contra el cáncer

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para la generación y uso de anticuerpos que se unen específicamente a la proteína alfa-enolasa humana (ENO1).

10 Antecedentes de la invención

Los tumores son el resultado de una proliferación desenfrenada aberrante de una sola célula, que genera un clon de células transformadas. Las células tumorales pueden expresar antígenos únicos que pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico. Los antígenos asociados a tumores incluyen oncogenes mutados, proteínas celulares normales mutadas, proteínas celulares expresadas de forma aberrante, proteínas anormales de la superficie celular y proteínas virales oncogénicas. El sistema inmunitario considera estos antígenos asociados a tumores como no propios y puede producir anticuerpos para erradicar estas células tumorales extrañas portadoras de antígenos, al tiempo que no afecta a las células sanas. Por lo tanto, la identificación de antígenos asociados a tumores inmunogénicos puede usarse como objetivos para el pronóstico clínico o aplicaciones terapéuticas en el tratamiento del cáncer.

Ciertas neoplasias malignas pueden identificarse por derrame pleural, que es el exceso de líquido en el espacio entre el pulmón y la pared torácica. El carcinoma de pulmón, el carcinoma de mama y el linfoma causan aproximadamente el 75 % de todos los derrames pleurales malignos. El derrame pleural maligno puede estar enriquecido con infiltrados linfocíticos y células tumorales. Se han descubierto complejos inmunes o autoanticuerpos asociados a tumores, tales como anticuerpos anti-p53, antinucleares y anti-L-Myc, en fluidos de derrame y se asocian con un mal pronóstico. También se han identificado varios antígenos asociados a tumores pulmonares en el derrame maligno, incluyendo, fragmentos de citoqueratina 19, enolasa específica de neuronas (ENO2), antígeno de carcinoma de células escamosas y HLA-I soluble, etc.

La alfa-enolasa (enolasa-1, ENO1) es una proteína funcional múltiple, que se descubrió por primera vez con la enzima clave de las rutas de glucólisis. En condiciones normales, la ENO1 se expresa en el citosol. Sin embargo, se ha descubierto que la ENO1 también se expresa en las superficies celulares de muchas células cancerosas como un receptor de plasminógeno y en células hematopoyéticas activadas, como neutrófilos, linfocitos y monocitos. Se sabe que la regulación por aumento de las proteínas receptoras de plasminógeno puede inducir una respuesta en cascada del sistema de activación de plasminógeno uroquinasa (uPAS).

El sistema activador de plasminógeno uroquinasa (uPAS) consiste en el activador de plasminógeno uroquinasa (uPA), su receptor afín (uPAR) y dos inhibidores específicos, el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y el inhibidor del activador del plasminógeno 2 (PAI-2). El activador de plasminógeno uroquinasa convierte la proenzima plasminógeno en una serina proteasa activa, plasmina. La plasmina está involucrada en varios procesos de remodelación de tejidos, tal como la remodelación de la membrana basal (MB) y la matriz extracelular (MEC), que se requiere en la progresión tumoral y la metástasis. Además, se ha demostrado que el uPAS puede estar involucrado en la evolución neoplásica, afectando a la angiogénesis tumoral, la proliferación de células malignas, la adherencia y la migración, la intravascularización y el crecimiento en el sitio metastásico.

Específicamente, la activación del plasminógeno puede dar lugar a degradaciones de la matriz extracelular, que a su vez puede conducir a un aumento de la metástasis de las células cancerosas y la infiltración de células inmunes. En otras palabras, la expresión de ENO1 en las superficies de las células cancerosas como receptor del plasminógeno puede aumentar las actividades de invasión de las células cancerosas. Por lo tanto, la ENO1 es un objetivo potencial para la terapia del cáncer.

Sumario de la invención

Las realizaciones de la invención se refieren a agentes de unión dirigidos que se unen específicamente a la ENO1 humana, inhibiendo así la unión del ligando (por ejemplo, plasminógeno) a ENO1. Al inhibir la unión del plasminógeno a ENO1, los agentes de unión dirigidos de la invención pueden inhibir la activación del plasminógeno, llevando a una degradación reducida de la matriz extracelular, que a su vez previene o reduce la disociación de las células cancerosas de la matriz extracelular. Por lo tanto, los agentes de unión dirigidos de acuerdo con las realizaciones de la invención se pueden usar para inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis. Los mecanismos mediante los cuales se puede lograr esto pueden incluir, entre otros, la inhibición de la unión de un ligando (como el plasminógeno) a su receptor ENO1, o la anulación de las interacciones entre el receptor ENO1 y sus ligandos, reduciendo así la concentración efectiva de ENO1.

De acuerdo con una realización de la divulgación, un agente de unión dirigido es un anticuerpo que puede unirse a la ENO1 humana para evitar que sus ligandos (por ejemplo, plasminógeno) se unan a la ENO1. La prevención de la

unión del plasminógeno al receptor puede prevenir la activación del plasminógeno. Esto da como resultado la inhibición del sistema de activación del plasminógeno uroquinasa (uPAS) en la matriz extracelular de las células cancerosas.

- 5 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo puede unirse a ENO1 con afinidades altas, tal como con una K_d de menos de 0,3 nM. Dichos agentes de unión fuerte pueden inhibir la ENO1 con altas eficiencias.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un agente de unión dirigido es un anticuerpo que puede unirse a la ENO1 humana e inhibir la actividad de la plasmina inducida en células cancerosas con altas eficiencias, tal como una inhibición del 80 %, 90 % o 100 %. Los ensayos de inhibición se pueden realizar induciendo la expresión de ENO1 (por lo tanto, la activación del plasminógeno) en una célula cancerosa (tal como células de linfoma humanas U937) mediante tratamiento con 10 microgramos/ml de lipopolisacárido (LPS) durante 5 horas. La inhibición de tal actividad de plasmina inducida puede analizarse con un anticuerpo a una concentración adecuada. Usando un anticuerpo de la invención, dicha inhibición puede detectarse a concentraciones de anticuerpos tan bajas como 20 microgramos/ml o menos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un agente de unión dirigido es un anticuerpo que puede unirse a la ENO1 humana. Dicho anticuerpo puede usarse para inhibir la actividad de invasión de una célula cancerosa. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden inhibir más del 50 %, 60 % o 70 % de la actividad de invasión de las células de carcinoma de pulmón no microcítico humanas CL1-5 en concentraciones de anticuerpos tan bajas como 50 microgramos/ml o menos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un agente de unión dirigido es un anticuerpo que puede unirse a la ENO1 humana para inhibir la degradación de la matriz extracelular, inhibiendo así la disociación de las células cancerosas de la matriz extracelular. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede inhibir más del 40 %, 50 % o 60 % de la disociación mediada por plasminógeno de las células CL1-5 a partir de colágeno o fibronectina a concentraciones de anticuerpos tan bajas como 50 microgramos/ml o menos.

De acuerdo con las realizaciones de la divulgación, un agente de unión dirigido (es decir, un anticuerpo) puede comprender una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene una región determinante de la complementariedad (CDR) que comprende una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 1.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un agente de unión dirigido (es decir, un anticuerpo) puede comprender una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene una región determinante de la complementariedad (CDR) que comprende una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 2.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un agente de unión dirigido es un anticuerpo, que puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un anticuerpo que puede unir la proteína ENO1 humana comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende cualquiera de las secuencias LCDR1, LCDR2 o LCDR3 incluida en la secuencia 2.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un anticuerpo que puede unirse a la proteína ENO1 humana comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende dos cualquiera de las secuencias LCDR1, LCDR2 o LCDR3 incluida en la secuencia 2 (es decir, LCDR1 y LCDR2, LCDR1 y LCDR3 o LCDR2 y LCDR3).

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un anticuerpo que se puede unir a la proteína ENO1 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende las secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 incluidas en la secuencia 2. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, un anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo monoclonal completamente humano.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, un anticuerpo que puede unirse a la proteína ENO1 humana comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende cualquiera de las secuencias de HCDR1, HCDR2 o HCDR3 incluidas en la secuencia 1.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un anticuerpo que puede unirse a la proteína ENO1 humana comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende dos cualquiera de las secuencias de HCDR1, HCDR2 o HCDR3 incluidas en la secuencia 1 (es decir, HCDR1 y HCDR2, HCDR1 y HCDR3 o HCDR2 y HCDR3).

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un anticuerpo que puede unirse a la proteína ENO1 humana comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende las secuencias de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 incluidas en la secuencia 1. De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, un anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo monoclonal completamente humano.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un anticuerpo que puede unirse a la proteína ENO1 humana comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene una CDR que comprende una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 2. De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un anticuerpo puede unirse a la proteína ENO1 humana y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene una CDR que comprende una de las secuencias mostradas en las secuencias 1. De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado o completamente humano.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un anticuerpo que puede unirse a la proteína ENO1 humana comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 1 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 2. De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado o completamente humano.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un agente de unión dirigido (es decir, un anticuerpo) puede competir por la unión del plasminógeno a la proteína ENO1 humana. De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, dicho agente de unión dirigido comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene al menos una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 1 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene al menos una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 2.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, un agente de unión dirigido se puede unir a un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos ²⁹⁶FD Q D W G A W Q K F T A³⁰⁹ (SEQ ID NO:9) o ³²⁶K R I A K A V N E K S³³⁶ (SEQ ID NO:10) de la proteína ENO1 humana (GenBank: AAH50642.1). De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, dicho agente de unión dirigido comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene al menos una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 1 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene al menos una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 2.

De acuerdo con algunas realizaciones, el agente de unión de la invención puede comprender un sitio de unión a antígeno dentro de una molécula que no es anticuerpo. Por ejemplo, dicho agente de unión puede incluir una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de CDR en un andamio de proteínas que no son anticuerpos, como se trata más adelante.

Algunas realizaciones de la divulgación se refieren a métodos para evaluar el nivel de proteína ENO1 humana en un paciente o una muestra de paciente. Un método de la invención comprende poner en contacto un anticuerpo anti-ENO1 con una muestra biológica de un paciente y detectar el nivel de unión entre dicho anticuerpo y la proteína ENO1 humana en dicha muestra. En realizaciones más específicas, la muestra biológica es sangre o plasma.

Otras realizaciones de la divulgación se refieren a composiciones que comprenden un agente de unión dirigido, que puede incluir un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Aún otras realizaciones de la divulgación se refieren a métodos para tratar eficazmente a un sujeto (por ejemplo, humano o animal) que padece una enfermedad o trastorno de ENO1. El método puede incluir seleccionar a un sujeto que necesite un tratamiento para una enfermedad neoplásica o no neoplásica, y administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo (que puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado o completamente humano) que se une específicamente a la proteína ENO1.

El anticuerpo de la divulgación se puede usar para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la proteína ENO1 humana. Una enfermedad o trastorno relacionado con la proteína ENO1 humana puede ser cualquier afección que surja de la activación o expresión aberrante de la proteína ENO1 humana. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen cuando la proteína ENO1 humana interacciona de forma aberrante con sus ligandos, alterando así las propiedades de adhesión celular o señalización celular. Esta alteración en la adhesión celular o las propiedades de señalización celular pueden dar como resultado enfermedades neoplásicas o algunas enfermedades inmunitarias.

Por ejemplo, una enfermedad relacionada con la proteína ENO1 humana puede ser una enfermedad neoplásica, tal como cáncer de pulmón, mama, páncreas, hígado, colorrectal y de próstata.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, un agente de unión dirigido (por ejemplo, un anticuerpo) puede unirse al péptido que comprende la secuencia de aminoácidos ²⁹⁶FD Q D W G A W Q K F T³⁰⁸ (SEQ ID NO:9) o ³²⁶KRIAKAVNEK S³³⁶ (SEQ ID NO:10) de la proteína ENO1 humana (GenBank: AAH50642.1) y se puede usar para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la proteína ENO1 humana indicada anteriormente.

Realizaciones adicionales de la invención se refieren a métodos para inhibir la disociación celular inducida por ENO1 de la matriz extracelular de cáncer en un sujeto. Estos métodos pueden incluir la selección de un sujeto (por ejemplo, un ser humano o un animal) que necesite tratamiento para la disociación celular inducida por ENO1 y administrar a dicho sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a ENO1. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado o completamente humano.

Otras realizaciones de la invención se refieren a los usos de un anticuerpo de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con ENO1 en un sujeto (por ejemplo, un ser humano o un animal), en el que dicho anticuerpo se une específicamente a ENO1. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado o completamente humano.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, los agentes de unión dirigidos descritos en el presente documento pueden usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la disociación celular inducida por la proteína ENO1 a partir de la matriz extracelular en un animal, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a ENO1. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado o completamente humano.

Algunas realizaciones de la divulgación descrita en el presente documento se refieren a anticuerpos monoclonales que se unen a la ENO1 humana y afectan a las funciones de la ENO1 humana. Otras realizaciones de la divulgación se refieren a preparaciones de anticuerpos anti-ENO1 con propiedades deseables para aplicaciones de terapia. Tales propiedades pueden incluir una alta afinidad de unión para ENO1, la capacidad de neutralizar la actividad de ENO1 *in vitro* e *in vivo*, y la capacidad de inhibir la disociación, el crecimiento y la metástasis celulares inducidas por ENO1 de los tumores.

En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a un anticuerpo que puede unirse a ENO1 humana con una afinidad muy alta (es decir, una K_d baja). Por ejemplo un anticuerpo humano, de conejo, de ratón, quimérico o humanizado que es capaz de unirse a ENO1 con una K_d inferior a aproximadamente 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} o aproximadamente 10^{-11} M, o cualquier intervalo o valor entremedias. Las mediciones de la afinidad y/o avidez se pueden realizar utilizando ELISA y/o BIACORE, como se describe en el presente documento o de acuerdo con técnicas conocidas en la materia.

El anticuerpo anti-ENO1 puede ser un anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, que tiene una región Fc humana intacta) o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento Fab, Fab' o F(ab')₂, FV o Dab (los Dab son las unidades de unión funcionales más pequeñas de los anticuerpos humanos). Además, el anticuerpo puede fabricarse a partir de un hibridoma que secreta el anticuerpo, o de una célula producida de forma recombinante que se ha transformado o transfectado con un gen o genes que codifican el anticuerpo.

Otras realizaciones de la divulgación se refieren a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, vectores que tienen moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican anticuerpo anti-ENO1 o una célula huésped transformada con cualquiera de tales moléculas de ácido nucleico.

Además, algunas realizaciones de la divulgación se refieren a un método para producir un anticuerpo anti-ENO1 mediante el cultivo de células huésped en condiciones en las que se expresa una molécula de ácido nucleico para producir el anticuerpo, seguido de la recuperación del anticuerpo. Debe tenerse en cuenta que las realizaciones de la divulgación también pueden incluir cualquier molécula de ácido nucleico que codifique un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo de la invención, incluidas secuencias de ácido nucleico optimizadas para aumentar los rendimientos de anticuerpos o fragmentos de los mismos cuando se transfectan en células huésped para la producción de anticuerpos.

Otras realizaciones de la divulgación pueden referirse a métodos para producir anticuerpos de alta afinidad contra ENO1 humana mediante la inmunización de un mamífero con la proteína ENO1 humana, un fragmento del mismo y una o más secuencias ortólogas o fragmentos del mismo.

Otras realizaciones se refieren a la generación e identificación de anticuerpos aislados que pueden unirse específicamente a ENO1 humana. La inhibición de la actividad biológica de ENO1 puede efectuarse por estos anticuerpos para prevenir la disociación celular inducida por ENO1, la invasión y otros efectos deseados de los cánceres.

Otras realizaciones de la divulgación se refieren a composiciones farmacéuticas que tienen una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-ENO1. La composición puede comprender además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En aún otras realizaciones, el anticuerpo anti-ENO1, o un fragmento del mismo, se conjuga con un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, una toxina o un radioisótopo.

Aún otras realizaciones de la divulgación se refieren a métodos para tratar enfermedades o afecciones asociadas con la expresión de ENO1 en un paciente. Los métodos pueden incluir administrar a un paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-ENO1. El anticuerpo anti-ENO1 se puede administrar solo o se puede administrar en combinación con anticuerpos adicionales o un fármaco quimioterapéutico o radioterapia. Por ejemplo, una mezcla monoclonal, oligoclonal o policlonal del anticuerpo frente a ENO1 que bloquea la disociación celular se puede administrar en combinación con un medicamento que se ha demostrado que inhibe directamente la proliferación de células tumorales. El método puede realizarse *in vivo* y el paciente es, preferiblemente, un paciente humano. En una realización preferida, el método se refiere al tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la ENO1 que incluye, pero sin limitación, enfermedades neoplásicas, tales como cáncer de pulmón, mama, páncreas, hígado,

colorrectal, próstata y/o tumores sólidos.

Algunas realizaciones de la divulgación se refieren a un método para vigilar el desarrollo del cáncer. El método puede comprender determinar la abundancia de proteínas alfa-enolasa (ENO1) en una muestra (por ejemplo, células cancerosas), en el que un mayor nivel de ENO1 se correlaciona con la gravedad del cáncer. De acuerdo con realizaciones de la invención, la abundancia puede determinarse midiendo la unión de un anticuerpo específico de ENO1 a las proteínas ENO1.

Algunas realizaciones de la divulgación se refieren a un método para detectar cáncer. Dicho método puede comprender determinar la abundancia de anticuerpos específicos de ENO1 en muestras de suero, en las que un nivel bajo de anticuerpos específicos contra ENO1 indica la presencia de un tumor maligno.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B muestran los resultados de los estudios de la localización de la superficie celular de ENO1 en células malignas utilizando citometría de flujo (Figura 1A) e inmunotinción (Figura 1B), respectivamente. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el ejemplo 1. Los datos muestran que la ENO1 se encuentra en la superficie celular en células malignas (NHRI-L89 y CA926), pero no en las células epiteliales de pulmón normales (NHBE y SAEC).

La figura 2 muestra la inhibición de la actividad de invasión de las células de adenocarcinoma de pulmón CL1-5 altamente invasivas por anticuerpos policlonales contra la ENO1 de la superficie celular. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 2. Los datos muestran que la administración de anticuerpos policlonales anti-ENO1 atenúa la invasión de CL1-5.

La figura 3 muestra que un anticuerpo policlonal contra ENO1 humana atenúa la capacidad de invasión tisular de las células CL1-5F4 en pulmón. La administración de anticuerpo en un animal y la formación de colonias metastásicas del pulmón se controló 12 y 19 días después de la inyección del tumor utilizando un sistema IVIS. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 3. Los datos muestran que el anticuerpo policlonal contra ENO1 inhibe la migración de CL1-5F4 a los pulmones *in vivo*.

La Figura 4 muestra la generación de hibridomas de anticuerpos anti-ENO1 y la verificación de cada uno de los clones de anticuerpos monoclonales mediante citometría de flujo. Los procedimientos para la inmunización de ratones y la generación de hibridomas y la producción de cada anticuerpo y la verificación del anticuerpo mediante citometría de flujo se describieron en el Ejemplo 4. Los datos muestran que los 5 anticuerpos de hibridoma reconocen la superficie ENO1 en las células de adenocarcinoma de pulmón CL1-5F4.

La figura 5A muestra la unión de ENO1 en el ELISA de 5 anticuerpos aislados de ascitis de hibridomas individuales. La purificación de sulfato de amonio, la purificación en columna de proteína A y la purificación por SDS-PAGE se realizaron como se describe en el Ejemplo 5. Los datos en la figura 5B muestran los valores de K_d de 5 anticuerpos anti-ENO1 humana diferentes.

La figura 6 muestra los resultados del ensayo fibrinolítico U937 de 5 anticuerpos aislados de ascitis de hibridomas individuales, respectivamente. La inducción de la expresión de ENO1 por LPS en la línea celular de linfoma U937 humano y el ensayo de la actividad de plasmina se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 6. Estos datos también muestran que 5 anticuerpos anti-ENO1 diferentes tienen diferentes actividades de inhibición contra el receptor de plasminógeno de ENO1 y que las actividades de inhibición se correlacionan con los valores de K_d .

La figura 7 muestra los resultados de la inhibición de las actividades de invasión de las células CL1-5 tratadas con 5 anticuerpos diferentes aislados de ascitis de hibridomas individuales, respectivamente. Los procedimientos detallados fueron descritos en el Ejemplo 7. Estos datos muestran que los 5 anticuerpos anti-ENO1 diferentes pueden inhibir la actividad de invasión de las células CL1-5. De forma interesante, aunque el clon 8 tiene una K_d aproximadamente 7,2 veces más alta que la del clon 10, la inhibición de la actividad de invasión contra las células CL1-5 por el clon 8 es similar a la del clon 10.

La figura 8A muestra los resultados de las actividades de invasión de las células CL1-5 tratadas con diferentes concentraciones de mAb EN10 aislados de hibridoma. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 8. Estos datos muestran que el anticuerpo mAb EN10 inhibe la actividad de invasión de CL1-5 de una manera dependiente de la dosis.

La figura 8B muestra los resultados de las actividades de invasión de células U937 tratadas con diferentes concentraciones de mAb EN10 aislados de hibridoma, después de que la expresión de ENO1 en la superficie células fue inducida por LPS. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 8. Estos datos muestran que el mAb EN10 inhibe la actividad de invasión de las células U937 de una manera dependiente de la dosis.

La figura 9 muestra que el mAb EN10 reconoce la ENO1 en la superficie celular en células U937 tratadas con LPS. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 9.

La figura 10A muestra la actividad de adhesión de las células de carcinoma de pulmón CL1-5 a las proteínas de la matriz. El ensayo de adherencia se realizó como se describe en el Ejemplo 10. Estos datos muestran que las células CL1-5 tienen una mayor actividad de adhesión al colágeno y la fibronectina.

La figura 10B muestra los resultados de la inhibición de la disociación de las células CL1-5 de la fibronectina tratada con el mAb EN10. El ensayo de adhesión asociado a la célula se realizó como se describe en el Ejemplo 10. Estos datos muestran que el mAb EN10 inhibe la actividad de disociación celular de CL1-5 de la fibronectina de una manera dependiente de la dosis.

La figura 10C muestra los resultados de la inhibición de la disociación de células CL1-5 del colágeno tratado con el mAb EN10. El ensayo de adhesión asociado a la célula se realizó como se describe en el Ejemplo 10. Estos datos muestran que el mAb EN10 inhibe la actividad de disociación celular de CL1-5 a partir de colágeno de una manera dependiente de la dosis.

La figura 11A representa la secuencia de aminoácidos de la región de la cadena pesada variable del mAb EN10 (SEC ID NO: 1). Las regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4) y las CDR (HCDR1, HCDR2, y HCDR3) están indicadas. La clonación del mAb EN10 se realizó como se describe en el Ejemplo 11.

La figura 11B representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del mAb EN10 (SEQ ID NO: 2). Las regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4) y las CDR (LCDR1, LCDR2, y LCDR3) están indicadas. La clonación del mAb EN10 se realizó como se describe en el Ejemplo 11.

La figura 12A muestra las actividades de unión a mAb EN10 de los mutantes de delección de ENO1. El epítipo de unión del mAb EN10 se ubica entre el resto amino número 293 y 434 de la proteína ENO1 humana. La delección de la gran parte de ENO1 para determinar la región de unión del mAb EN10 se realizó como se describe en el Ejemplo 12.

La figura 12B muestra la SDS PAGE al 12 % de 6 proteínas mutantes por delección C-terminal de ENO1 purificadas a partir de *E. coli*. Los procedimientos detallados para la purificación de mutantes de delección de ENO1 se describen en el Ejemplo 12.

La figura 12C muestra las actividades de unión a mAb EN10 de 6 mutantes de delección C-terminal de ENO1. El epítipo de unión de mAb EN10 se ubica entre los restos amino número 296 y 336 de la proteína ENO1 humana. La delección de la porción grande de ENO1 para determinar la región de unión de mAb EN10 se realizó como se describe en el Ejemplo 12.

La figura 13A representa la estructura cristalina y los restos de aminoácidos de exposición superficial entre los números de aminoácidos 296 y 336 de ENO1 humana. La predicción de la estructura se describió en el Ejemplo 13.

La figura 13B muestra la SDS PAGE al 12 % de 11 proteínas mutantes de escaneo de alanina de ENO1 purificada a partir de *E. coli*. Los procedimientos detallados para la purificación de las proteínas de mutación de ENO1 se describen en el Ejemplo 13.

La figura 13C muestra el ELISA de unión a ENO1 y los valores de K_d de 11 mutantes de barrido de alanina contra el mAb EN10. El resultado sugiere que las secuencias del péptido 1 de ENO1, FD QDDWGAWQKFTA (SEQ ID NO: 9) y el péptido 2, K R I A K A V N E K S (SEQ ID NO:10), localizados entre el resto amino número 296 y 336 de ENO1 humano están involucrados en la unión de mAb EN10. El barrido de alanina se realizó como se describe en el ejemplo 13.

La figura 13D muestra las secuencias del péptido 1 de ENO1 (FD Q D W G A W Q K F T A (SEQ ID NO: 9)) y el péptido 2 (K R I A K A V N E K S (SEQ ID NO:10)) entre los restos amino número 296 y 336 de ENO1 humana (SEC ID NO: 49), que participan en la unión de ENO1 y mAb EN10 humanos.

La figura 14A muestra una estructura 3D de la proteína ENO1 humana. La figura 14B representa la estructura deducida del Fab del mAb EN10 (mostrada en hélice en cinta, cadena ligera gris, cadena pesada negra) en complejo con la región de unión al plasminógeno de la proteína ENO1 humana. La predicción de la estructura cristalina de la proteína ENO1 y el mAb EN10 se realizó como se describe en el Ejemplo 14.

La figura 15A muestra un vector de expresión para la generación de quimeras de ratón-humana de mAb EN10. Los procedimientos detallados para la purificación del anticuerpo quimera mAb EN10 se describen en el Ejemplo 15.

La figura 15B representa los resultados del uso del anticuerpo quimera para determinar las constantes de afinidad de unión y cinética de mAb EN10. Los procedimientos detallados de la expresión del anticuerpo quimera, la purificación y el análisis de K_d se realizaron como se describe en el Ejemplo 15.

La figura 16 muestra los efectos inhibidores de mAb EN10 sobre el crecimiento del tumor de pulmón en presencia de complemento. La administración de mAb EN10 y el retraso del crecimiento tumoral por tratamiento con anticuerpos se realizaron como se describe en el Ejemplo 16. Los datos muestran que la administración de mAb EN10 con complemento dos veces por semana tiene una eficacia similar a la tratada con la misma dosis del fármaco comercial Erbitux TM en el modelo de ratón con xenoinjerto CL1-5.

Las figuras 17A, 17B y 17C muestran los resultados del bloqueo de la diseminación tumoral de los cánceres de páncreas en el ensayo de formación de colonias metastásicas hepáticas y de bazo mediante el mAb EN10. La administración de mAb EN10 y la inhibición del crecimiento del tumor metastásico por tratamiento con anticuerpos se realizaron como se describe en el Ejemplo 17. Los resultados del estudio indican que la administración de 10 mpk (mg/kg) de mAb EN10 dos veces por semana disminuye el número de nódulos de tumores metastásicos, volúmenes tumorales y pesos tumorales de ratones en comparación con los de la misma dosis de IgG de control en el modelo de ratón metastásico del hígado con bazo.

Definiciones

Salvo que se definan de otra manera, los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica. Además, a no ser que el contexto requiera otra cosa, los términos en singular incluirán las pluralidades, y los términos en plural incluirán el singular. En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, y la química de proteínas y oligo o polinucleótidos e hibridación descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica.

Las técnicas estándar se utilizan para el ADN recombinante, la síntesis de oligonucleótidos y el cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como normalmente se efectúan en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden realizarse, en general, de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describen en varias referencias generales y más específicas que se citan y tratan a lo largo de la presente especificación. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 2001)), que se incorpora en el presente documento por referencia. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética, y química médica y farmacéutica que se describen en el presente documento son los conocidos y comúnmente usados en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para la síntesis química, los análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y liberación, y tratamiento de los pacientes.

Según se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, los siguientes términos, salvo que se indique lo contrario, se entenderán como que tienen los siguientes significados: El término "y/o" como se usa en el presente documento se debe tomar como divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como una descripción específica de cada uno de (i) A, (ii) B e (iii) A y B, como si cada uno de ellos se expusiera individualmente en el presente documento.

Un antagonista puede ser un polipéptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, un lípido, compuesto de peso molecular pequeño, un oligonucleótido, un oligopéptido, ARN de interferencia (iARN), antisentido, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos. Para una revisión del ARNi, véase Milhavet O, Gary D S, Mattson M P. (*Pharmacol Rev.* 2003 December; 55 (4):629-48. Review.) y para el enfoque antisentido, véase Opalinska J B, Gewirtz A M. (*Sci STKE.* 2003 Oct. 28; 2003 (206): pe47).

La activación o expresión aberrante relacionada con la enfermedad de "ENO1" puede ser una adhesión celular indeseable o patológica, por ejemplo, la adhesión celular relacionada con el tumor. Las enfermedades relacionadas con la adhesión celular incluyen, aunque sin limitación, tumores no sólidos, como leucemia o linfoma, y también tumores sólidos, como el melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma hepatocelular (hepático) "gástrico, de cabeza y cuello, del sistema hepático, estómago, mama, ovario, en el pulmón, en el pulmón, útero, vulva, colorrecto y páncreas.

El término ENO1 se refiere a la molécula de heterodímero enolasa que consiste en una ENO1 y ENO2 o ENO3.

Como se usan en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere en general y en general a inmunoglobulinas, autoanticuerpos, anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales, así como fragmentos activos de los mismos. El fragmento puede estar activo porque se une al antígeno afín o puede estar activo porque es biológicamente funcional. Los anticuerpos de la invención pueden ser quiméricos, humanizados o humanos, utilizando técnicas conocidas en la técnica.

Como se usan en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a los anticuerpos que son química e inmunológicamente homogéneos, generalmente producidos por hibridomas. Véase A Laboratory Manual, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor, N. Y. (1988).

- 5 Como se usan en el presente documento, la expresión "anticuerpo policlonal" se refiere a los anticuerpos que son producidos por más de un clon de células plasmáticas que sintetizan anticuerpos (linfocitos B) en respuesta al mismo antígeno. Generalmente son producidos por el animal después de que se inmuniza con el antígeno.

- 10 Como se usan en el presente documento, la expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a los anticuerpos que contienen secuencias de más de una fuente. Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden contener secuencias de fuentes no humanas que luego se modifican mediante la introducción de secuencias humanas. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que se introducen porciones mínimas de un anticuerpo no humano en un anticuerpo por lo demás humano. Como se usan en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína es sustancialmente no inmunogénica en seres humanos, con solo cambios o variaciones menores de secuencia.

- 20 Como se usan en el presente documento, la expresión "anticuerpo específico de alfa-enolasa" se refiere a un anticuerpo que tiene una alta especificidad para ENO1 de mamíferos, pero no para ENO2 o ENO3. Asimismo, la expresión "anticuerpo específico contra ENO1" se refiere a un anticuerpo que se une a la proteína alfa-enolasa.

- 25 El término "neutralizar" cuando se refiere a un agente de unión dirigido, tal como un anticuerpo, se refiere a la capacidad de dicho agente de unión dirigido para eliminar, o reducir significativamente, la actividad de un antígeno diana. En consecuencia, un anticuerpo "neutralizante" de ENO1 es capaz de eliminar o reducir significativamente la actividad de ENO1. Un anticuerpo neutralizante ENO1 puede, por ejemplo, actuar bloqueando la unión de ENO1 al plasminógeno. Al bloquear esta unión, la disociación celular mediada por plasminógeno es significativa o completamente eliminada. Idealmente, un anticuerpo neutralizante contra ENO1 mejora la adhesión celular.

- 30 El término "polipéptido" se usa en el presente documento como un término genérico para referirse a la proteína nativa, fragmentos, o análogos de una secuencia polipeptídica. Por tanto, la proteína nativa, los fragmentos y los análogos son especies del género polipeptídico. Los polipéptidos preferidos de acuerdo con la invención comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada humana y las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa humana, así como moléculas de anticuerpos formadas por combinaciones que comprenden moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera, tales como
- 35 las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa o lambda, y viceversa, así como fragmentos y análogos de los mismos. Los polipéptidos preferidos de acuerdo con la invención también pueden comprender únicamente las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada humana o fragmentos de las mismas.

- 40 El término "polinucleótido" como se refiere en el presente documento significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquiera de los tipos de nucleótidos, o heteroduplex de ARN-ADN. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

- 45 La expresión "región CDR" o "CDR" pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesadas o ligeras de la inmunoglobulina, según lo definido por Kabat et al., 1991 (Kabat, E. A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington), y ediciones posteriores. Un anticuerpo normalmente contiene 3 CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término CDR se usa en el presente documento para indicar, según el caso, una de estas regiones o varias, o incluso la totalidad, de estas regiones que contienen la mayoría de los restos de aminoácidos responsables de la
- 50 unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítopo que reconoce.

- Entre las seis secuencias cortas de CDR, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad debido esencialmente a los mecanismos de disposición de los genes que la originan). Puede ser tan corto como de 2 aminoácidos, aunque el tamaño más largo conocido es 26. La longitud
- 55 de la CDR también puede variar según la longitud que pueda acomodar el marco subyacente particular. Funcionalmente, HCDR3 desempeña un papel en parte en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal et al., PNAS, 71:4298 -4302, 1974).

- 60 La expresión "conjunto de CDR" referida en el presente documento comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Por lo tanto, un conjunto de HCDR se refiere a HCDR1, HCDR2 y HCDR3 (HCDR se refiere a un CDR de cadena pesada variable), y un conjunto de LCDR se refiere a LCDR1, LCDR2 y LCDR3 (LCDR se refiere a un CDR de cadena ligera variable). A menos que se indique otra cosa, un "conjunto de CDR" incluye HCDR y LCDR.

- 65 El término "corresponde a" se usa en el presente documento para significar que una secuencia de polinucleótidos es homóloga (es decir, es idéntica, no estrictamente relacionada evolutivamente) con la totalidad o una parte de una secuencia polinucleotídica de referencia, o que una secuencia polipeptídica es idéntica a una secuencia polipeptídica

de referencia.

En contraposición, el término "complementario a" se usa en el presente documento para indicar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o una parte de una secuencia de polinucleótido de referencia. A modo
5 ilustrativo, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

La expresión "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos son idénticas (es decir, en una base de nucleótido por nucleótido o de residuo por residuo) en la ventana de comparación. La
10 expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las se da una base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) o un residuo de aminoácido aparece en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el
15 porcentaje de identidad de secuencia.

Las expresiones "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico" como se usa en el presente documento denota una característica de una secuencia de polinucleótidos o de aminoácidos, en el que el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene al menos el 85 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente, al menos
20 del 90 al 95 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos un 99 por ciento de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de referencia en una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 aminoácidos), frecuentemente sobre una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 aminoácidos), en el que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir deleciones o adiciones que suman el 20 por ciento o
25 menos de la secuencia de referencia en la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor.

Como se usan en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales,
30 aminoácidos no naturales, tales como los aminoácidos α , α -disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N, N, N-trimetilsilina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación polipeptídica utilizada en el presente documento, la dirección a la izquierda es la dirección amino terminal y la dirección a la
35 derecha es la dirección carboxi-terminal, de acuerdo con el uso estándar y la convención.

Asimismo, a menos que se especifique otra cosa, el extremo de la izquierda de las secuencias de polinucleótidos monocatenarios es el extremo 5'; la dirección de la izquierda de las secuencias de polinucleótidos bicatenarias se
40 conoce como la dirección 5'. La dirección de la adición 5' a 3' de los transcritos de ARN nacientes se refiere a la dirección de transcripción; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 5' al extremo 5' del transcrito de ARN se conocen como "secuencias aguas arriba"; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 3' al extremo 3' del transcrito de ARN se conocen como "secuencias aguas abajo".

Aplicada a polipéptidos, la expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de hueco por defecto, comparten al menos un 80 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 90 por ciento
50 de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencia y lo más preferiblemente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Como se analiza en el presente documento, las variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos o las moléculas de inmunoglobulina se contemplan como abarcadas por la presente invención, siempre
55 que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos aproximadamente el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, un 90 %, 95 % y, lo más preferiblemente, aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina descritas en el presente documento. En particular, se contemplan reemplazos de aminoácidos conservadoras.

Si un cambio de aminoácido produce un péptido funcional se puede determinar fácilmente analizando la actividad específica del derivado polipeptídico. Los ensayos se describen con detalle en el presente documento. Los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina. Los extremos amino y carboxi preferidos de los fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse mediante la comparación de los
60 datos de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con las bases de datos de secuencias públicas o patentadas. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional

conocida. Bowie et al., (1991) Science 253:164. Por lo tanto, los ejemplos anteriores demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que pueden usarse para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con los anticuerpos descritos en el presente documento.

- 5 Un aspecto adicional de la divulgación es un agente de unión dirigido o una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH que tiene al menos aproximadamente 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VH de cualquiera de los anticuerpos mostrados en las secuencias 1, el listado de secuencias adjunto, un anticuerpo descrito en el presente documento o con una HCDR (por ejemplo, HCDR1, HCDR2 o HCDR3) mostrada en las secuencias 1. El agente de unión dirigido o la molécula de anticuerpo también puede comprender opcionalmente un dominio VL que tiene al menos aproximadamente 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VL cualquiera de los anticuerpos mostrados en las secuencias 2, el listado de secuencias adjunto, un anticuerpo descrito aquí, o con una LCDR (por ejemplo, LCDR1, LCDR2 o LCDR3) mostrada en las secuencias 2. Los algoritmos que se pueden usar para calcular el % de identidad de dos secuencias de aminoácidos comprenden, por ejemplo, BLAST (Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), o el algoritmo Smith-Waterman (Smith and Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147: 195-197), por ejemplo, empleando parámetros por defecto. En algunas realizaciones, el agente de unión dirigido o anticuerpo que comparte la identidad de la secuencia de aminoácidos como se ha descrito anteriormente, exhibe sustancialmente la misma actividad que los anticuerpos referenciados. Por ejemplo, sustancialmente la misma actividad comprende al menos una actividad que difiere de la actividad de los anticuerpos de referencia en no más de aproximadamente el 50 %, un 40 %, un 30 %, un 20 %, un 10 %, un 5 %, un 2 %, 1 % o menos.

- 25 Un sitio de unión a antígeno generalmente está formado por los dominios de inmunoglobulina variable pesada (VH) y variable (VL), con la interfaz de unión a antígeno formada por seis bucles polipeptídicos de superficie, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Hay tres CDR en cada VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y en cada VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), junto con las regiones de marco (FR).

- 30 Normalmente, un dominio VH está emparejado con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión a antígeno del anticuerpo, aunque se puede usar un dominio VH o VL solo para unir el antígeno. El dominio VH (por ejemplo, de la secuencia 1) se puede emparejar con el dominio VL (por ejemplo, de la secuencia 2), de modo que se forma un sitio de unión a antígeno del anticuerpo que comprende ambos dominios VH y VL. Se proporcionan realizaciones análogas para los otros dominios VH y VL divulgados en el presente documento. En otras realizaciones, las cadenas VH en las secuencias 1 se emparejan con un dominio VL heterólogo. La promiscuidad de la cadena ligera está bien establecida en la técnica. De nuevo, en la invención se proporcionan realizaciones análogas para los otros dominios VH y VL divulgados en el presente documento. Por lo tanto, la VH del anticuerpo padre o de cualquiera de las cadenas de anticuerpos en las secuencias 2 se puede emparejar con la VL del anticuerpo padre o de cualquiera de los anticuerpos en las secuencias 1 y 2 u otro anticuerpo.

- 40 Un sitio de unión a antígeno puede comprender un conjunto de CDR de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo padre o cualquiera de los anticuerpos en las secuencias 1 y 2 con hasta veinte, dieciséis, diez, nueve o menos, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o cinco adiciones, sustituciones, delecciones y/o inserciones dentro del conjunto divulgado de CDR de H y/o L. Dichas modificaciones pueden realizarse potencialmente en cualquier resto dentro del conjunto de CDR.

- 45 Las sustituciones aminoacídicas preferidas son aquéllas que: (1) reducir la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducir la susceptibilidad a la oxidación, (3) alterar la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alterar las afinidades de unión y (4) conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos análogos. Los análogos pueden incluir varias proteínas mutantes de una secuencia distinta de la secuencia peptídica de origen natural. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de uno o varios aminoácidos (preferentemente, sustituciones de aminoácidos conservadoras) en la secuencia de origen natural (preferentemente, en la parte del polipéptido de fuera del/de los dominio/s que forma/n contactos intermoleculares). Una sustitución conservadora de aminoácido no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (p. ej., un reemplazo de aminoácido no debería tender a romper una hélice que se encuentre en la secuencia parental o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia parental).

- 55 Un aspecto adicional de la invención es una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH que tiene al menos aproximadamente 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VH de cualquiera de los anticuerpos enumerados en la secuencia 1, el listado de secuencias adjunto o descrito en el presente documento, o con una HCDR (por ejemplo, HCDR1, HCDR2 o HCDR3) mostrada en las secuencias 1. La molécula de anticuerpo también puede comprender opcionalmente un dominio VL que tiene al menos 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VL de cualquiera de los anticuerpos mostrados en las secuencias 2, el listado de secuencias adjunto o descrito en el presente documento, o con una LCDR (por ejemplo, LCDR1, LCDR2 o LCDR3) mostrada en la secuencia 2. Los algoritmos que se pueden usar para calcular el % de identidad de dos secuencias de aminoácidos comprenden, por ejemplo el algoritmo BLAST, FASTA o Smith-Waterman.

Las variantes de los dominios VH y VL y las CDR de la presente invención, incluyendo aquellos para los que se exponen secuencias de aminoácidos en el presente documento, y que pueden emplearse en agentes de direccionamiento y los anticuerpos para la proteína ENO1 humana se pueden obtener por medio de métodos de alteración o mutación de la secuencia y detección selectiva de direccionamiento de antígenos con las características
 5 deseadas. Los ejemplos de características deseadas incluyen, pero sin limitaciones: afinidad de unión aumentada por el antígeno en relación con los anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno; aumento de la neutralización de una actividad antigénica con respecto a anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno si se conoce la actividad; capacidad competitiva especificada con un anticuerpo o ligando conocido al antígeno en una proporción molar específica; capacidad de inmunoprecipitar complejos; capacidad de unirse a un
 10 epítipo específico; epítipo lineal, por ejemplo, secuencia peptídica identificada utilizando exploración de unión a péptido como se describe en el presente documento, por ejemplo, utilizando péptidos cribados en conformación lineal y/o restringida; epítipo conformacional, formado por restos no continuos; capacidad para modular una nueva actividad biológica de la proteína ENO1 humana o molécula aguas abajo. Tales métodos también se proporcionan en el presente documento.

Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a un agente de unión dirigido (es decir, un anticuerpo) que incluye aquellos para los cuales la secuencia de aminoácidos se une al péptido epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 60, 70, 80, 85, 90, o aproximadamente 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos enumerada en las secuencias 9 o 10 en la proteína ENO1 humana y puede
 20 usarse para tratar una enfermedad o trastorno de la proteína ENO1 humana. Una enfermedad o trastorno relacionado con la proteína ENO1 humana puede ser cualquier afección que surja debido a la activación o expresión aberrante de la proteína ENO1 humana. En un ejemplo, la enfermedad relacionada con la proteína ENO1 humana es una enfermedad neoplásica como el cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma hepatocelular (hígado), cáncer gástrico (de estómago), cáncer de mama, adenocarcinoma del conducto pancreático.

Un sitio de unión a antígeno de anticuerpo compuesto por un dominio VH y un dominio VL está formado normalmente por seis bucles de polipéptido: tres del dominio variable de cadena ligera (VL) y tres del dominio variable de cadena pesada (VH). El análisis de los anticuerpos de estructura atómica conocida ha puesto de
 30 manifiesto relaciones entre la secuencia y la estructura tridimensional de los sitios de combinación de anticuerpos. Estas relaciones implican que, a excepción de la tercera región (bucle) en los dominios VH, los bucles de sitios de unión tienen una de una pequeña cantidad de conformaciones de la cadena principal: estructuras canónicas. Se ha demostrado que la estructura canónica formada en un bucle particular está determinada por su tamaño y la presencia de ciertos restos en los sitios clave, tanto en el bucle como en las regiones marco.

Las técnicas requeridas para hacer sustituciones dentro de secuencias de aminoácidos de las CDR, los dominios VH o VL del anticuerpo y/o los agentes de unión están generalmente disponibles en la técnica. Pueden hacerse secuencias variantes, con sustituciones que pueden o no pueden predecirse que tengan un efecto mínimo o
 35 beneficioso sobre la actividad, y se ha probado su capacidad para unirse y/o neutralizar y/o para cualquier otra propiedad deseada. De acuerdo con la presente invención, pueden emplearse variantes de secuencias de aminoácidos del dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se desvelan específicamente en el presente documento, como se ha tratado.

La expresión "fragmento de polipéptido" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero en el que la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a
 45 las posiciones correspondientes en la secuencia natural deducida, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADNc de longitud completa. Los fragmentos normalmente tienen una longitud de al menos aproximadamente 5, 6, 8 o 10 aminoácidos, preferiblemente de al menos aproximadamente 14 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, por lo general, de al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud y, aún más preferiblemente, de al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud. El término
 50 "análogo" como se usa en el presente documento se refiere a polipéptidos que comprenden un segmento de al menos aproximadamente 25 aminoácidos que tiene una identidad sustancial con una porción de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene al menos una de las siguientes propiedades: (1) unión específica a la proteína ENO1 humana en condiciones de unión adecuadas, (2) capacidad para bloquear la unión apropiada de ligando/proteína ENO1, o (3) capacidad para inhibir la actividad de la proteína ENO1. Normalmente, los análogos de polipéptidos comprenden una sustitución de aminoácidos conservadora (o adición o delección) con respecto a la
 55 secuencia de origen natural. Los análogos normalmente tienen al menos 20 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 50 aminoácidos de longitud o más, y con frecuencia pueden ser tan largos como un polipéptido natural de longitud completa.

Como se usan en el presente documento, un "agente de unión dirigido" es un agente, por ejemplo, anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, que se une preferentemente a un sitio diana. En una realización, el agente de unión dirigido es específico para un solo sitio diana. En otras realizaciones, el agente de enlace dirigido es específico para
 60 más de un sitio diana. En una realización, el agente de unión dirigido puede ser un anticuerpo monoclonal y el sitio diana puede ser un epítipo. Como se describe a continuación, un agente de unión dirigido puede comprender al menos un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, en el que dicho dominio está fusionado o contenido dentro de una proteína heteróloga.

Un anticuerpo puede ser oligoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado a CDR, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo catalítico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo antiidiotípico y anticuerpos que se pueden marcar en forma soluble o unida, así como en fragmentos, variantes o derivados de los mismos, ya sea solo o en combinación con otras secuencias de aminoácidos proporcionadas por técnicas conocidas. Un anticuerpo puede ser de cualquier especie. El término anticuerpo también incluye fragmentos de unión de los anticuerpos de la invención; fragmentos de ejemplo incluyen Fv, Fab, Fab', anticuerpo monocatenario (svFC), región variable dimérica (Diabody) y región variable estabilizada por disulfuro (dsFv). Los "fragmentos de unión" de un anticuerpo pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, y anticuerpos monocatenarios.

La digestión de anticuerpos con la enzima, papaína, da como resultado dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, conocidos también como fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc", que no tiene actividad de unión a antígeno pero tiene la capacidad de cristalizar. La digestión de anticuerpos con la enzima, pepsina, da como resultado el fragmento F(ab')₂ en el que los dos brazos de la molécula de anticuerpo permanecen unidos y comprenden dos sitios de unión a antígeno. El fragmento F(ab')₂ tienen la capacidad de reticular el antígeno. "Fv" cuando se usan en el presente documento se refiere al fragmento mínimo de un anticuerpo que retiene los sitios de reconocimiento a antígeno y de unión a antígeno. "Fab" cuando se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. El término "mAb" se refiere a anticuerpo monoclonal.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse de forma específica a una inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en grupos de moléculas químicamente activas en la superficie tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y pueden, pero no siempre, tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es ≤ 1 microM, preferentemente ≤ 100 nM y, lo más preferentemente, ≤ 10 nM.

"Activo" o "actividad" con respecto a un polipéptido ENO1 se refiere a una porción de un polipéptido ENO1 que tiene una actividad biológica o inmunológica de un polipéptido ENO1 nativo. "Biológico" cuando se usa en el presente documento se refiere a una función biológica que es el resultado de la actividad del polipéptido ENO1 nativo. Una actividad biológica de ENO1 preferida incluye, por ejemplo, ENO1 indujo la actividad de plasminógeno.

"Mamífero" cuando se usa en el presente documento se refiere a cualquier animal que se considera un mamífero. Preferentemente, el mamífero es un ser humano. El término "sujeto" incluye sujetos humanos y veterinarios.

La expresión "agente farmacéutico o fármaco", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición química capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente. Otros términos químicos en el presente documento se usan de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ilustra en el The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Como se usan en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición) y, preferiblemente, una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos alrededor del 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente el 85 %, 90 %, 95 % y 99 %. Lo más preferentemente, la especie objeto se purifica hasta homogeneidad esencial (la especie contaminante no puede detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales), en el que la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular.

Como se usan en el presente documento, el término "monitorización" se refiere al proceso de detección y/u observación del desarrollo del cáncer mediante la determinación de la abundancia de la proteína ENO1 en las células cancerosas.

Los métodos para determinar la abundancia de ENO1 incluyen, aunque sin limitación, la medición de la unión de proteínas ENO1 y anticuerpos específicos de ENO1, transferencia Western, citometría de flujo, inmunohistoquímica (IHC), RT-PCR y/o análisis de micromatrices.

Ejemplos

La práctica de la presente invención empleará tecnologías que comprenden técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, tecnología de anticuerpos e ingeniería genética, que están dentro de las habilidades

ordinarias de la técnica. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía.

Los siguientes ejemplos ilustran el desarrollo y uso de anticuerpos específicos de ENO1 para suprimir el crecimiento del tumor mediante la inducción de una respuesta inmune anti-ENO1.

5

Ejemplo 1

Localización en la superficie celular de ENO1 en células malignas

10 Para analizar la localización celular de ENO1 en las células malignas, se realizó citometría de flujo para confirmar la localización en la superficie celular de ENO1. Se obtuvieron células tumorales a partir de derrames pleurales de 17 pacientes con cáncer de pulmón. Entre ellos, las células tumorales obtenidas de 2 pacientes con cáncer, células tumorales de derrame HRI-L89 y CA926, son casos representativos que se muestran en el presente documento. Las células NHBE y SAEC son células primarias de pulmón humano normales. Las células enteras intactas se tiñeron con o sin antisuero ENO1 y se analizó la distribución de ENO1 en la superficie usando el anticuerpo específico frente a la proteína ENO1 en el análisis de citometría de flujo (como se muestra en la FIG. 1A). La localización celular de ENO1 de la línea celular de cáncer de pulmón NHRI-L89 se confirma adicionalmente mediante inmunohistología (Figura 1B). En resumen, se cultivaron 1×10^4 células NHRI-L89 en DMEM que contenía FCS al 10 % en un portaobjetos de cámara recubierto con fibronectina. Después de cultivo durante una noche, el portaobjetos se lavó con PBS y se bloqueó con suero de cabra durante 1 hora. Las células completas intactas NHRI-L89 se tiñeron con control (CTL) o anticuerpo ENO1 para ENO1 de superficie, seguido de tinción con PI para la detección nuclear. Las tinciones se visualizaron bajo un microscopio confocal (400x; FIG. 1B).

25 Los resultados de este estudio se muestran en la figura 1A (citometría de flujo) y 1B (inmunotinción). La incubación de NHRI-L89 and CA926 con anticuerpo frente a ENO1 desplaza el histograma a la derecha, en comparación con la incubación de las células con el anticuerpo de control. Las células primarias de pulmón humano SAEC y NHBE normales no muestran cambios significativos (Figura 1A). Este resultado indica que la proteína ENO1 se expresa en las células de cáncer de pulmón, pero no en las células primarias normales (Figura 1A). Cuando la localización celular de ENO1 se analizó adicionalmente mediante inmunohistología, las células NHRI-L89 intactas teñidas con el anticuerpo frente a ENO1 muestran las señales en la superficie celular (Figura 1B). Este resultado sugiere que ENO1 se expresa en la superficie del pulmón y algunas células cancerosas y, por lo tanto, puede ser un objetivo potencial para la terapia inmunológica.

Ejemplo 2

35

El anticuerpo anti-ENO1 inhibe la capacidad de invasión de las células de cáncer de pulmón humano

Para investigar los efectos del anticuerpo ENO1 en la invasión de células cancerosas, la actividad de invasión de las células CL1-5 se evaluó utilizando un ensayo Transwell añadiendo el anticuerpo frente a ENO1 a las células CL1-5 cultivadas en filtros de microporos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.) recubiertos con matriz extracelular (matrigel) (Becton Dickinson). Después de mezclar con diluciones 1:20, 1:100 y 1: 500 de anticuerpo policlonal anti-ENO1, respectivamente, se sembraron 2×10^4 células de CL1-5 en la cámara superior con medios que contenían FBS al 2 % de un sistema de ensayo de dos cámaras y se incubaron durante 24 horas con medio de FBS al 10 % en la cámara inferior. Se usó un anticuerpo policlonal de ratón anti-GST como grupo de control negativo. Se separaron dos cámaras mediante un filtro de microporos (tamaño de poro de 12 micrómetros) recubierto con matrigel. Después del período de incubación, se tiñeron los filtros recubiertos con matrigel y el número de células que invaden el filtro recubierto con matrigel se cuantificó bajo un microscopio. El estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media $\pm$ DE. Se utilizó el test para comparar la actividad entre cada grupo. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

50

Los resultados se muestran en la figura 2. No hay una diferencia significativa en el recuento de células entre los no tratados (160 ± 8 ; $N = 3$) y el grupo tratado con el anticuerpo policlonal anti-GST (168 ± 12 ; $N=3$). Sin embargo, cuando las células CL1-5 se administraron con diferentes diluciones de anticuerpo policlonal frente a ENO1, se reducen los recuentos de células de CL1-5, desde 52 ± 12 ($N = 3$) para la dilución 1:20 hasta 156 ± 30 ($N = 3$) para la dilución 1:500; La reducción es proporcional a las concentraciones del anticuerpo policlonal frente a ENO1. Existe una diferencia en el recuento estadístico entre la dilución 1:20 del anticuerpo policlonal frente a ENO1 y la dilución 1:20 de los grupos policlonales anti-GST ($P < 0,05$). Estos resultados sugieren que la administración del anticuerpo frente a ENO1 a las células cancerosas CL1-5 inhibe la actividad de invasión celular *in vitro*.

Ejemplo 3

60

El anticuerpo policlonal frente a ENO1 atenúa la capacidad de invasión tisular de las células CL1-5F4 en el pulmón.

65 Para investigar el efecto de la administración del anticuerpo frente a ENO1 en la metástasis de las células de cáncer de pulmón y evaluar el potencial del anticuerpo anti-ENO1 en la terapia del cáncer, se inyectaron por vía intravenosa células CL1-5F4 altamente invasivas con un gen informador de luciferasa (1×10^6 células/ratón) en ratones NOD-

SCID, junto con un anticuerpo frente a ENO1 o un antisuero de control (CTL) dos veces por semana. La formación de colonias metastásicas en los pulmones se controló 12 y 19 días después de la inyección del tumor utilizando un sistema IVIS. El ratón al que se han inyectado células CL1-5F4 con eliminación del gen ENO1 se utilizó como control negativo. Después de sacrificar a los ratones los días 12 y 19, las colonias metastásicas y los tamaños de los tumores se visualizaron y se contaron.

Los resultados se muestran en la figura 3. Cuando a un ratón portador de células CL1-5F4 con un gen indicador de luciferasa se administró un anticuerpo de control, el pulmón del ratón comenzó a mostrar señales de fluorescencia el día 12. Por otro lado, las señales no se detectaron en los ratones tratados con anticuerpo policlonal frente a ENO1 o en los ratones portadores de células CL1-5F4 y que tienen eliminación de gen de ENO1. El día 19, la señal del ratón tratado con anticuerpos de control pareció más fuerte, lo que indica la presencia de más invasión celular o crecimiento tumoral. El mismo día, aún no se habían detectado señales en el ratón tratado con el anticuerpo policlonal frente a ENO1 o en el ratón portador de las células CL1-5F4 con eliminación del gen de ENO1. Estos resultados indican que la metástasis de las células CL1-5F4 se vio comprometida por el anticuerpo frente a ENO1 o la eliminación del gen de ENO1 (figura 3; panel superior). Después de los días 12 y 19, se extirparon los pulmones de cada grupo de tratamiento y se determinaron los nódulos tumorales. Los resultados se muestran en los paneles inferiores en la figura 3. Hay unos pocos nódulos tumorales que aparecen en el ratón de tratamiento con anticuerpos de control con tamaños de tumores claros. Sin embargo, el ratón tratado con el anticuerpo policlonal anti-ENO1 o el ratón portador de eliminación de CL1-5F4/ENO1 no mostró nódulos tumorales claros, lo que indica el retraso de la metástasis tumoral en estos dos grupos de ratones. Los resultados de este estudio sugieren que la administración del anticuerpo frente a ENO1 tiene efectos antimetástasis o antiproliferación en las células cancerosas *in vivo* y el anticuerpo frente a ENO1 tiene aplicaciones potenciales en la terapia del cáncer.

Ejemplo 4

La generación de anticuerpo monoclonal anti-ENO1 humano.

De los ejemplos 2 y 3, está claro que el anticuerpo frente a ENO1 puede atenuar la invasión y la metástasis de las células cancerosas. Por lo tanto, el anticuerpo frente a ENO1 puede potencialmente desarrollarse como un anticuerpo terapéutico. Para generar un anticuerpo monoclonal contra la ENO1 humana, los ratones BALB/c se sensibilizaron con antígeno ENO1 humano recombinante purificado (50 µg/ratón), seguido de un refuerzo de las respuestas humores ENO1 con un adyuvante de CpG emulsionado. Se cosecharon los esplenocitos, fusionado con células Fo y, a continuación, se diluyeron según un protocolo estándar. Las células de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales que reconocen el antígeno de ENO1 se seleccionaron mediante un ELISA basado en antígeno. Los clones seleccionados se verificaron después por la actividad de unión de los anticuerpos a la ENO1 de la superficie celular en células de adenocarcinoma de pulmón CL1-5F4, utilizando tinción de células enteras intactas en análisis de citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 1.

Los resultados se muestran en la figura 4. Los cinco clones de anticuerpos aislados reconocen la ENO1 de la superficie celular en CL1-5F4, como lo evidencian los histogramas que se desplazan a la derecha, en comparación con el anticuerpo de control.

Ejemplo 5

El ELISA de unión a ENO1 de 5 clones de anticuerpos aislados

Para investigar las afinidades de unión a ENO1 de 5 clones de anticuerpos aislados anteriormente, se cultivaron los hibridomas individuales en RPMI que contenía FCS al 10 %. Después de una semana de cultivo, se recogieron 1×10^6 células, se lavaron con PBS, se resuspendieron en 200 µl de medio RPMI y se inyectaron en un ratón SCID mediante inyección IP. Después de 3 semanas, las actividades del ratón se recogieron y se diluyeron hasta 15 ml. El anticuerpo se purificó adicionalmente mediante un 40 % de precipitación con sulfato de amonio y una columna de Proteína A (kit de purificación de anticuerpos Montage Millipore). El anticuerpo purificado se concentró con un dispositivo de filtro centrífugo Amicon Ultra-15, siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante (Millipore). Las purezas de los anticuerpos se analizaron mediante SDS PAGE al 12 %. La proteína humana ENO1 (400 ng) se recubrió en una placa ELISA de 96 pocillos y la placa se lavó con PBS dos veces. Una serie de diluciones de 1×10^{-11} a 1×10^{-7} M de anticuerpos individuales se añadieron a la placa y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se añadió una IgG anti ratón de cabra conjugada con HPRT y después de 1 hora de incubación y luego se añadió TMB. Se leyó la DO405 para calcular la actividad. Cada estudio se repitió tres veces y los datos se presentaron como media $\pm$ desviación estándar. Las lecturas de DO y las concentraciones de anticuerpos se utilizaron para hacer un gráfico de dispersión múltiple utilizando Sigmoidplot™. Los valores de K_d de los clones se predijeron mediante un ajuste logístico de cuatro parámetros.

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 5. Todos los hibridomas de anticuerpos tienen productividades de 20,4 mg a 4,6 mg por ratón. Los valores de K_d de los anticuerpos oscilan entre $1,77 \times 10^{-10} \pm 0,12$ a $1,6 \times 10^{-5} \pm 0,2$ M (N=3). Estos resultados sugieren que estos 5 clones de anticuerpos reconocen la proteína ENO1 humana y que el clon 10 tiene la mejor afinidad con una K_d de aproximadamente $1,77 \times 10^{-10} \pm 0,12$ M (N = 3).

Ejemplo 6

Las actividades antagonistas del receptor de plasminógeno de 5 clones de anticuerpos aislados

- 5 Para estudiar las actividades antagonistas de ENO1 de un anticuerpo frente a ENO1 antihumano aislado, se cultivó una línea celular de linfoma humano U937 en RPMI que contenía FCS al 10 %. Las células se trataron con 10 microgramos/ml de LPS durante 6 horas para inducir la expresión de la proteína ENO1 en la superficie celular. Se preincubaron $1,5 \times 10^6$ células/ml en PBS con 1 microgramo/ml de Lys-plasminógeno humano y 10 microgramos/ml de diferentes clones de anticuerpos anti-ENO1 durante una hora, respectivamente. Las muestras se lavaron con PBS dos veces y luego se añadieron 3 nM de activador de plasminógeno específico del tejido y 0,5 mM de sustrato cromogénico S-2251. Después de una hora de incubación a 37 °C, se leyó la DO405 para calcular las actividades. Cada estudio se repitió tres veces y se analizaron las actividades antagonistas. Los datos se presentan como la media $\pm$ SD. Se utilizó la prueba T para comparar la actividad entre cada grupo. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

15 Los resultados de este estudio se muestran en la figura 6. Los 5 anticuerpos clones tienen actividades antagonistas del receptor de plasminógeno con inhibición, que van desde 52 % a 100% de la actividad específica de ENO1 inducida por LPS. Estos estudios sugieren que la actividad antagonista del receptor de plasminógeno es proporcional al valor de K_d de cada clon y que el clon 10 tiene la mejor actividad de inhibición, cerca del 100 % de inhibición de la actividad específica de ENO1 inducida por LPS.

Ejemplo 7

25 El anticuerpo monoclonal frente a ENO1 inhibe la capacidad de invasión de las células cancerosas del pulmón humano

30 La inhibición de la capacidad de invasión de las células CL1-5 por cada clon de anticuerpo se evaluó utilizando un ensayo Transwell utilizando filtros de microporos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.) recubiertos con matriz extracelular (matrigel) (Becton Dickinson). Después de mezclar con 10 microgramos/ml cada uno de los 5 anticuerpos clon, se sembraron 2×10^4 células en la cámara superior de un sistema de ensayo de dos cámaras y se incubaron durante 24 horas con medios que contenían FBS al 10 % en la cámara inferior. Se usaron IgG antimicrobiana y 5-aza-2-desoxicitidina (5ADC) como control negativo y control positivo, respectivamente. Dos cámaras se separaron mediante un filtro de microporos (tamaño de poro de 12 micrómetros) recubierto con matrigel. Después del período de incubación, se tiñeron los filtros recubiertos con matrigel y el número de células que invaden el filtro recubierto con matrigel se cuantificó bajo un microscopio. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentaron como media $\pm$ desviación estándar. Se utilizó la prueba T para comparar la actividad entre cada grupo. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

40 Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 7. Estos resultados muestran que todos los clones de anticuerpos contra ENO1 humanos tienen actividades inhibitorias contra la capacidad de invasión de CL1-5, y que el clon 10 tiene la mejor actividad de inhibición, aproximadamente $65,5 \pm 0,3$ % ($N = 3$) del grupo control IgG.

45 Tomando juntos los resultados de los ejemplos 5, 6 y 7, los clones 10 del anticuerpo frente a ENO1 humana se eligieron para un desarrollo adicional y se mencionaron como mAb EN10 en esta descripción.

Ejemplo 8

El mAb EN10 inhibe la capacidad de invasión de las células de cáncer de pulmón humano y las células de linfoma

50 La inhibición de la capacidad de invasión de las células CL1-5 mediante el mAb EN10 se evaluó utilizando un ensayo Transwell utilizando filtros de microporos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) recubierto con matriz extracelular (matrigel) (Becton Dickinson). Después de mezclar con 10, 50 y 100 microgramos/ml de mAb EN10, respectivamente, Se sembraron 2×10^4 células en la cámara superior con medios que contenían FBS al 2 % en un sistema de ensayo de dos cámaras y se incubaron durante 24 horas con medio de FBS al 10 % en la cámara inferior. Se usó una IgG anti-ratón como control negativo. Dos cámaras se separaron mediante un filtro de microporos (tamaño de poro de 12 μ m) recubierto con matrigel. Después del período de incubación, los filtros recubiertos con matrigel se tiñeron y el número de células que invadieron el filtro recubierto con matrigel se cuantificó bajo un microscopio. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media $\pm$ SD. Se usó la prueba T para comparar las actividades entre cada grupo. Los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos. Los resultados se muestran en la Figura 8A.

65 Asimismo, la inhibición de la capacidad de invasión de células U937 por mAb EN10 se evaluó utilizando un ensayo Transwell utilizando filtros de microporos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) recubierto con matriz extracelular (matrigel) (Becton Dickinson). Se cultivó una línea celular U937 de linfoma humano en RPMI que contenía FCS al 10 %. Las células se trataron con 10 microgramos/ml de LPS durante 6 horas para inducir la expresión de la proteína ENO1 en la superficie celular. Después de mezclar con 10, 50 y 100 microgramos/ml de mAb EN10,

respectivamente, se sembraron 2×10^4 células en la cámara superior de un sistema de ensayo de dos cámaras y se incubaron durante 24 horas con medios que contenían FBS al 10 % y MCP-1 10 nM en la cámara inferior. Se usó una IgG anti-ratón como control negativo. Dos cámaras se separaron mediante un filtro de microporos (tamaño de poro de 8 μ m) recubierto con matrigel. Después del período de incubación, las células en la cámara inferior se

contaron con un hemocitómetro bajo un microscopio. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentaron como media $\pm$ desviación estándar. Se usó la prueba T para comparar la actividad entre cada grupo. Los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

Los resultados se muestran en las figuras 8A y 8B. La actividad de invasión de CL1-5 se inhibió en un rango que va desde 31 ± 2 a 77 ± 1 % (N = 3) de la IgG de control, cuando las células se administraron con mAb EN10 de 10 microgramos/ml a 100 microgramos/ml (Figura 8A). Estos resultados son similares a los del Ejemplo 4 y la inhibición es proporcional a las concentraciones de mAb EN10 con una CE_{50} estimada en aproximadamente 30 microgramos/ml.

Para investigar si la inhibición de la invasión es aplicable a las otras células cancerosas, Las células U937 se trataron con un mAb EN10 que oscilaba entre 5 microgramos/ml y 50 microgramos/ml de manera similar. La actividad de invasión de U937 se inhibió en un rango que va desde $91,2 \pm 2$ a $49,1 \pm 1$ % (N = 3) de la IgG de control (Figura 8B). Estos resultados indican que las actividades de invasión de CL1-5 y U937 están inhibidas por el mAb EN10 de forma dependiente de la dosis, presumiblemente al inhibir la actividad del receptor de plasminógeno de ENO1.

Ejemplo 9

El mAb EN10 reconoce la ENO1 de superficie inducida por LPS en células de linfoma

Se cultivó una línea celular U937 de linfoma humano en RPMI que contenía FCS al 10 %. Las células se trataron con 1 microgramo/ml de LPS durante 6 horas para inducir la expresión de la proteína ENO1 en la superficie celular, las células enteras intactas se tiñeron con o sin mAb EN10 (dilución 1:300), se visualizaron con IgG anti ratón de cabra conjugada con FITC (Jackson Lab) y se analizaron con citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). La expresión de ENO1 se mide por la intensidad de fluorescencia resultante.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 9. La incubación de U937 con LPS y el tratamiento con mAb EN10 desplaza el histograma a la derecha, en comparación con la incubación de células sin tratamiento con LPS pero con tratamiento con mAb EN10, lo que indica que las células U937 expresan ENO1 en sus superficies celulares. Estos datos confirman que el mAb EN10 reconoce LA ENO1 de superficie inducida por LPS en células de linfoma

Ejemplo 10

El mAb EN10 inhibe la disociación de las células CL-5 del colágeno y la fibronectina

Para evaluar la vía de transducción de señales entre el receptor de plasminógeno ENO1-plasminógeno y sustratos extracelulares, 1 mg/ml de gelatina, 100 microgramos/ml de fibrinógeno, 10 microgramos/ml de colágeno y 10 microgramos/ml de fibronectina, respectivamente, se recubrieron en una placa de ELISA no tratada durante la noche. Se sembraron células CL1-5 (4×10^4 células) en la placa y se añadieron 50 microgramos/ml de mAb EN10 a 200 μ l de DMEM que contenía FCS al 10 %. Las células se incubaron a 37 °C durante 24 horas y luego se lavaron con PBS dos veces. Se añadió WST al 10% y las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Los números de células relativos en la placa se estimaron mediante la lectura de la DO450. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media $\pm$ SD. Se usó la prueba T para comparar la actividad entre cada grupo. Los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 10A. Estos datos indican que las lecturas de la DO450 en las placas recubiertas con fibronectina y colágeno son de $2,45 \pm 0,37$ (N = 3) y $1,83 \pm 0,44$ (N = 3). Las lecturas son mucho más altas que las de las placas con gelatina y fibrinógeno, que no son significativamente diferentes de la lectura de fondo. No hay diferencias significativas entre el grupo tratado con mAb EN10 y el grupo no tratado. Estos resultados sugieren que las células CL1-5 favorecen la unión a la fibronectina y el colágeno, y el mAb EN10 no participa en la ruta de asociación celular cuando las células se incuban en el medio sin proteasas aguas abajo, por ejemplo, plasminógeno y tPA. Los datos en la figura 10A sugieren que la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 está implicada en la ruta de asociación celular en la matriz extracelular.

También se probó si ENO1 participa en la ruta de disociación celular en la matriz extracelular. Una placa de ELISA no tratada se recubrió con un microgramo/ml de fibronectina y 10 microgramos/ml de colágeno, respectivamente, durante la noche. Se sembraron células CL1-5 (4×10^4 células) en la placa, y 0, 6,25, 12,5, 25 y 50 microgramos/ml de mAb EN10, respectivamente, se añadieron a 200 microl de DMEM que contenía FCS al 10 %. Además, se añadieron 10 microgramos/ml de Glu-plasminógeno y 2 nM de tPA. Las células se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se lavaron con PBS dos veces. Después, se añadió WST al 10% y las mezclas de reacción se incubaron a

37 °C durante 4 horas. Los números de células relativas en la placa se estimaron mediante las lecturas de la DO450. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como media $\pm$ SD. Se usó la prueba T para comparar la actividad entre cada grupo. Los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 10B y la figura 10C. Los datos indican que los números de células son directamente proporcionales a las concentraciones de mAb EN10 en las matrices extracelulares cuando el medio contiene las proteasas aguas abajo del receptor de ENO1 plasminógeno y tPA. Hay una diferencia significativa entre el grupo tratado con 50 microgramos de mAb EN10 y el grupo control de IgG ($P < 0,05$) en ambos estudios de matriz extracelular. Estos resultados sugieren que ENO1 participa en la ruta de disociación de las células CL1-5 de las matrices extracelulares, presumiblemente al aumentar la actividad de la plasmina y de la proteasa tPA. El mAb EN10, funcionando como antagonista de ENO1, bloquea la actividad del receptor de ENO1, lo que da como resultado la inhibición de la activación de la plasmina y de tPA y, por lo tanto, inhibe la actividad de disociación de las células CL1-5 de las matrices extracelulares y la invasión.

Ejemplo 11

Preparación de genes que codifican anticuerpos monoclonales

La clonación del gen que codifica el anticuerpo mAb EN10 se realiza de acuerdo con los métodos descritos a continuación.

(1) Clonación de ADNc de genes de anticuerpos y preparación

El hibridoma se cultivó en un medio RPMI (fabricado por Gibco) que contenía un FCS al 10 %. Una vez que el número de células alcanzó aproximadamente $10 \times 10^6/\text{ml}$, las células se recolectaron por centrifugación y luego se añadió TRIzol® (fabricado por Invitrogen) para extraer el ARN total de acuerdo con el manual de instrucciones. La clonación de la región variable de los ADNc de anticuerpos se realizó utilizando un conjunto de cebadores de Ig de ratón (fabricado por Novagen) de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto.

(a) La síntesis del ADNc de 1 hebra se realizó de acuerdo con el manual de instrucciones del sistema de síntesis de primera cadena SuperScript® III (fabricado por Invitrogen).

El ADNc de primera hebra se preparó utilizando 5 microgramos del ARN total como molde. Se mezclaron cinco microgramos de ARN de hibridoma total, 1 microl de 50 ng/microl de cebadores aleatorios y 1 microl de dNTP 10 mM, y se añadió agua tratada con DEPC a 10 microl en un tubo de 200 l de PCR. La mezcla de reacción se incubó a 65 °C durante 5 min y luego se colocó en hielo durante al menos 1 minuto. Se añadieron diez (10) microl de la mezcla de síntesis de ADNc que contenía 2 microl de tampón 10x RT, 4 microl de MgCl_2 25 mM, 2microl de DTT, 1 microl de 4 unidades de RNaseOUT™ y 1 microl de 200 unidades de SuperScript® III RT, se mezclaron suavemente y se recogieron mediante breve centrifugación. El tubo de reacción se incubó durante 10 minutos a 25 °C y siguió durante 50 minutos a 50 °C. La reacción se finalizó a 85 °C durante 5 minutos y se enfrió en hielo. El tubo se centrifugó brevemente para recoger la reacción y se añadió 1 microl de RNasa H y se incubó durante 20 minutos a 37 °C.

(b) Amplificación por PCR de los genes de cadena pesada y los genes de cadena ligera

Se preparó una solución de reacción que tenía una composición de 5 microl de ADNc, 5 microl de tampón de reacción 10x, 1 microl de mezcla de dNTP 10 mM, 1 microlitro de polimerasa Taq de 2,5 unidades y 1 microlitro del cebador directo 1 y 1 microlitro del cebador inverso 2 proporcionado por el conjunto de cebadores en un volumen final de 50 microlitros con agua destilada doble y se sometió a PCR.

Para la amplificación de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo, se utilizó un ciclo de 94 °C durante 10 minutos, después un ciclo de 94 °C durante un minuto, 52 °C durante un minuto y 72 °C durante 1 minuto se repitieron 35 veces, y la reacción se incubó a 72 °C durante 10 minutos más. La solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2 % para analizar los productos de la reacción. Los productos con los pesos moleculares correctos, aproximadamente 463 bps para la cadena pesada y 451 bps para la cadena ligera, se ligaron a un vector pCR 2.1-TOPO (fabricado por Invitrogen) para la subclonación de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto. A continuación se usaron los cebadores M13 directo (5'-GTAAACAAC GACG- GCGAG-3'(SEQ ID NO:11) y M13 inverso (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC--3' (SEQ ID NO:12)) para determinar la secuencia de nucleótidos. Según la información de la secuencia, las secuencias de anticuerpos se tradujeron en secuencias de proteínas mediante ExPASy-Translation Tool. Las secuencias resultantes del mAb EN10 comprenden una secuencia de aminoácidos de cadena pesada y una secuencia de cadena ligera que tiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que se determinaron mediante el método publicado por Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Publicación del NIH 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3.

La figura 11A representa la secuencia de aminoácidos de la región de la cadena pesada variable del mAb EN10 (SEC ID NO: 1). Las regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4) y las CDR (HCDR1(SEQ ID NO: 3), HCDR2(SEQ ID

NO: 4) y HCDR3(SEQ ID NO: 5) están indicadas.

La figura 11B representa las secuencias de aminoácidos de la región de la cadena ligera variable de mAb EN10 (SEC ID NO: 2). Las regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4) y las CDR (LCDR1(SEQ ID NO: 6), LCDR2(SEQ ID NO: 7) y LCDR3(SEQ ID NO: 8) están indicadas.

Ejemplo 12 Mapeo de epítomos

Mapeo de epítomos de anticuerpos

Para determinar el epítipo de mAb EN10 en la proteína ENO1 humana, se diseñaron dos cebadores directos, con las secuencias de nucleótidos de 5'-GGATCCGCGAGCAAACCTTCAGGGAAGCCATG-3' (SEQ ID NO:13) y 5'-GGATCCTCGAAGATC- CCTTTGACCAGGATG-3' (SEQ ID NO:14), y un cebador inverso 5'-TCAGGCTGAAAATCTCTCATCCGC-3 (SEQ ID NO:15). Se usó un plásmido de expresión de *E. coli* TRC-HIS ENO1 que contenía el gen del ADNc de ENO1 humana como molde para amplificar los mutantes de delección de ENO1. Se usaron los cebadores con las SEQ NO:13 y SEQ NO:14 como cebadores directos, con la SEQ ID NO:15 como cebador inverso, para amplificar las mutantes de delección Δ 1-189(Fig. 12A) y Δ 1-297 (Fig. 12A), respectivamente. El otro conjunto de cebadores, que tienen las secuencias de 5'-GGATCCTATCTATTCTCAAGATCCATGCC-3' (SEQ ID NO: 16) y 5'-CTCGAGGTCATGGTGTCTCATCGTTCGCTCGAG-3' (SEQ ID NO: 17) se usó para amplificar un mutante de delección Δ 297-434. Para la amplificación de cada mutante, se preparó una solución de reacción que tenía una composición de 1 microl de una dilución 1:1000 de ADN molde aproximadamente 0,1 ng, 5 microl de 10xtampón de reacción, 1 microl de mezcla de dNTP 10 mM, 1 microl de 2,5 unidades de polimerasa Taq, 1microl del cebador directo y 1 microl del cebador inverso, en un volumen final de 50 microlitros con agua destilada doble y se sometió a PCR. Se utilizó un ciclo de 94 °C durante 10 minutos, luego un ciclo de 94 °C durante un minuto, 52 °C durante un minuto y 72 °C durante 1 minuto se repitieron 35 veces, y la reacción se incubó a 72 °C durante 10 minutos más. Esta solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2 % para analizar los productos de reacción. Los productos de reacción con los pesos moleculares correctos se ligaron en un vector pCR 2.1-TOPO (fabricado por Invitrogen) para la subclonación de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto. A continuación se usaron los cebadores directo M13 (5'-GTAAACAACGACGGCGAG--3'(SEQ ID NO: 11) e inverso M13 (5'- CAG GAAACA GCT ATG AC- 3' (SEQ ID NO: 12)) para determinar la secuencia de nucleótidos. Cada clon de mutación con las secuencias correctas se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I, y los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2 %. El fragmento de inserción de cada mutante se cortó del gel de agarosa y se purificó con un kit de limpieza de genes de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto proporcionado por el fabricante (BIO101). El fragmento de ADN de *Bam*HI y *Xho*I de cada mutante se ligó a los sitios *Bam*HI y *Xho*I de un vector de expresión de *E. coli* pTRC His A (Invitrogen). El plásmido resultante se transformó en *E. coli* BL21 Rosseta. La proteína de mutación ENO1 se expresó en *E. coli* por inducción con IPTG y se purificó con agarosa de Ni de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto proporcionado por el fabricante (Qiagen) después de que se aplicaron ultrasonidos al sedimento de bacterias. La pureza de cada mutante se analizó mediante SDS PAGE al 12 %. Para determinar la actividad de unión de cada proteína mutante, se recubrieron 400 ng de proteína ENO1 humana en una placa ELISA de 96 pocillos y la placa se lavó con PBS. Se añadieron 10 microgramos de mAb EN10 a la placa y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de que el complejo de unión se lavara con PBS dos veces, se añadió una IgG anti-ratón de cabra conjugada con HPRT. Después de 1 hora de incubación, se añadió TMB. La afinidad de unión se determinó por las lecturas de la DO 405. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media $\pm$ SD. Se usó la prueba T para comparar la actividad entre cada grupo. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Los resultados se presentan en la FIG. 12A. Los mutantes DE ENO1 Δ 1-189 y Δ 1-297 tienen lecturas de la DO405 de aproximadamente $1,43 \pm 0,18$ y $1,56 \pm 0,08$ ($N = 3$) (estos son 1,43 y 1,56 en la Figura 12A), que son aproximadamente 42 % y 39 % de los de la ENO1 de origen natural ($2,87 \pm 0,08$) ($N = 3$), respectivamente. Sin embargo, cuando se eliminaron los restos de aminoácidos de 297 a 434, la actividad de unión de esta ENO1 mutada al mAb EN10 se había perdido, en comparación con el fondo de BSA. Estos resultados sugieren que se requieren restos de aminoácidos de 297 a 434 para la unión de la proteína ENO1 a mAb EN10 y la disminución en la actividad de unión de los mutantes -1-182 y -1-297 puede deberse a la inestabilidad o al cambio de conformación de las proteínas mutantes.

Para explorar más a fondo el epítipo de mAb EN10 en la proteína ENO1, se diseñaron 5 cebadores inversos, que tienen las secuencias de 5'-CTCGAGAGGGATCTTCGATAGACACCACTGGG-3' (SEQ ID NO:18), 5'-CTCGAGCTACCTGGATTCTGCACTGGCTG-3' (SEQ ID NO:19), 5'-CTCGAGACTTCTCGTTCACGGCCTTGGCGATC-3'(SEQ ID NO:20), 5'-CTCGAGACTTCTCGTTCACGGCCTTGGCGATCC-3' (SEQ ID NO:21), 5'-CTCGAGCAGTCTCCCCGAACGATGAGACACC-3' (SEQ ID NO:22), y 5'-CTCGAG CACCAGTCTTGATCTGCCAGTGAC-3' (SEQ ID NO:23). Se usó un plásmido de expresión de *E.coli* TRC-HIS ENO1 que contenía el gen del ADNc de ENO1 humana como molde para amplificar los mutantes de delección de ENO1. La SEQ ID NO: 16 se usó como cebador directo para amplificar los mutantes de delección 296-434, 316-434, 336-434, 376-434 y 396-434 con las SEQ ID NO:18, SEQ ID:19, SEQ ID:20, SEQ ID:21, SEQ ID:22 y SEQ ID:23,

respectivamente. Para la amplificación de cada mutante, se preparó una solución de reacción que tenía una composición de 1 microl de una dilución 1:1000 de ADN molde aproximadamente 0,1 ng, 5 microl de 10xtampón de reacción, 1 microl de mezcla de dNTP 10 mM, 1 microl de 2,5 unidades de polimerasa Taq, 1 microl del cebador directo y 1 microl del cebador inverso, en un volumen final de 50 microlitros con agua destilada doble y se sometió a PCR. Se utilizó un ciclo de 94 °C durante 10 minutos. Después, un ciclo de 94 °C durante un minuto, 52 °C durante un minuto y 72 °C durante 1 minuto se repitieron 35 veces, y la reacción se incubó a 72 °C durante 10 minutos más. Esta solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2 % para analizar los productos de reacción. Los productos de reacción con los pesos moleculares correctos se ligaron en un vector pCR 2.1-TOPO (fabricado por Invitrogen) para la subclonación de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto. A continuación se usaron los cebadores directo M13 (5'-GTAAACAACGACGGCGAG--3'(SEQ ID NO: 11) e inverso M13 (5'- CAG GAAACA GCT ATG AC- 3' (SEQ ID NO: 12)) para determinar la secuencia de nucleótidos. Cada clon de mutación con la secuencia correcta se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I y el producto de la digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2 %. El fragmento de ADN de cada mutante se aisló del gel de agarosa y se purificó con un kit Gene Clean de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto proporcionado por el fabricante (BIO101). El fragmento de ADN *Bam*HI y *Xho*I de cada mutante se ligó en los sitios *Bam*HI y *Xho*I de un vector de expresión de *E. coli* pTRC His A (Invitrogen). El plásmido resultante se transformó en *E. coli* BL21 Rosseta. La proteína de mutación ENO1 se expresó en *E. coli* por inducción con IPTG y se purificó con agarosa de Ni de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto proporcionado por el fabricante (Qiagen) después de que se aplicaron ultrasonidos al sedimento de bacterias. La pureza de cada mutante se analizó mediante SDS PAGE al 12 %. Para determinar la actividad de unión de cada proteína mutante, Se recubrieron 400 ng de proteína ENO1 humana en una placa ELISA de 96 pocillos y la placa se lavó con PBS. Se añadieron 10 microgramos de mAb EN10 y se incubaron a 37 ° C durante 1 hora. Después de que el complejo de unión se lavara con PBS dos veces, se añadió una IgG anti-ratón de cabra conjugada con HPRT. Después de 1 hora de incubación, se añadió TMB. La afinidad de unión se determinó por las lecturas de la DO 405. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media $\pm$ SD. Se usó la prueba T para comparar la actividad entre cada grupo. Los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

El 12 % de SDS PAGE de cada mutante y la proteína de tipo salvaje se muestran en la figura 12B. El peso molecular de cada mutante aumenta desde el mutante 296-343 hasta el tipo salvaje. Este resultado sugiere que podemos producir la proteína completa de cada mutante, aunque se puede ver cierta degradación de los mutantes 336-434 y 376-434. Como se muestra en la figura 12 C, no hay una diferencia significativa entre la afinidad de unión a mAb EN10 de la ENO1 de tipo salvaje y las de los mutantes por delección 336-434, 376-434 y 369-343. Sin embargo, cuando se eliminan los restos de aminoácidos de 296 a 316 y de 317 a 336, Las actividades de unión a mAb EN10 de estos dos mutantes ENO1 se pierden, en comparación con el lisado de fondo de células de *E. coli*. Estos resultados sugieren que los restos de aminoácidos de 296 a 336 (FDQDDWGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAVNEKS, SEQ ID NO:49) son importantes para la unión de la proteína ENO1 con el mAb EN10.

Ejemplo 13 Barrido de alanina

Para explorar más a fondo qué restos del 296 al 336 de ENO1 humano son importantes para la unión del mAb EN10, la estructura cristalina de ENO1 se descargó del banco de datos de proteínas (entrada pdb: 2PSN). Después del análisis de la estructura, los restos de aminoácidos D300, W301, G302, Q305, K306, A309, K326, K330, N333, E334 y K335 se ha predicho que se exponen a la superficie de la proteína y son candidatas para que las mutaciones analicen si son realmente importantes para la unión del mAb EN10. Se eligió 10 de estos 11 restos para mutar a alanina, excepto por A309, que se mutó a glicina usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto proporcionado por el fabricante (Agilent Technology). Genomics BioScience and Technology Co. generó los siguientes oligonucleótidos mutagénicos para el análisis de la alanina (Tabla 1). Ltd.

TABLA 1: Oligo

Secuencias 5'-GATCCCTTTGACCAGGATGCCTGGGGAGCTTGCC-3' (SEQ ID NO:24)
 5'-CTGCCAAGCTCCCCAGGCATCCTGGTCAAAGGGATC-3' (SEQ ID NO:25)
 5'-CCCTTTGACCAGGATGACGCGGGAGCTTGGCAGAAG-3' (SEQ ID NO:26)
 5'-CTTCTGCCAAGCTCCCGCGTCATCCTGGTCAAAGGG-3' (SEQ ID NO:27)
 5'-CTTTGACCAGGATGACTGGGCAGCTTGGCAGAAGTTC-3' (SEQ ID NO:28)
 5'-GAACCTTGCCAAGCTGCCAGTCATCCTGGTCAAAG-3' (SEQ ID NO:29)
 5'-GACTGGGGAGCTTGGGCGAAGTTCACAGCCAGTGCA-3' (SEQ ID NO:30)
 5'-TGCACTGGCTGTGAACCTCGCCCAAGCTCCCCAGTC-3' (SEQ ID NO:31)
 5'-GGGGAGCTTGGCAGGCGTTCACAGCCAGTGCAAG-3' (SEQ ID NO:32)
 5'-CCTGCACTGGCTGTGAACGCTGCCAAGCTCCCC-3' (SEQ ID NO:33)
 5'-GGCAGAAGTTCACAGGCAGTGCAAGATCCAGGTAG-3' (SEQ ID NO:34)
 5'-CTACCTGGATTCTGCACTGCCTGTGAACCTCTGCC-3' (SEQ ID NO:35)
 C5'-TCACAGTGACCAACCCAGCGAGGATCGCCAAGGCC-3' (SEQ ID NO:36)
 5'-GCCTTGCGCATCCTCGCTGGGTTGGTCACTGTGAG-3' (SEQ ID NO:37)
 5'-CAACCCAAAGAGGATCGCCGCGGCCGTGAACGAGAAG-3' (SEQ ID NO:38)

(continuación)

5'-CTTCTCGTTCACGGCCGCGGCGATCCTCTTTGGGTTG-3' (SEQ ID NO:39)
 5'-GAGGATCGCCAAGGCCGTGGCCGAGAAGTCCTGCAAC-3' (SEQ ID NO:40)
 5'-GTTGCAGGACTTCTCGGCCACGGCCTTGGCGATCCTC-3' (SEQ ID NO:41)
 5'-GATCGCCAAGGCCGTGAACGCGAAGTCCTGCAACTG-3' C(SEQ ID NO:42)
 5'-GCAGTTGCAGGACTTCGCGTTCACGGCCTTGGCGATC-3' (SEQ ID NO:43)
 5'-GCCAAGGCCGTGAACGAGGCGTCCTGCAACTGCCTC-3' (SEQ ID NO:44)
 5'-GAGGCAGTTGCAGGACGCTCGTTCACGGCCTTGGC-3' (SEQ ID NO:45)
 5'-CAAGGCCGTGAACGCGGCGTCCTGCAACTGCCTCCTG-3' (SEQ ID NO:46)
 5'-CAGGAGGCAGTTGCAGGACGCCGCTTCACGGCCTTG-3' (SEQ ID NO:47)

Para la amplificación de cada mutante, una solución de reacción que tiene una composición de 3 microlitros de ADN molde a de aproximadamente 30 ng, 5 microl de tampón de reacción 10x, 1 microl de mezcla de dNTP 10 mM, 1 microl de 2,5 unidades de polimerasa pfu, 12,5 microlitros de 125 ng de cebador directo y 12,5 microlitros de 125 ng de cebador inverso en un volumen final de 50 microlitros con agua destilada doble y se sometieron a PCR. Se utilizó un ciclo de 95 °C durante 10 minutos. Después, un ciclo de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 6 minutos se repitieron 16 veces. Después de la reacción de PCR, se añadió 1 microl de *DpnI* a cada tubo de PCR, se incubó a 37 °C durante 1 hora y luego se calentó II para inactivarlo a 80 °C durante 20 minutos. Los productos de reacción se transformaron en 50 microl de células competentes XL1-Blue-micro de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto (fabricado por Invitrogen). Se usó un cebador ENO1 R400-420 (5'-GCAAGGGGCAC-CAGTCTTGATCTG - 3'(SEQ ID NO:48) para determinar la secuencia de nucleótidos. Todos los plásmidos de clon de mutación con secuencias correctas se transformaron en *E. coli* BL21 Rosseta. La proteína de mutación ENO1 se expresó en *E. coli* por inducción con IPTG y se purificó con agarosa de Ni de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto proporcionado por el fabricante (Qiagen) después de que se aplicaron ultrasonidos al sedimento de bacterias. La pureza de cada proteína mutante se analizó mediante SDS PAGE al 12 %.

Para determinar la actividad de unión de cada proteína mutante, Se recubrieron 400 ng/100 microl de proteína ENO1 humana o proteína ENO1 mutada en una placa ELISA de 96 pocillos durante la noche a 4 °C y la placa se lavó con PBS. La placa se bloqueó con BSA al 1 % (p/v) en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se lavó de nuevo con 1x PBS. Un anticuerpo primario (mAb EN10) se diluyó en serie 2 veces a 15 concentraciones diferentes y se añadió a la placa a 37 °C durante 1 hora. Después de realizar la reacción, la placa se lavó 3 veces con 1 x PBS. Se añadió dilución A1/8000 del anticuerpo anti-ratón-HRP de cabra y se incubó a 37 °C durante 1 hora, luego la placa se lavó 3 veces con 1 x PBS. Luego, se añadió sustrato TMB y se dejó que la acción procediera a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se detuvo añadiendo HCl 1 N y se leyó la DO 450 para determinar la actividad. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como media $\pm$ SD y se usaron las lecturas y las concentraciones de anticuerpo para hacer un diagrama de dispersión múltiple utilizando Sigmaplot TM. Los valores de K_d se predijeron mediante un ajuste logístico de cuatro parámetros.

De acuerdo con los resultados del estudio de eliminación de gran parte ENO1 mostrados en el Ejemplo 9, se requiere una secuencia peptídica FDQDDWGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIKAVNEKS (SEQ ID NO: 49) del número de resto 296 a 336 para la unión fuerte de la proteína ENO1 con mAb EN10. La "unión firme" como se usa en el presente documento se refiere a la unión entre un agente de unión específico (por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento scFv o Fab) y un ligando/objetivo (por ejemplo, un péptido, proteína o célula) con una constante de disociación (K_d) de 10 nM o inferior, preferiblemente 1,0 nM o menos.

Los experimentos de delección anteriores identifican los restos 296 a 336 en ENO1 como la región para la unión del anticuerpo. Para caracterizar adicionalmente los sitios de unión reales (por ejemplo, epítomos), la estructura cristalina de ENO1 se descargó del banco de datos de proteínas (entrada pdb: 2PSN) para analizar las posiciones de los restos de esta región. Hay once restos de aminoácidos, incluyendo D300, W301, G302, Q305, K306, A309, K326, K330, N333, E334 y K335 expuestos en la superficie proteica (FIG. 13A, epítomo putativo). Mediante mutagénesis dirigida a sitio, estos 11 aminoácidos se mutaron y las proteínas mutantes resultantes se expresaron en *E. coli* y se purificaron, respectivamente (figura 13B). Cada proteína ENO1 mutante purificada se analizó para detectar cualquier cambio de K_d (en comparación con la unión de ENO1) utilizando ELISA.

Los resultados indican que hay tres clases funcionales de restos de aminoácidos en estos mutantes. Los restos de aminoácidos W301 y K330 son importantes para la unión entre la proteína ENO1 y el mAb EN10. Si estos dos restos de aminoácidos se mutan a alanina, respectivamente, las actividades de unión de estos dos mutantes de ENO1 a mAb EN10 están significativamente comprometidas. La segunda clase de restos de aminoácidos incluye A309, E334, K335 y D300. Si E334, K335 y D300 están mutados a alanina o A309 ha mutado a glicina, respectivamente, las actividades de unión de estos mutantes de ENO1 a mAb EN10 están comprometidas. El resto de restos de aminoácidos, incluyendo G302, Q305, K306, N333 y K326 pertenecen al grupo de restos de aminoácidos que no tienen efectos de unión significativos sobre la unión de la proteína ENO1 a mAb EN10 (FIG.13C y Tabla 2). Estos resultados sugieren que W301, K330A309, E334, K335 y D300 son importantes para la unión proteína-proteína entre el mAb ENO1 y EN10. Estos restos de aminoácidos pertenecen a secuencias del péptido 1 ENO1, ²⁹⁶FD Q D W G A W Q K F T A³⁰⁹(FIG.13D,SEQ ID NO:9) y péptido 2,³²⁶ K R I A K A V N E K S³³⁶ (FIG.13D,SEQ ID NO:10), que pueden ser los epítomos de unión de mAb EN10 en el número de resto amino de 296 a 335 (FIG.13D; SEQ ID

NO:49) de ENO1 humana.

Tabla 2: Valores de la K_d mutante

Mutante	KD	Mutante	KD	Mutante	KD
Tipo silvestre	$4,43 \pm 0,65 \times 10^{-10}$	A300	$6,33 \pm 2,57 \times 10^{-8}$	A301	No detectado
A302	$3,45 \pm 0,28 \times 10^{-10}$	A305	$3,31 \pm 0,50 \times 10^{-10}$	A306	$4,65 \pm 2,42 \times 10^{-10}$
A309	$5,63 \pm 2,67 \times 10^{-9}$	A326	$7,87 \pm 1,35 \times 10^{-10}$	A330	No detectado
A333	$4,13 \pm 1,09 \times 10^{-10}$	A334	$1,07 \pm 4,39 \times 10^{-7}$	A335	$9,57 \pm 3,72 \times 10^{-9}$

Ejemplo 14

5

Análisis de estructura de ENO1 y mAb EN10

La estructura cristalina de Enolasa alfa se descargó del banco de datos de proteínas (entrada pdb: 2PSN). La estructura del fragmento Fab de mAb EN10 se construyó mediante el modelo de homología. La primera etapa fue encontrar una estructura de molde con una alta similitud de secuencia con el mAb EN10. Se buscó en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y se encontraron muchos resultados altamente homólogos. El marco de la cadena pesada (entrada pdb: 3DGG) (identidad 89 %) y el marco de la cadena ligera (entrada de pdb: 1F6L) (identidad 95 %). El modelo de homología de anticuerpos de mAb EN10 se construyó con los programas Accelrys Discovery Studio. ENO1 y las estructuras de anticuerpos se utilizaron para el acoplamiento. Para aliviar la carga computacional, solo los bucles de CDR del dominio variable de los anticuerpos se acoplaron a ENO1. El marco del anticuerpo está fijo. Dado que el procedimiento de acoplamiento explora un área relativamente grande alrededor de la posición inicial, no se requirió un posicionamiento inicial muy cuidadoso de los compañeros de acoplamiento. Cuando se utilizó ZDock, las estructuras se perturbaban con movimientos del eje x-y-z (perturbación a lo largo de la línea de centros, en angstroms perturbación en el plano perpendicular a la línea de centros, en angstroms (perturbación rotacional, en grados) y se generaron aproximadamente 5000 poses para cada ejecución de acoplamiento. El análisis de agrupamiento de los resultados de ZDock se realizó con un corte de 5 Å y 10 Å. Se eligieron los restos de interacción de ENO1 para el mapeo de epítomos.

La estructura 3D de la proteína ENO1 humana se muestra en la Figura 14A. Los restos de aminoácidos W301, K330,300D, E334, Y K335 están marcados. Los restos críticos en el sitio de unión al plasminógeno de la proteína ENO1 publicados por Wang et al. se indican (250-FFRSGKY 256). La Figura 14B muestra que el complejo de unión de ENO1 y mAb EN10 se predice de aproximadamente 5 Å a 15 Å cerca del sitio de unión al plasminógeno de ENO1. La brecha entre el sitio de unión al plasminógeno y el mAb EN10 es mucho menor que 34 Å, que es el tamaño molecular del plasminógeno humano. Este estudio sugiere que la unión de ENO1 y mAb EN10 protege el sitio de unión a plasminógeno de ENO1, impide el acceso de plasminógeno a ENO1, da como resultado comprometer la actividad del receptor de plasminógeno de ENO1 y previenen la disociación celular de la matriz extracelular.

Ejemplo 15

35

Análisis Biacore

El análisis Biacore utilizando una proteína ENO1 soluble para unirse a los anticuerpos inmovilizados en chips CM5 se realizó para el mAb EN10 para estimar su afinidad por el antígeno soluble.

40

La región variable del ratón y el vector de expresión pTCAE8-ENO1 del anticuerpo quimérico de Fc humano, como se muestra en la figura 15A, se introdujo en las células huésped para preparar células recombinantes que expresan anticuerpos. Como las células huésped para la expresión, se utilizaron las células FreeStyle293 (fabricadas por Invitrogen). El vector se introdujo en las células huésped mediante lipofectamina 2000 de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto (fabricado por Invitrogen). Aproximadamente 2,5 microgramos del vector de expresión del anticuerpo se linealizaron mediante enzimas de restricción, el gen se introdujo en 4×10^6 células y las células se inocularon en una placa de cultivo de a6 pocillos. Se añadió el agente correspondiente a un marcador de selección del vector de expresión, y las células se cultivaron continuamente para formar un conjunto estable.

50

Se preparó un sobrenadante de cultivo que contenía anticuerpo IgG humano por el método descrito a continuación. Las células productoras de anticuerpos se aclimataron en un medio de expresión aFree style™ 293 (GIBCO). Las células se cultivaron en un matraz de cultivo tisular y el sobrenadante del cultivo se recogió cuando la tasa viable de las células era del 90 %. El sobrenadante recogido se filtró a través de filtros de 10 micrómetros y 0,2 micrómetros (fabricados por Millipore) para eliminar los contaminantes. El sobrenadante de cultivo que contenía el anticuerpo se purificó por afinidad utilizando Proteína A (fabricada por Millipore), PBS como tampón de absorción, y tampón de citrato de sodio 20 mM (pH 3,0) como tampón de elución. Las fracciones de elución se ajustaron a aproximadamente pH 6,0 añadiendo tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0). La solución de anticuerpo preparada se reemplazó con PBS utilizando una membrana de diálisis (corte de 10,000 MW, fabricada por Spectrum Laboratories) y se

55

esterilizó por filtración a través de un filtro de membrana (fabricado por Millipore) que tenía un tamaño de poro de 0,22 micrómetros para producir el anticuerpo purificado. La concentración del anticuerpo purificado se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y convirtiendo el valor medido basado en una densidad óptima de 1,45 que equivale a 1 mg/ml.

Para cinética de unión, se usó medición de resonancia de plasmón superficial (SPR) con un BIAcore 2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) como se ha descrito anteriormente (Karlsson & Falt, (1997) J. Immunol Methods 200:121-133). Los chips biosensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) se activaron con N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida clorhidrato (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. Quimera mAb EN10 se diluyó con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 microgramos/ml antes de la inyección a una velocidad de flujo de 20 microlitros por minuto para lograr aproximadamente 100 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada, seguida de la inyección de etanolamina 1M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, Se inyectaron diluciones seriales dobles de ENO1 (0,3125 nM a 40 nM) en el tampón de ejecución HBS-PBiacore proporcionado por el fabricante (BIAcore, Inc., Piscataway, N. J.) a 25 °C a un caudal de 25 microl/min y las respuestas de unión en el mAb EN10 se corrigieron mediante resta de las respuestas de una célula de flujo. Las tasas de asociación (k_{on} o k_a) y las tasas de disociación (k_{off} o k_d) se calcularon utilizando un modelo de unión de Langmuir uno a uno simple con accesorios separados de k_{on} y k_{off} se utilizó. (BIAcore.TM. Software de evaluación versión 3.2).

Tabla 3

mAb EN10				
k_a	k_d	K_d	Rmax (UR)	χ^2 (UR ²)
3,577E,+5	8,271E,-5	2,313E,-10	176,8	0,668
3,575E+5	8,250E-5	2,308E-10	123,1	1,10
3,58±0,01E+5	8,26±0,01E-5	2,311 ±0,003E-10	150 ± 38	0,88 ± 0,31

Los resultados se muestran en la figura 15B y la Tabla 3. Las k_{on} y k_{off} de mAb EN10 que se une a ENO1 son $3,57 \times 10^5$ y $8,27 \times 10^{-5}$ respectivamente, y K_d es $2,311 \pm 0,003 \times 10^{-10}$ mol/l. La K_d analizada por SPR es muy similar a la de ELISA de unión en el Ejemplo 2.

Ejemplo 16

Efecto inhibitorio del anticuerpo EN10 sobre el crecimiento tumoral en presencia de complemento.

El mAb EN10 tiene una buena afinidad con K_d de aproximadamente $2,311 \pm 0,003 \times 10^{-10}$ mol/y un potencial para el desarrollo adicional. Para evaluar los efectos terapéuticos de mAb EN10, se realizó un modelo de xenoinjerto de ratón CL1-5. Las células de adenocarcinoma de pulmón CL1-5F4 (1×10^6 células/ratón; 5 ratones/grupo) se inocularon por vía subcutánea el día 0. El procedimiento terapéutico se realizó 14 días después de la inoculación del tumor administrando 10 mpk (mg/Kg) de un control de isotipo (CTL), mAb EN10, o anticuerpo Erbitux[™] dos veces por semana. El suero de conejo neonato se administró 2 h después de la inyección. El volumen del tumor y el peso corporal de cada ratón se midieron semanalmente. Los datos se representan como media ± desviación estándar para grupos individuales.

Los resultados se muestran en la figura 16. Después de 14 días, el tamaño del tumor de los ratones que tienen CL1-5 es de aproximadamente 30 a 100 mm³, y no hay diferencias significativas en el tamaño del tumor entre el grupo de control, los grupos de tratamiento con mAb EN10 y Erbitux después del día 25. Después del día 29, el tumor de ratones en el grupo de control comienza a crecer exponencialmente, y no hay crecimientos tumorales significativos en los ratones de tratamiento con mAb EN10 y Erbitux[™]. Después del día 36, el tamaño promedio del tumor de los ratones del grupo de control es 4330 ± 990 mm³ (N = 5), y para los ratones tratados con 10 mpk de mAb EN10 y Erbitux, los tamaños promedio del tumor son $358,6 \pm 240$ mm³ (N=5) and 219 ± 98 mm³ (N=5), respectivamente. Los tamaños promedio de los tumores de los grupos de tratamiento con mAb EN10 y Erbitux[™] son significativamente más pequeños, en comparación con la del grupo de control con un valor de P de 0,004 y 0,003, respectivamente. No hay diferencia significativa en el tamaño del tumor entre los grupos de tratamiento con mAb EN10 y Erbitux[™] (P = 0,41). Este resultado indica que mAb EN10 y Erbitux tienen la actividad de inhibición del crecimiento tumoral en las células CL1-5 cuando se combinan con el complemento C3 en el modelo de ratón con xenoinjerto y el mAb EN10 tiene una buena eficacia como reactivo para el tratamiento del cáncer.

Ejemplo 17

Bloqueo de la diseminación tumoral de las células pancreáticas en el ensayo de formación de colonias metastásicas de hígado y bazo.

Los resultados de los ejemplos 2 y 3 sugieren que la administración del anticuerpo ENO1 puede atenuar la invasión y la metástasis de las células cancerosas y los resultados del ejemplo 16 indican que el mAb de ENO1 tiene eficacia para inhibir el crecimiento del tumor cuando se combina con el complemento. Para evaluar la actividad

antimetastásica del mAb EN10 en células cancerosas *in vivo*, se realizó un ensayo metastásico de hígado de bazo. Las células de adenocarcinoma pancreático PDAC1 (1×10^6 /ratón; 5 ratones/grupo) se inyectaron en el bazo. Después, se administraron 10 mpk de ratones de control mAb EN10 e IgG en cada grupo por IP, respectivamente. Los ratones se escarificaron 6 semanas después de la inoculación del tumor. El número de nódulos tumorales en los

hígados y el peso de los órganos, incluyendo pulmones, bazos, hígados, páncreas y riñones, de cada ratón se contaron y se midieron, respectivamente. Los datos se representan como media $\pm$ desviación estándar para grupos individuales.

Los resultados se muestran en las Figuras 17A, 17B y 17C. Cuando se comparan nódulos y volúmenes de tumor hepático, los nódulos tumorales promedio y los volúmenes del grupo tratado con IgG de control son 34 ± 10 ($N = 3$) y 8500 ± 3500 ($N = 5$), respectivamente. Sin embargo, como el mismo fondo, los ratones se trataron con 10 mpk de mAb EN10, los nódulos tumorales promedio y los volúmenes de ratones tratados son 10 ± 4 ($N = 3$) y 500 ± 120 ($N = 5$), respectivamente. Hay diferencias significativas en cuanto a número y volumen de nódulos tumorales entre 10 mpk de ENO1 y los grupos tratados con IgG de control ($P < 0,05$) (FIG. 17A y 17B). Cuando se compararon los pesos promedio de los órganos entre los grupos de tratamiento de 10 mpk ENO1 y IgG de control, no hay diferencias significativas en el peso de los órganos, incluyendo pulmones, bazos, páncreas, y riñones. Sin embargo, los ratones tratados con 10mpk IgG tienen un peso medio en el hígado de aproximadamente $7,2 \pm 3$ g ($N = 5$), que es estadísticamente diferente, en comparación con la de los ratones tratados con 10mpk mAb EN10 ($1,6 \pm 0,2$ g ($N = 5$), $p < 0,05$). Estos resultados sugieren que la administración de mAb EN10 inhibe la metástasis de las células PDAC1 desde el sitio del tumor primario hasta el hígado.

En resumen, el mAb EN10 utiliza su actividad antagonista del receptor de plasminógeno ENO1 para inhibir la activación del plasminógeno, induciendo así la regulación por disminución de la actividad de la proteasa en la superficie celular, que a su vez resulta en la inhibición de la disociación de las células cancerosas de la matriz extracelular. Como resultado, los anticuerpos contra ENO1 pueden inhibir la capacidad de invasión de las células cancerosas. Estos datos avalan que los anticuerpos frente a ENO1 (por ejemplo, mAb EN10) tienen afinidad favorable, eficacia y potencial como anticuerpo terapéutico para el tratamiento de cánceres.

Además de inhibir la disociación del cáncer de la matriz extracelular y, por lo tanto, inhibiendo la invasión del cáncer, un anticuerpo de la invención también puede usarse para diagnosticar una afección cancerosa. Como se ha indicado anteriormente y se muestra en las figuras 1A y 1B, las células cancerosas expresan ENO1 en las superficies celulares, mientras que las células normales no lo hacen. Por lo tanto, se puede detectar la unión del anticuerpo a la superficie celular ENO1 como una indicación de condiciones cancerosas.

Por ejemplo, De acuerdo con realizaciones de la invención, una muestra de prueba puede reaccionar con un anticuerpo anti-ENO1 (por ejemplo, mAb EN10) y puede determinarse la unión del anticuerpo a la muestra, tal como con un ELISA, clasificación de células fluorescentes, microscopio de fluorescencia, o cualquier método adecuado conocido en la técnica. Si se detecta la unión o está por encima de un valor de umbral (por ejemplo, un valor de referencia para una muestra normal), se puede concluir que la muestra contiene células cancerosas.

Si bien la invención se ha descrito con respecto a un número limitado de realizaciones, los expertos en la técnica, teniendo beneficio de esta divulgación, apreciarán que pueden idearse otras realizaciones que no se aparten del alcance de la invención como se describe en el presente documento. En consecuencia, el alcance de la invención debe estar limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Development Center for Biotechnology

<120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE LA ENOLASA Y MÉTODOS DE USO EN LA TERAPIA DEL CÁNCER

<130> 17787/016001

<160> 49

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

ES 2 729 797 T3

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Cys
20 25 30

Val Met Asn Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Phe Tyr Tyr Gly Asn Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 108

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

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

ES 2 729 797 T3

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Arg
100 105

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 3

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Cys Val Met Asn
1 5 10

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 4

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

Gly

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 5

Gly Phe Tyr Tyr Gly Asn Phe Asp Asn
1 5

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 6

ES 2 729 797 T3

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Thr
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 7

Asn Ala Lys Thr Leu Pro Glu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 8

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Phe Asp Gln Asp Asp Trp Gly Ala Trp Gln Lys Phe Thr Ala
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Lys Arg Ile Ala Lys Ala Val Asn Glu Lys Ser
1 5 10

<210> 11
<211> 18
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> sintético

<400> 11

gtaaacaacg acggcgag

<210> 12
<211> 17
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> sintético

	<400> 12 caggaaacag ctatgac	17
5	<210> 13 <211> 30 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> sintético	
	<400> 13 ggatccgcag caaacttcag ggaagccatg	30
15	<210> 14 <211> 30 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> sintético	
	<400> 14 ggatcctcga agatcccttt gaccaggatg	30
25	<210> 15 <211> 24 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> sintético	
	<400> 15 tcagggtgaa aatctctcat ccgc	24
35	<210> 16 <211> 29 <212> ADN <213> artificial	
40	<220> <223> sintético	
45	<400> 16 ggatcctatc tattctcaag atccatgcc	29
50	<210> 17 <211> 33 <212> ADN <213> artificial	
55	<220> <223> sintético	
	<400> 17 ctcgagggtca tgggtgtctca tcgttcgctc gag	33
60	<210> 18 <211> 32 <212> ADN <213> artificial	

	<220> <223> sintético	
5	<400> 18 ctcgagaggg atcttcgata gacaccactg gg	32
10	<210> 19 <211> 30 <212> ADN <213> artificial	
15	<220> <223> sintético	
	<400> 19 ctcgagctac ctggattcct gcactggctg	30
20	<210> 20 <211> 32 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> sintético	
	<400> 20 ctcgagactt ctcgttcacg gccttggcga tc	32
30	<210> 21 <211> 33 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> sintético	
40	<400> 21 ctcgagactt ctcgttcacg gccttggcga tcc	33
45	<210> 22 <211> 32 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> sintético	
50	<400> 22 ctcgagcagt ctccccgaa cgatgagaca cc	32
55	<210> 23 <211> 32 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> sintético	
60	<400> 23 ctcgagcacc agtcttgatc tgcccagtgc ac	32
65	<210> 24 <211> 36 <212> ADN	

	<213> artificial	
	<220>	
	<223> sintético	
5	<400> 24	
	gatccctttg accaggatgc ctggggagct tggcag	36
10	<210> 25	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> sintético	
	<400> 25	
	ctgccaaagct cccaggcat cctgggtcaaa gggatc	36
20	<210> 26	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
25	<220>	
	<223> sintético	
	<400> 26	
30	ccctttgacc aggatgacgc gggagcttgg cagaag	36
	<210> 27	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
35	<220>	
	<223> sintético	
	<400> 27	
40	cttctgccaa gctcccgcgt catcctggtc aaaggg	36
	<210> 28	
	<211> 37	
	<212> ADN	
45	<213> artificial	
	<220>	
	<223> sintético	
50	<400> 28	
	ctttgaccag gatgactggg cagcttggca gaagttc	37
	<210> 29	
	<211> 37	
55	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> sintético	
60	<400> 29	
	gaacttctgc caagctgccc agtcacctg gtcaaag	37

5	<210> 30 <211> 36 <212> ADN <213> artificial <220> <223> sintético <400> 30	
10	gactgggggag cttgggcgaa gttcacagcc agtgca	36
15	<210> 31 <211> 36 <212> ADN <213> artificial <220> <223> sintético <400> 31	
20	tgcactgggt gtgaacttcg cccaagctcc ccagtc	36
25	<210> 32 <211> 34 <212> ADN <213> artificial <220> <223> sintético <400> 32	
30	ggggagcttg gcaggcgttc acagccagtg cagg	34
35	<210> 33 <211> 34 <212> ADN <213> artificial <220> <223> sintético <400> 33	
40	cctgcactgg ctgtgaacgc ctgccaaagt cccc	34
45	<210> 34 <211> 36 <212> ADN <213> artificial <220> <223> sintético <400> 34	
50	ggcagaagtt cacaggcagt gcaggaatcc aggtag	36
55	<210> 35 <211> 36 <212> ADN <213> artificial <220> <223> sintético	
60		

	<400> 35 ctacctggat tcctgcactg cctgtgaact tctgcc	36
5	<210> 36 <211> 35 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> sintético	
	<400> 36 tcacagtgac caaccagcg aggatcgcca aggcc	35
15	<210> 37 <211> 35 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> sintético	
25	<400> 37 gccttggcga tcctcgctgg gttggtcact gtgag	35
30	<210> 38 <211> 37 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> sintético	
35	<400> 38 caacccaaag aggatcgccg cggccgtgaa cgagaag	37
40	<210> 39 <211> 37 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> sintético	
45	<400> 39 cttctcgttc acggccgctg cgatcctctt tgggttg	37
50	<210> 40 <211> 37 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> sintético	
55	<400> 40 gaggatcgcc aaggccgtgg ccgagaagtc ctgcaac	37
60	<210> 41 <211> 37 <212> ADN <213> artificial	
65	<220> <223> sintético	

	<400> 41 gttgaggac ttctcgcca cggccttggc gatactc	37
5	<210> 42 <211> 36 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> sintético	
	<400> 42 gatcgccaag gccgtgaacg cgaagtctg caactg	36
15	<210> 43 <211> 37 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> sintético	
25	<400> 43 gcagttgcag gacttcgcgt tcacggcctt ggcgatc	37
30	<210> 44 <211> 36 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> sintético	
35	<400> 44 gccaaggccg tgaacgaggc gtcctgcaac tgcctc	36
40	<210> 45 <211> 36 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> sintético	
45	<400> 45 gaggcagttg caggacgcct cgttcacggc cttggc	36
50	<210> 46 <211> 37 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> sintético	
55	<400> 46 caaggccgtg aacgcggcgt cctgcaactg cctcctg	37
60	<210> 47 <211> 37 <212> ADN <213> artificial	
65	<220> <223> sintético	

<400> 47
 caggaggcag ttgcaggacg ccgcgttcac ggccttg 37

5 <210> 48
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> sintético

<400> 48
 gcaaggggca ccagtcttga tctg 24

15 <210> 49
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 49
 Phe Asp Gln Asp Asp Trp Gly Ala Trp Gln Lys Phe Thr Ala Ser Ala
 1 5 10 15
 Gly Ile Gln Val Val Gly Asp Asp Leu Thr Val Thr Asn Pro Lys Arg
 20 25 30
 Ile Ala Lys Ala Val Asn Glu Lys Ser
 35 40

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une a ENO1, o un fragmento scFv o Fab del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende las secuencias de HCDR1: GYTFTS CVMN; (SEQ ID NO:3), HCDR2: YINPYNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO:4) y HCDR3: EGFYYGNFDN (SEQ ID NO: 5) y una cadena ligera que comprende las secuencias de LCDR1: RASENIYSYLT (SEQ ID NO:6), LCDR2: NAKTLPE (SEQ ID NO:7) y LCDR3: QHHYGTPYT (SEQ ID NO:8).
5
2. El anticuerpo que se une a ENO1, o los fragmentos scFv o Fab del mismo, según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO:1 y la cadena ligera comprende la secuencia de SEQ ID NO:2.
10
3. Un anticuerpo que se une a ENO1, o un fragmento scFv o Fab del mismo, en donde el anticuerpo, o los fragmentos scFv o Fab del mismo, se pueden unir específicamente a un epítipo localizado en la secuencia de FDQDDWGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAVNEKS (SEQ ID NO:49) de ENO1.
15
4. El anticuerpo que se une a ENO1, o los fragmentos scFv o Fab del mismo, de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el epítipo está ubicado en la secuencia de FDQDDWGAWQKFTA (SEC ID NO: 9) o KRIAKAVNEKS (SEQ ID NO:10) de ENO1.
- 20 5. El anticuerpo que se une a ENO1, o los fragmentos scFv o Fab del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
6. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer de pulmón, mama, páncreas, hígado, colorrectal o de próstata, que comprende el anticuerpo o los fragmentos scFv o Fab del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
25
7. Un método para el diagnóstico de cáncer, que comprende:
hacer reaccionar una muestra de un sujeto de prueba con el anticuerpo que se une a ENO1, o los fragmentos scFv o Fab del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para determinar un grado de unión; en
30 donde si la extensión de la unión es mayor que un valor de referencia indica un estado canceroso.
8. Una composición farmacéutica para su uso en la inhibición de la invasión del cáncer, que comprende:
el anticuerpo que se une a ENO1, o los fragmentos scFv o Fab del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las
35 reivindicaciones 1-5.

FIG. 1B

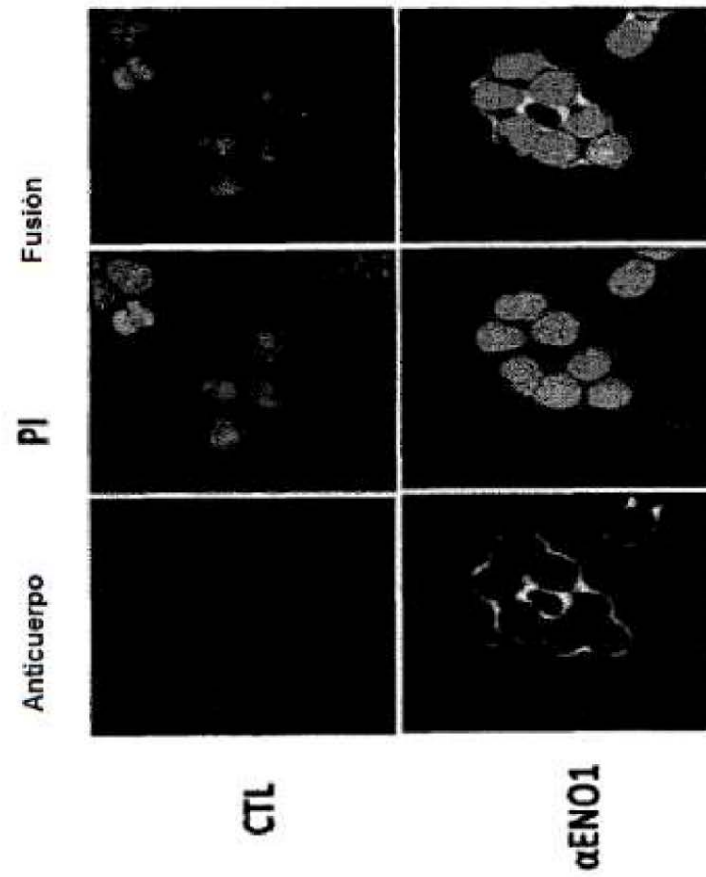


FIG. 1A

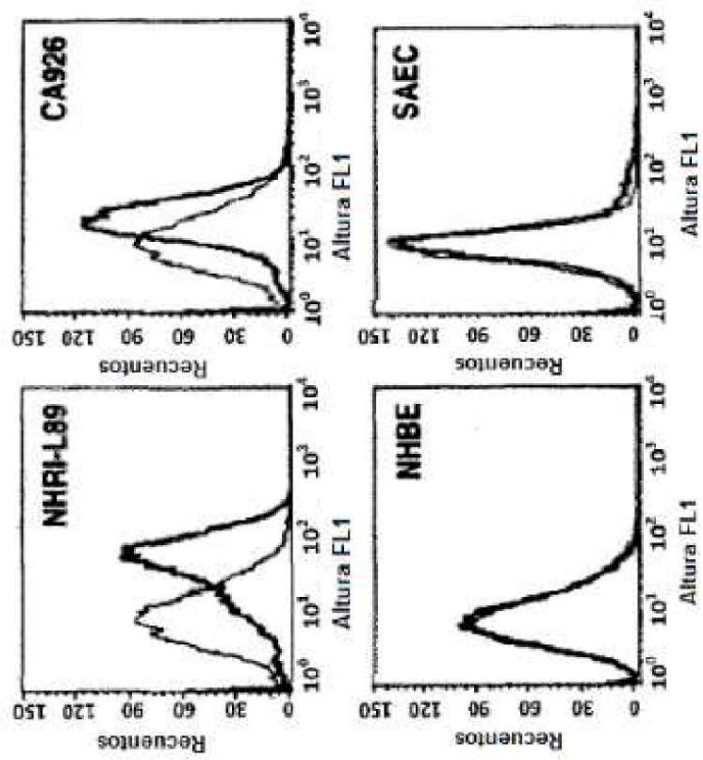
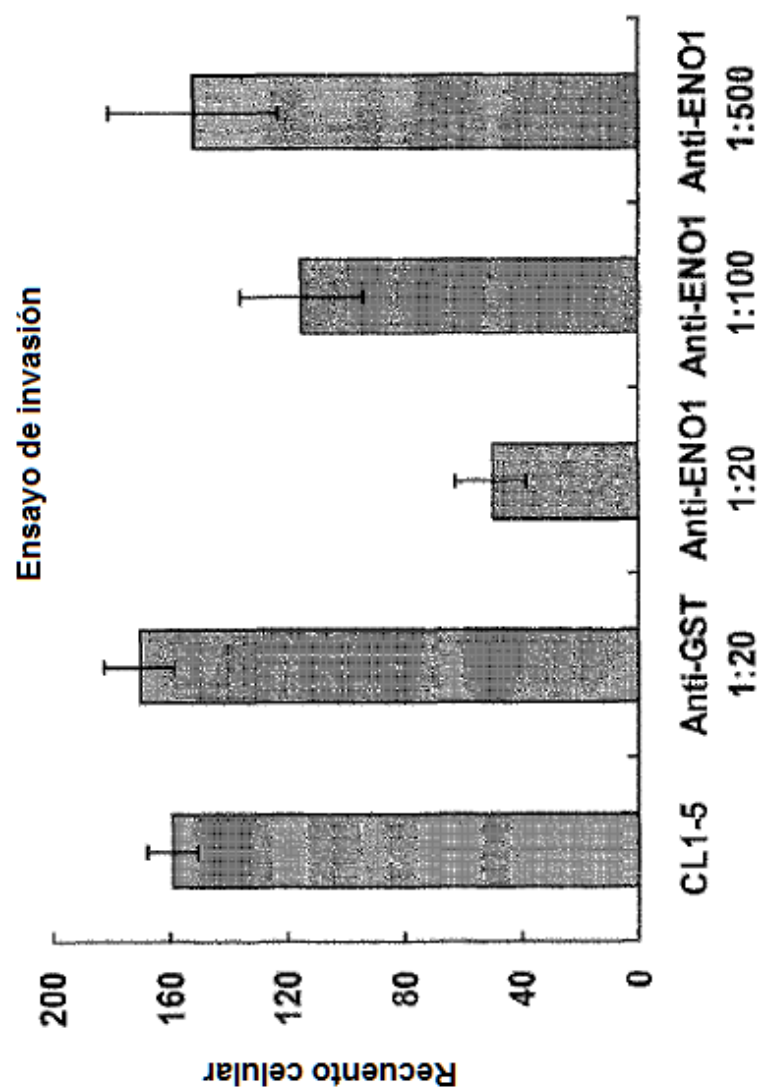
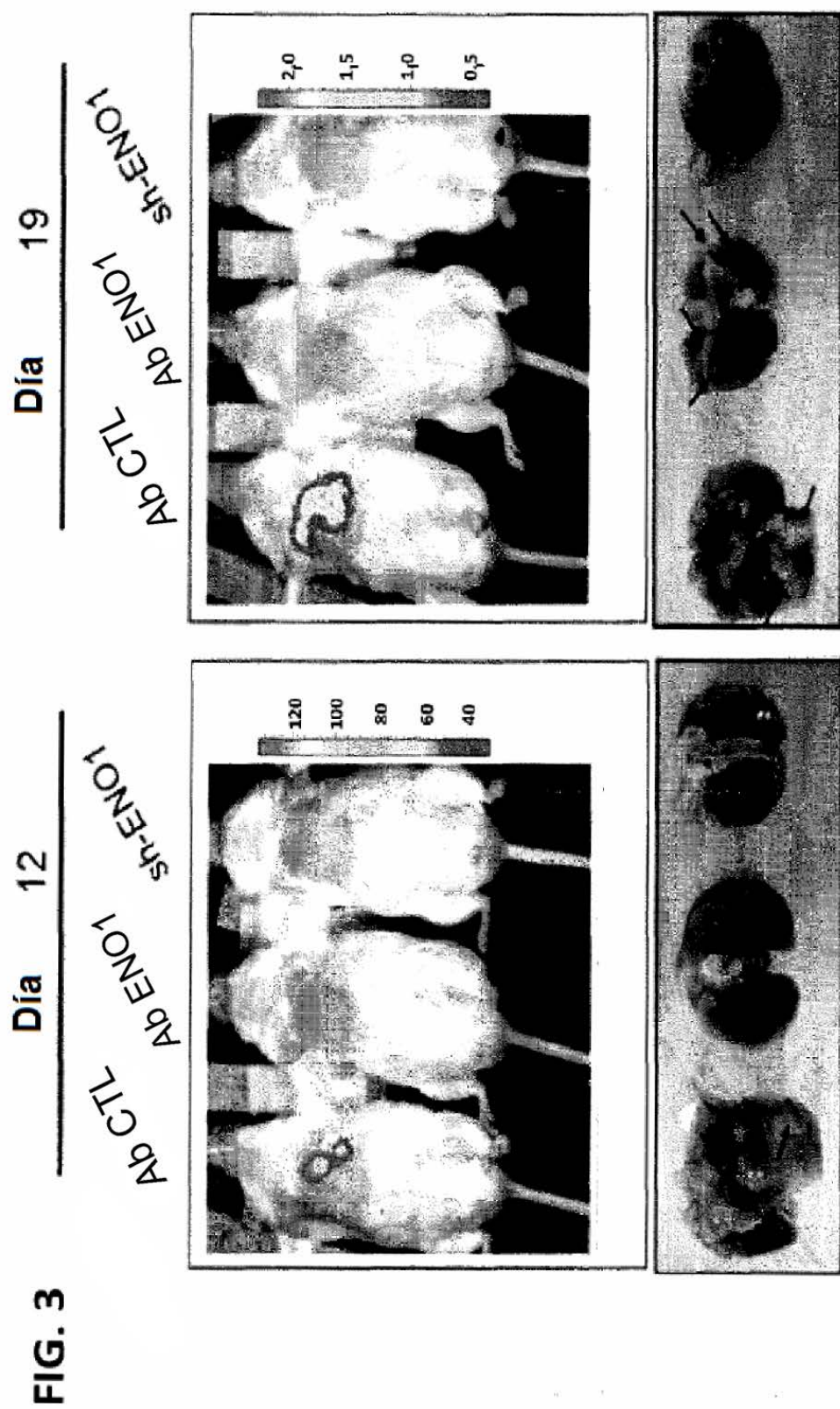


FIG. 2



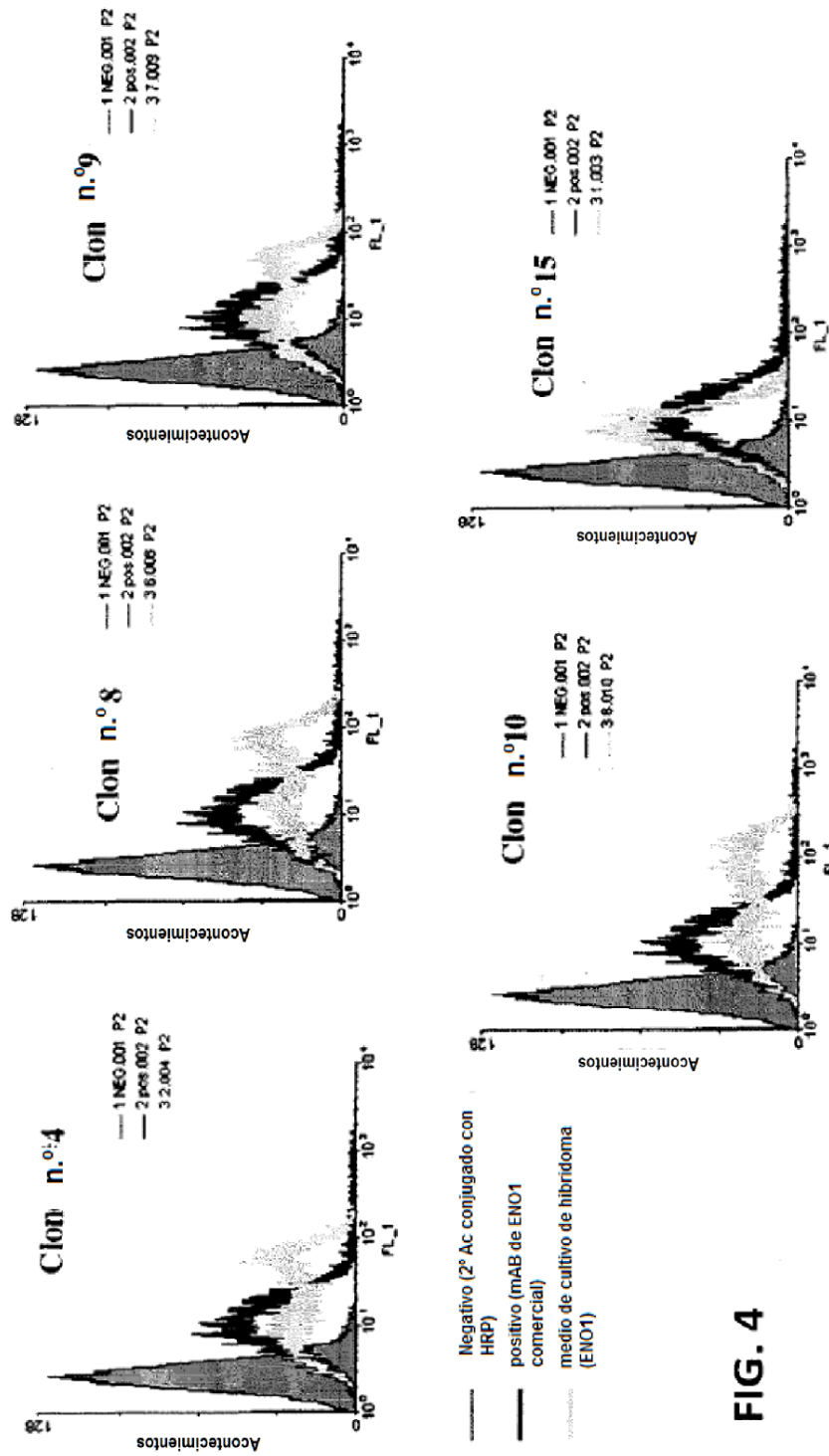
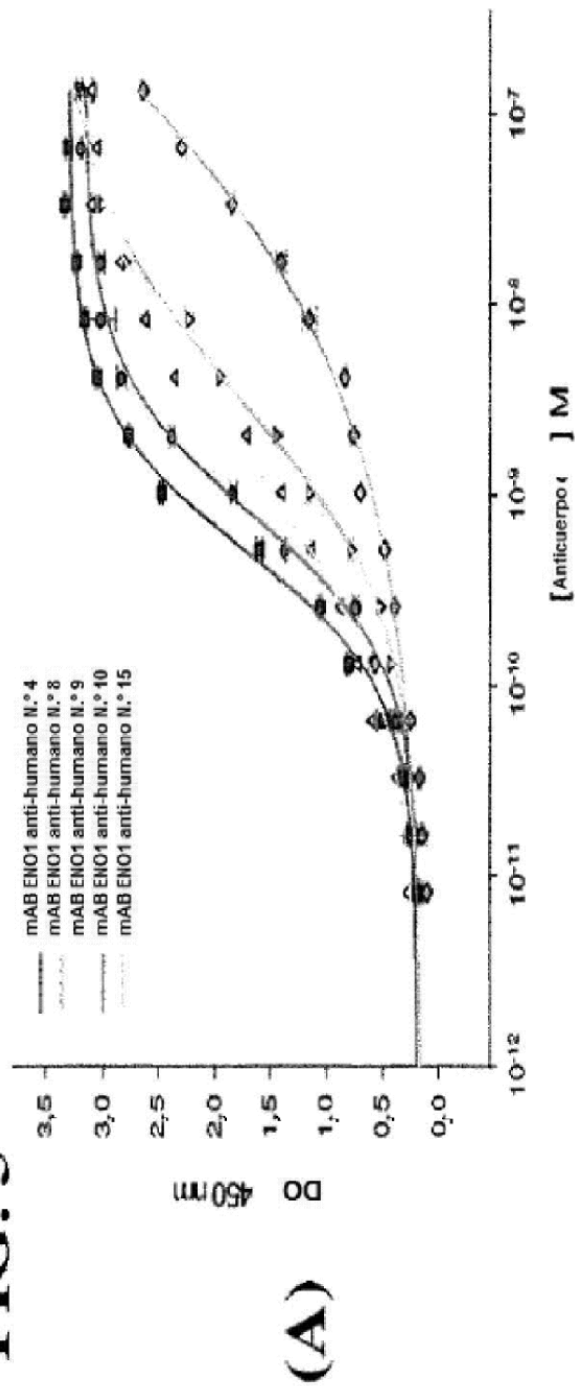


FIG. 4

FIG. 5



(B)

Clon	KD (M) (N=3)
N.º 4	$2,51 \pm 0,20 \times 10^{-10}$
N.º 8	$1,28 \pm 0,12 \times 10^{-9}$
N.º 9	$5,35 \pm 0,18 \times 10^{-10}$
N.º 10	$1,77 \pm 0,12 \times 10^{-10}$
N.º 15	$1,60 \pm 0,20 \times 10^{-5}$

FIG. 6

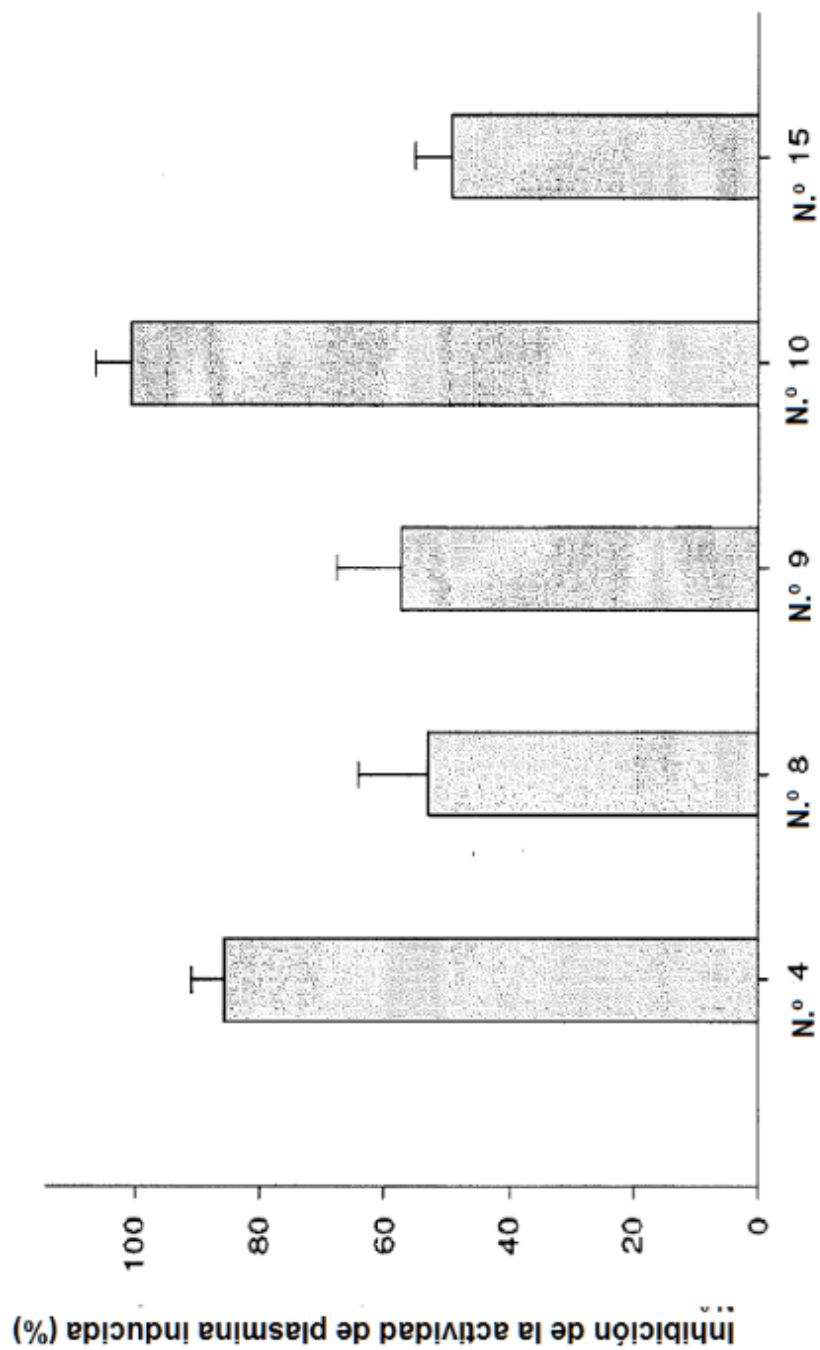


FIG. 7

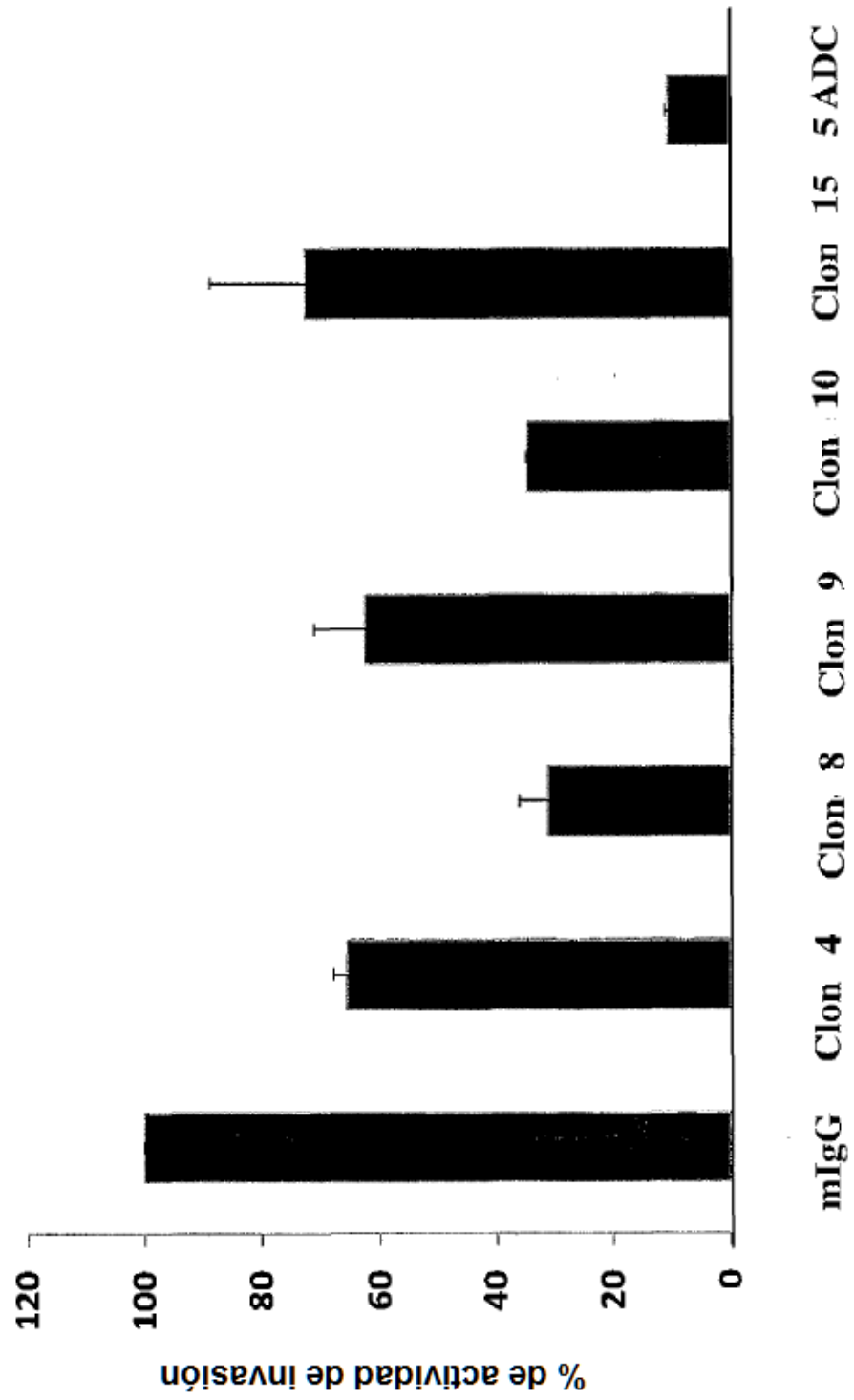


FIG. 8A

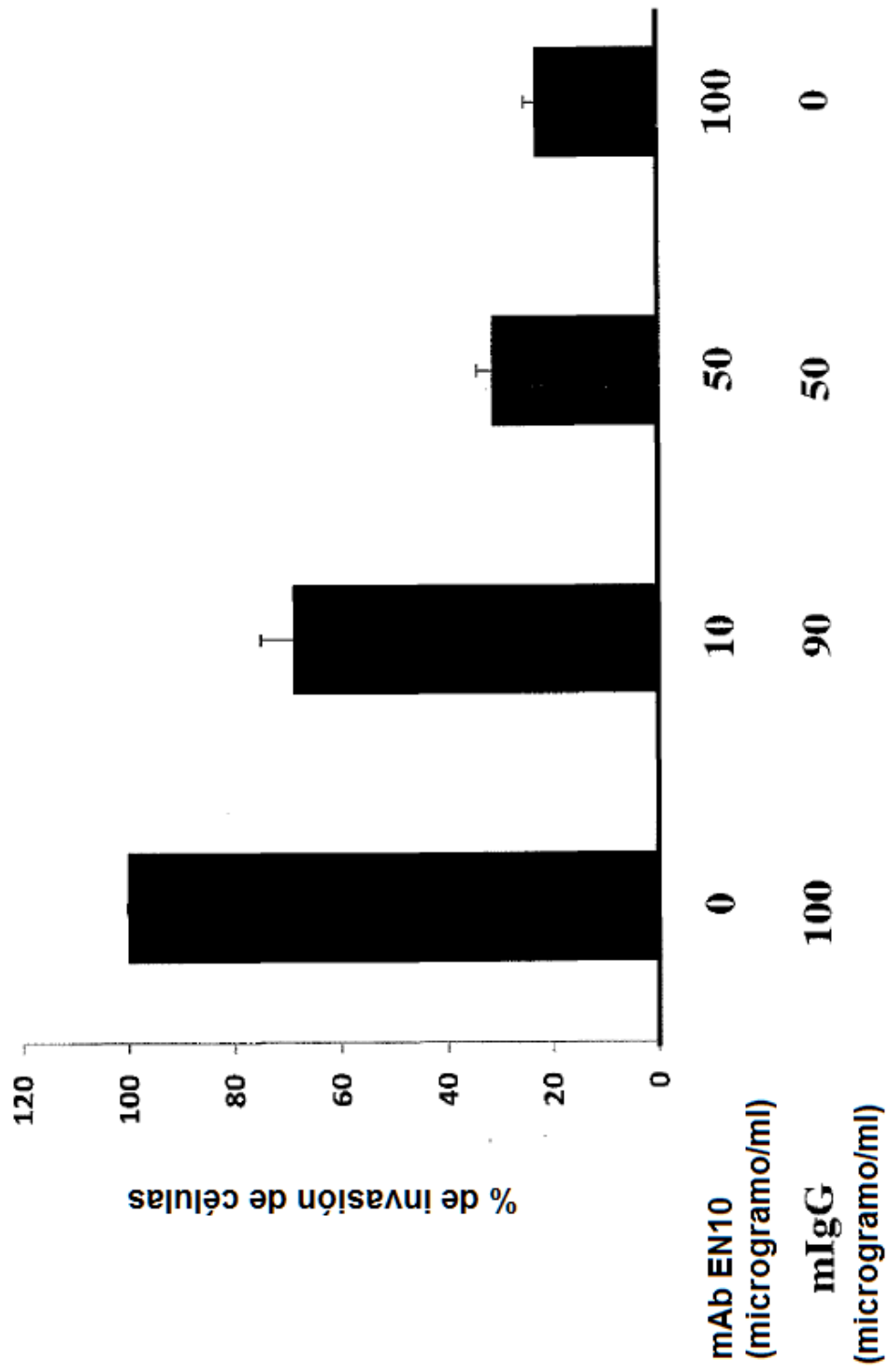


FIG. 8B

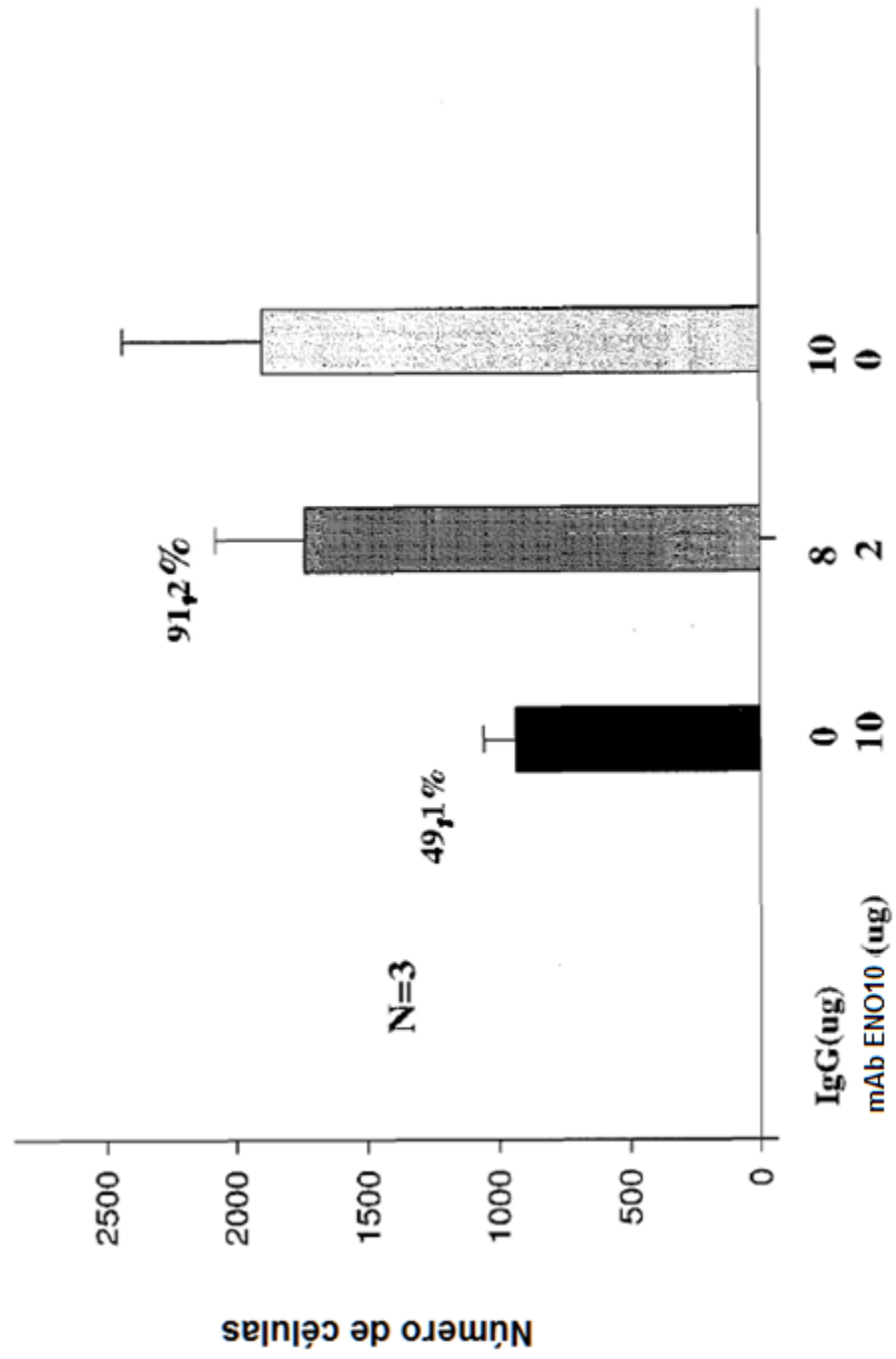


FIG. 9

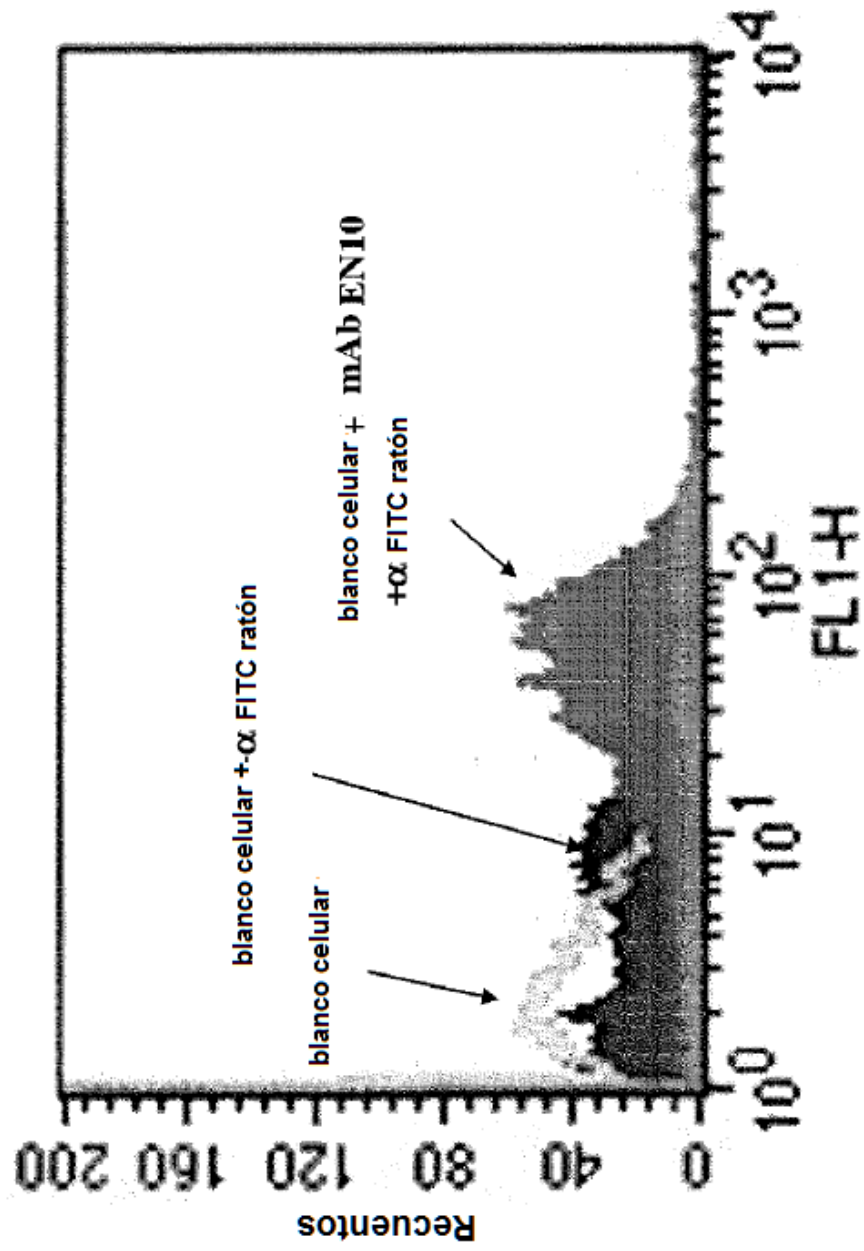


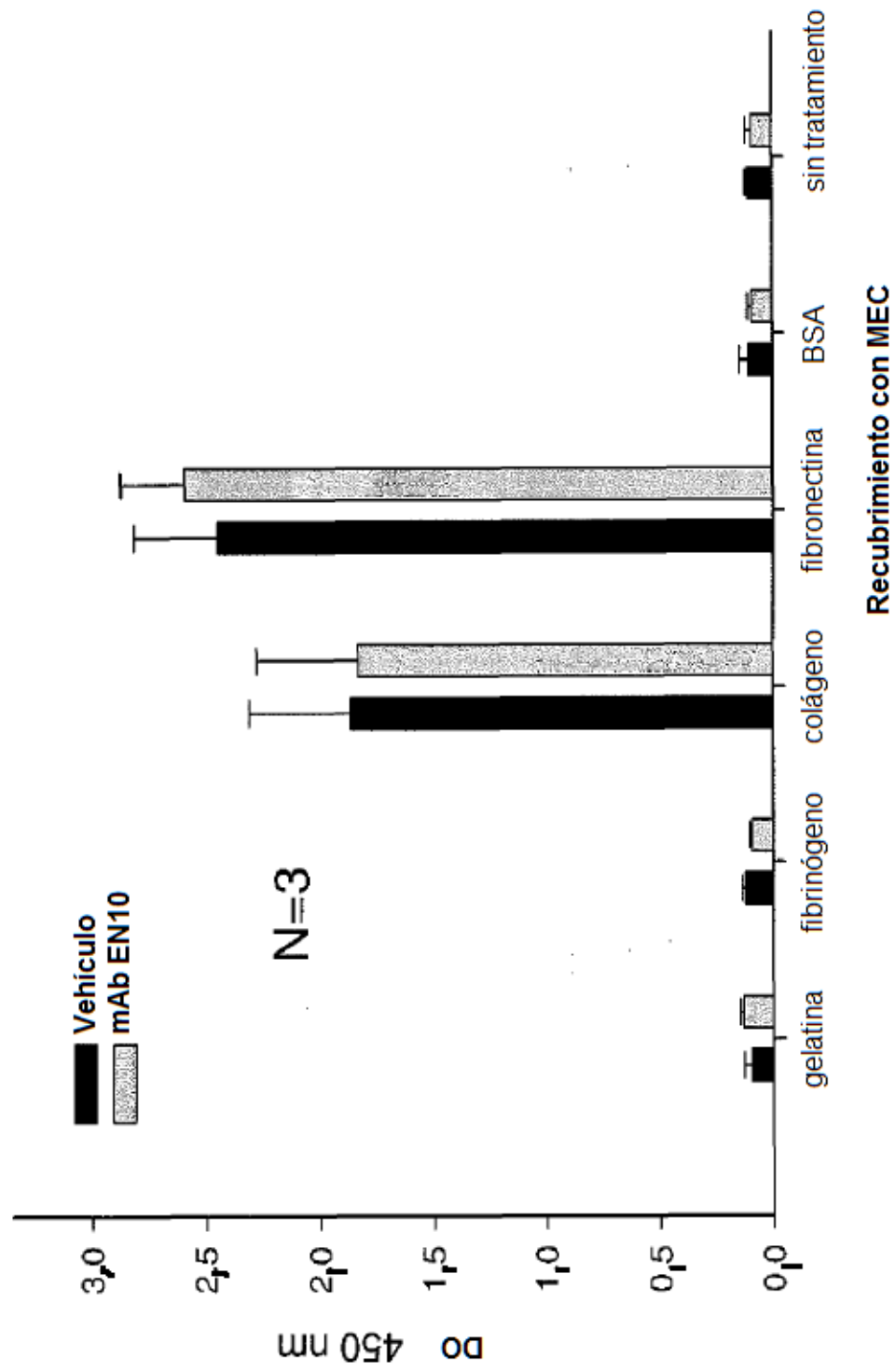
FIG. 10A

FIG. 10B

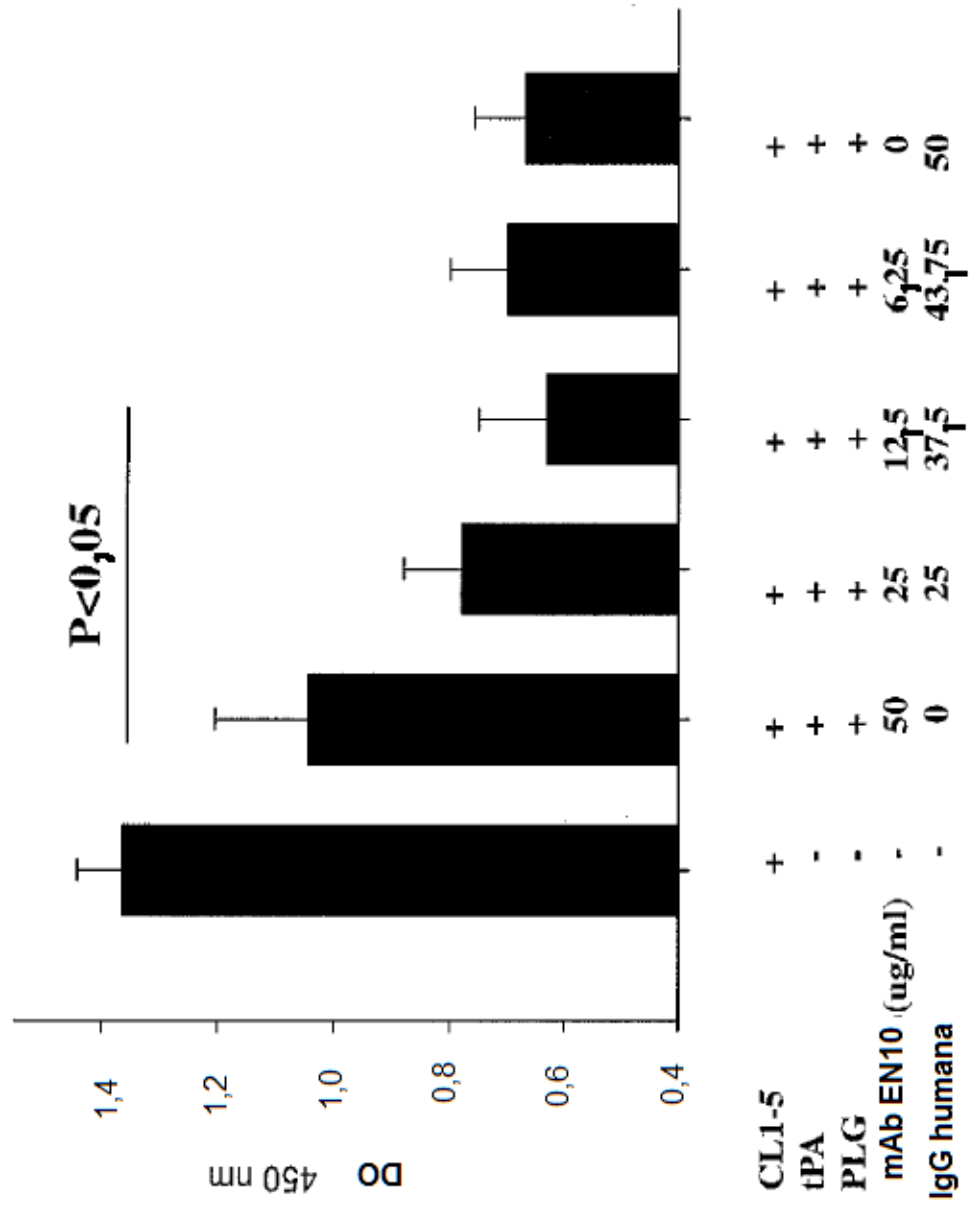


FIG. 10C

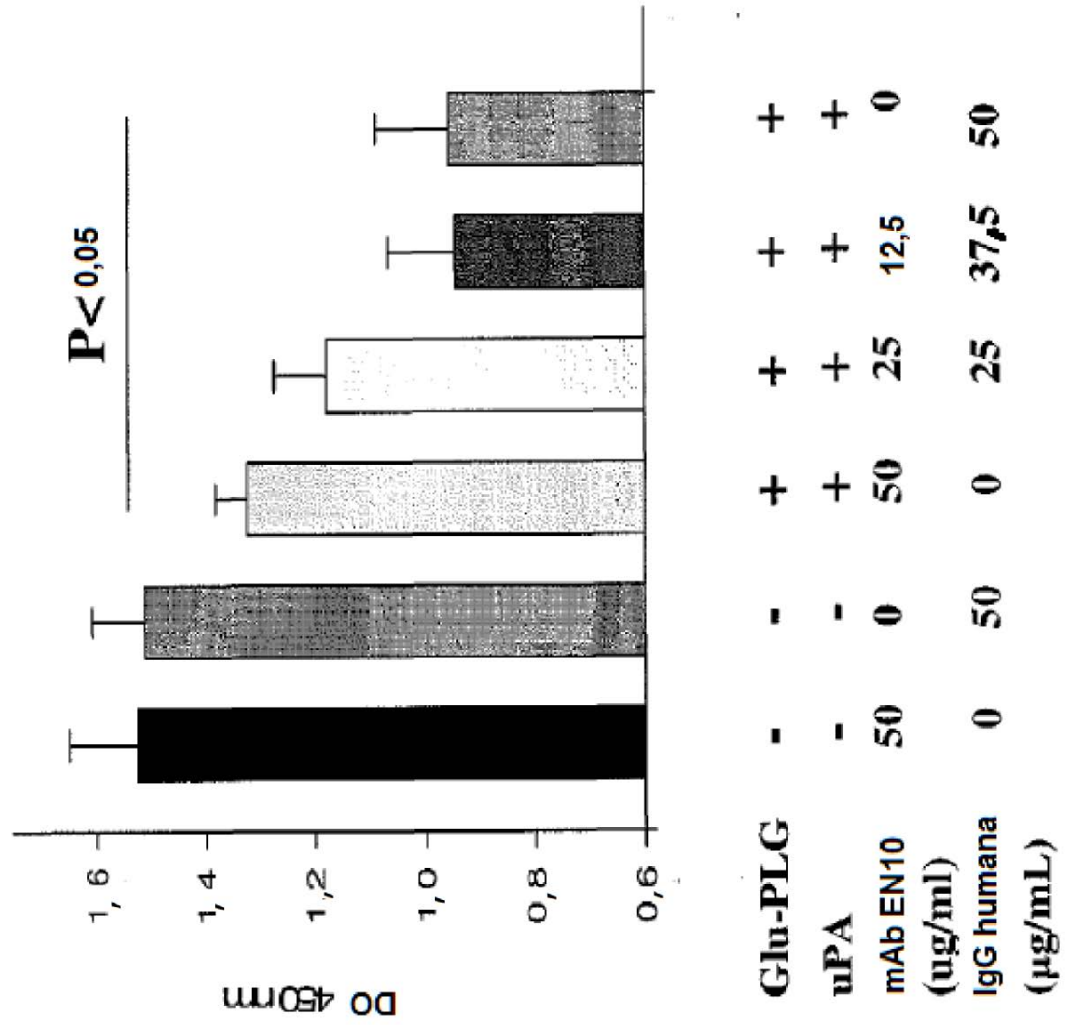


FIG. 11A

Kabat	1	5	10	15	20	25	36	40	
	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSCVMNWNWKQKPGQG SEQ ID NO:1								
							HCDR1	FR2	
							SEQ ID NO:3		
Kabat	45						66	70	75
	LEWIGYNPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTS SEQ ID:NO1								
									80 82ABC
							HCDR2		
									FR3
							SEQ ID NO:4		
Kabat	85	90	9394				105	110	
	EDSAVYVCAREGFYYGNFDN ^W GQGTTLTVSS SEQ ID:NO1								
							HCDR3	FR4	
							SEQ ID NO:5		

FIG. 11B

Kabat	1	5	10	15	20	35	40
	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRA <u>SENIYSYLT</u> WYQQKQGS SEQ ID NO:2						
	FR1			LCDR1		FR2	
	SEQ ID NO:6						
Kabat	45	60	65	70	75	80	85
	PQLLVYNAK <u>TLPEGVPSRFS</u> SGSGTQFSLKINSIQPEDFGSY SEQ ID NO:2						
	LCDR2			FR3			
	SEQ ID NO:7						
Kabat				100	104	SEQ ID: NO2	
	YCQH <u>HYGTPYT</u> FGGGTKLEIR						
	LCDR3			FR4			
	SEQ ID NO:8						

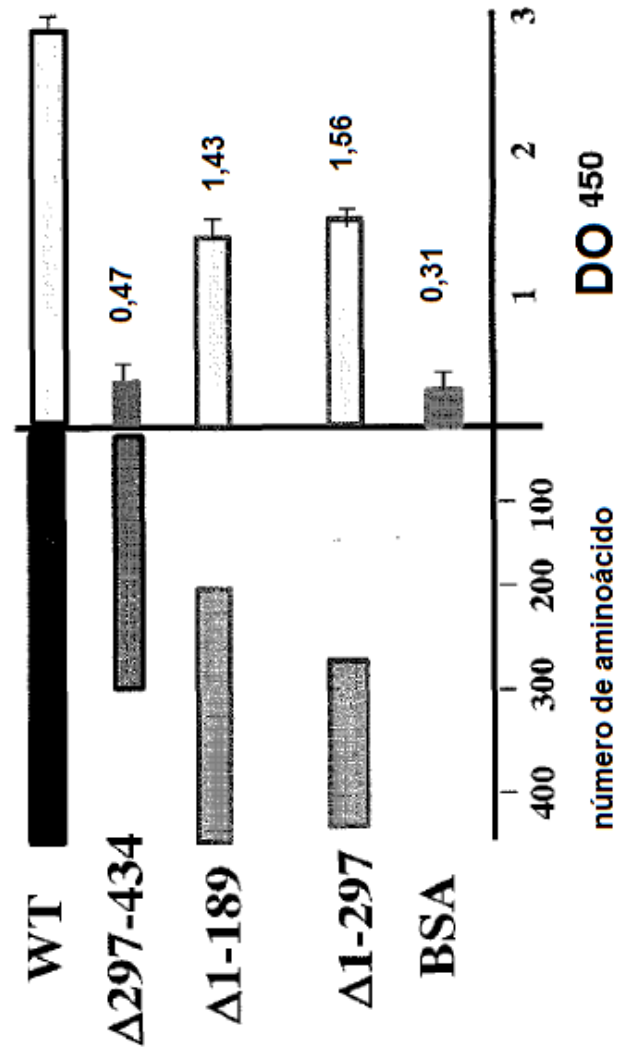
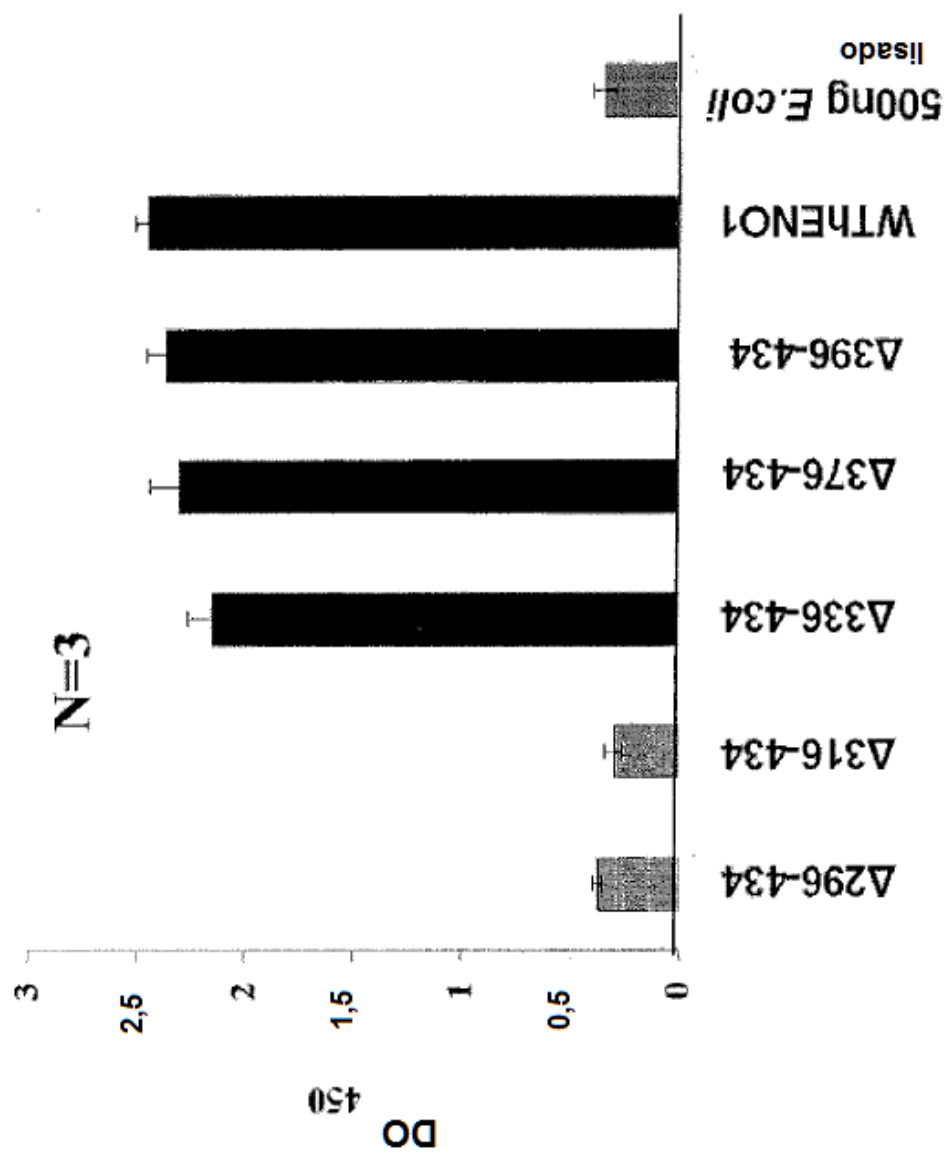
FIG. 12A

FIG. 12B



FIG. 12C



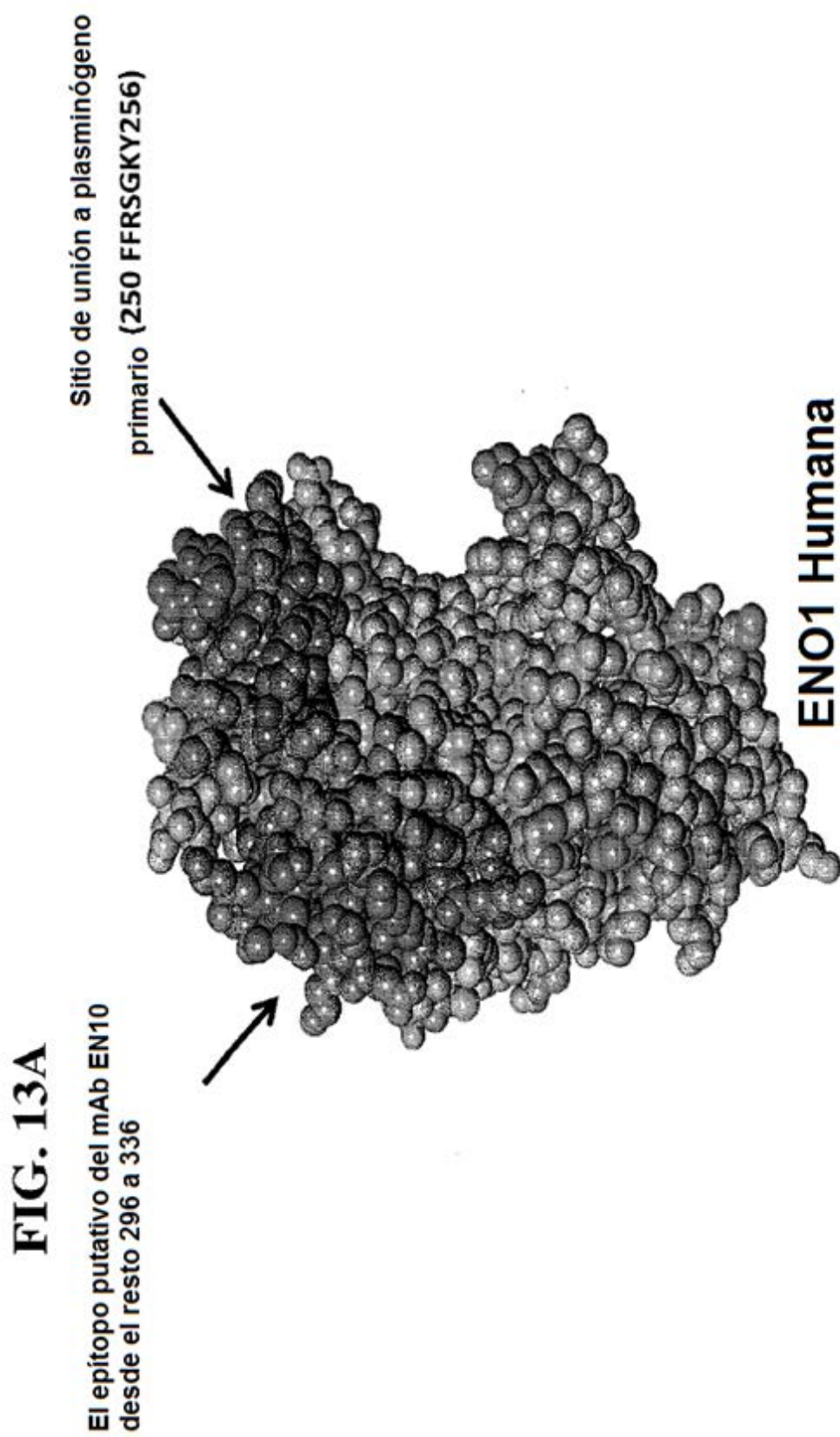


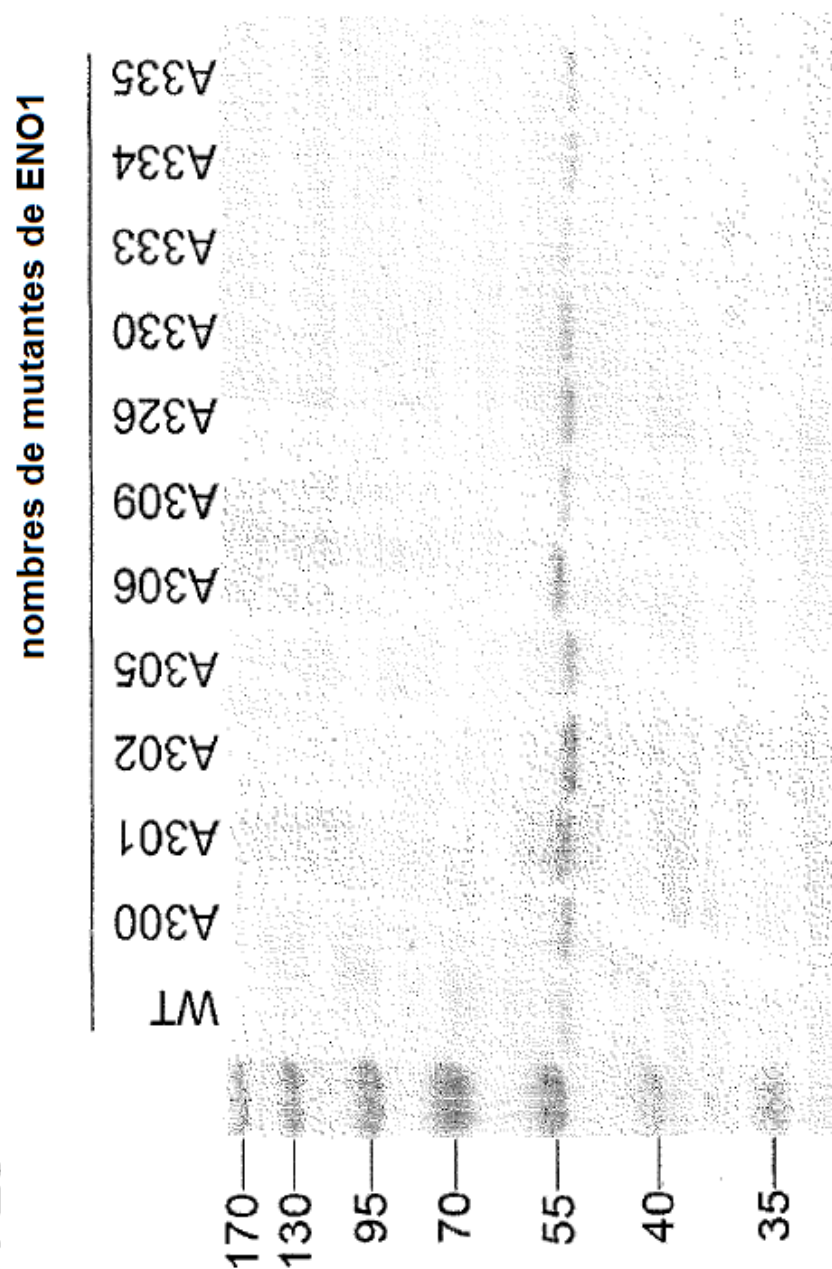
FIG. 13B

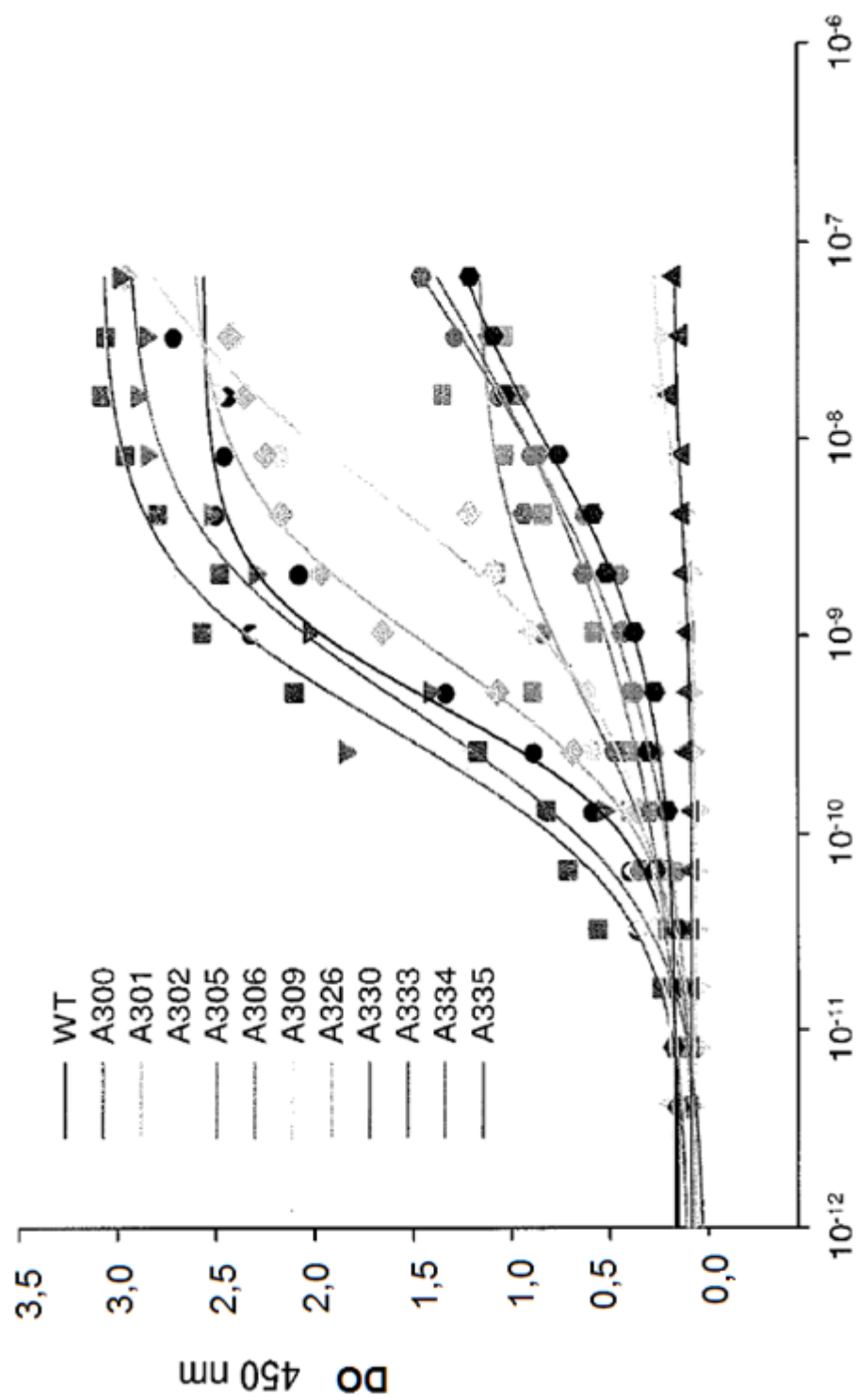
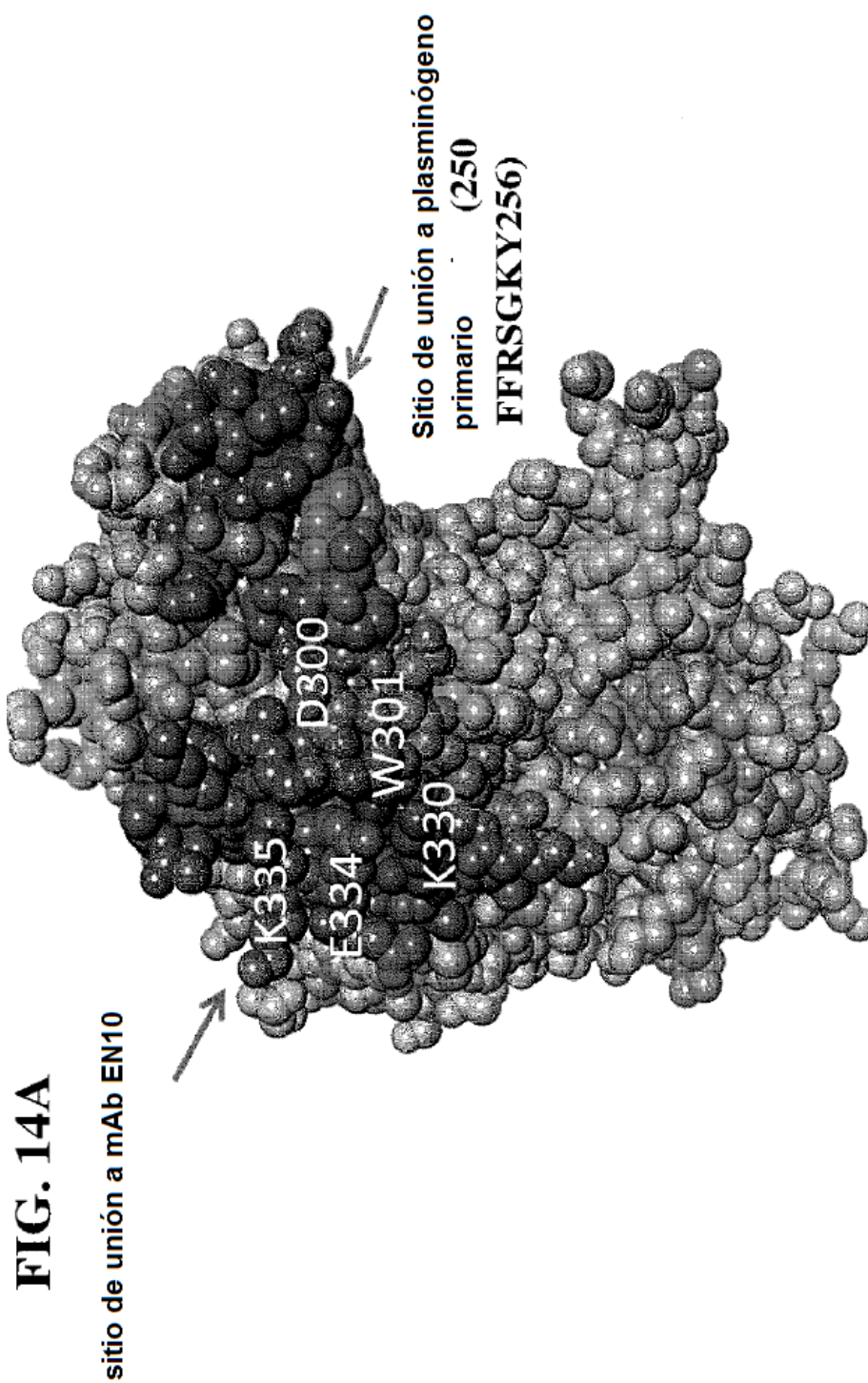
FIG. 13C

FIG. 13D

²⁹⁶FDQDDWGAWQKFTASAGIQVVGDDDLTVTNPKRIAKAVNEKS³³⁶ SEQ ID NO:49
SEQ ID: 9 SEQ ID: 10



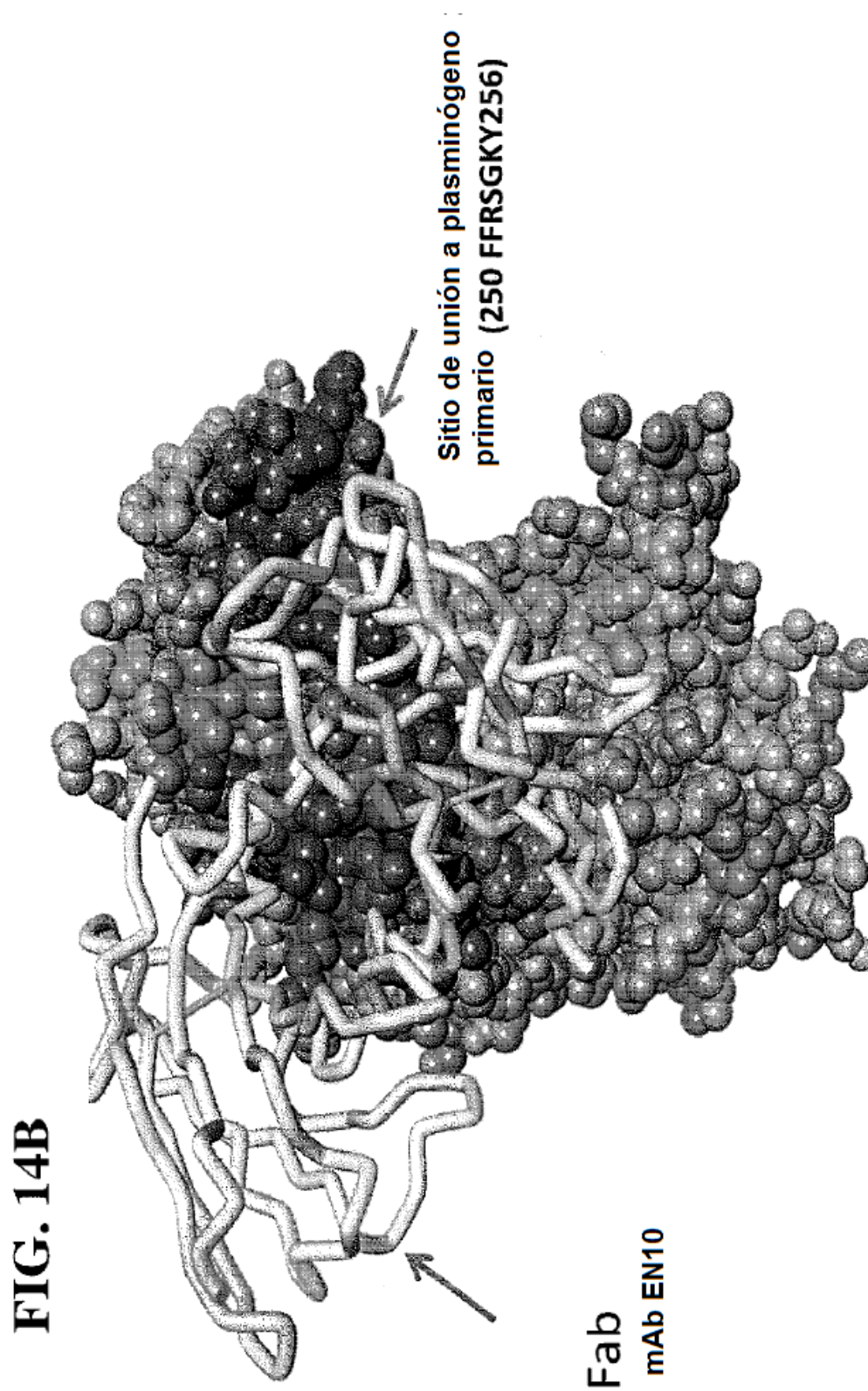


FIG. 15A

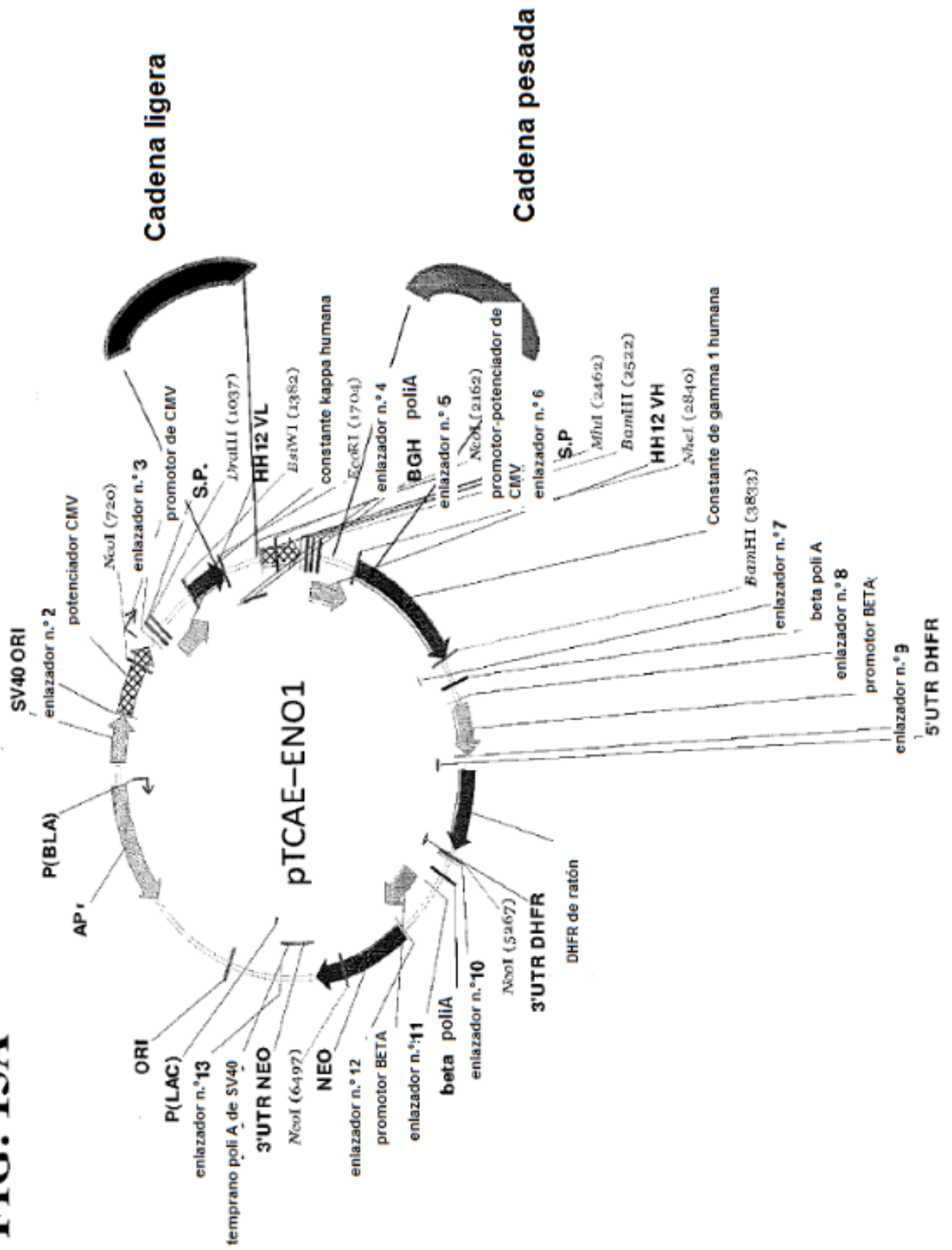


FIG. 15B

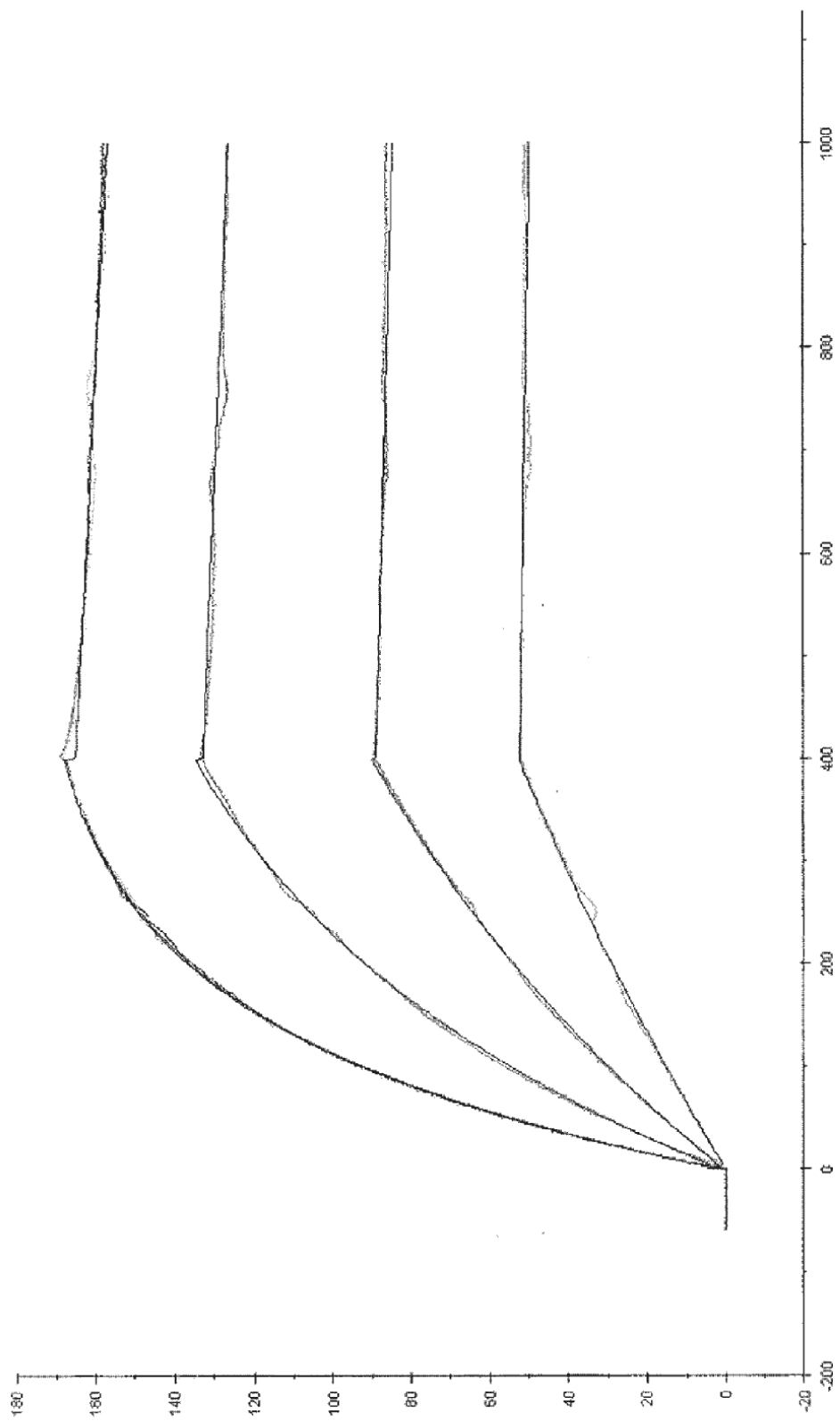


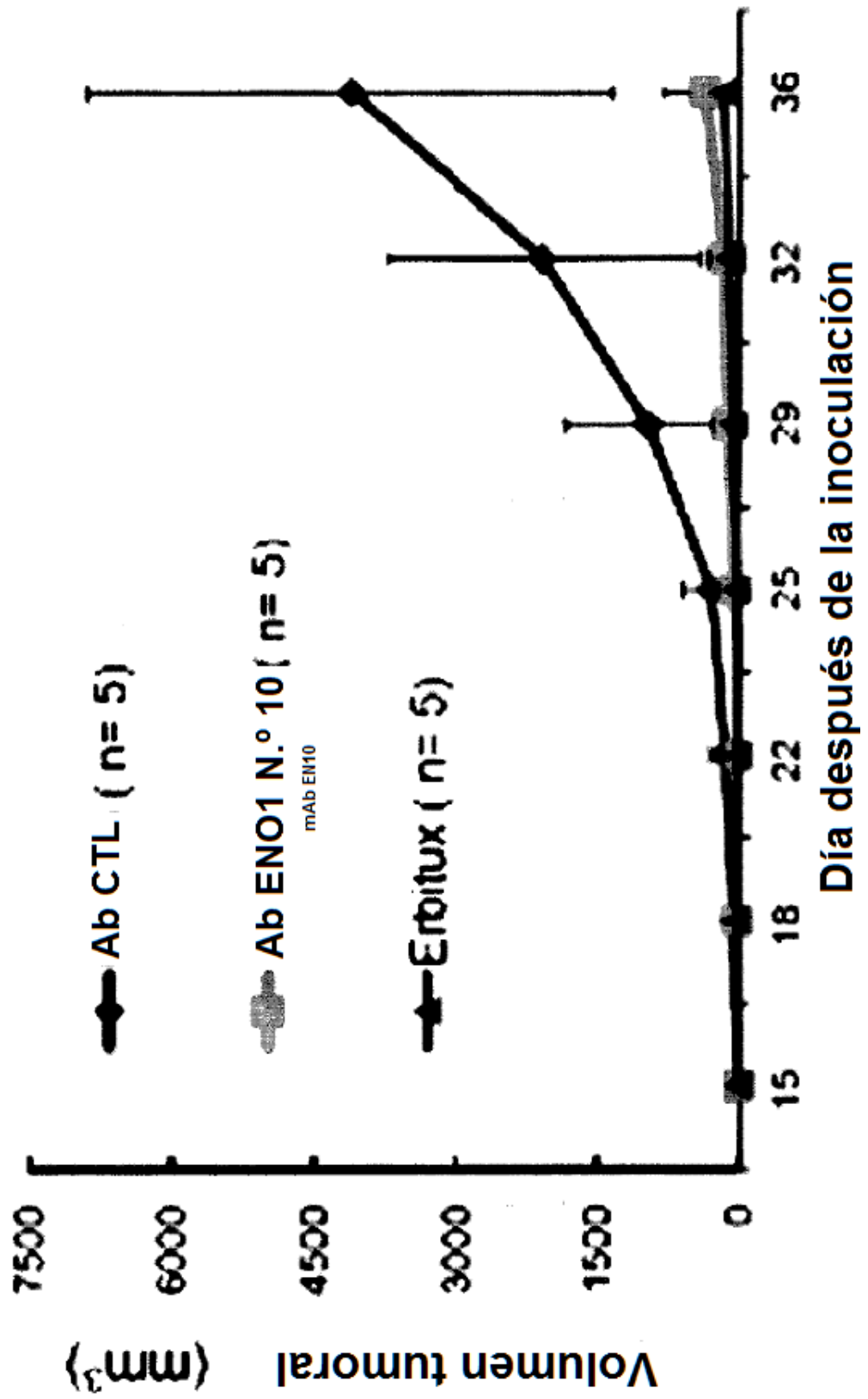
FIG. 16

FIG. 17A

Nódulos de tumor metastásico en hígado

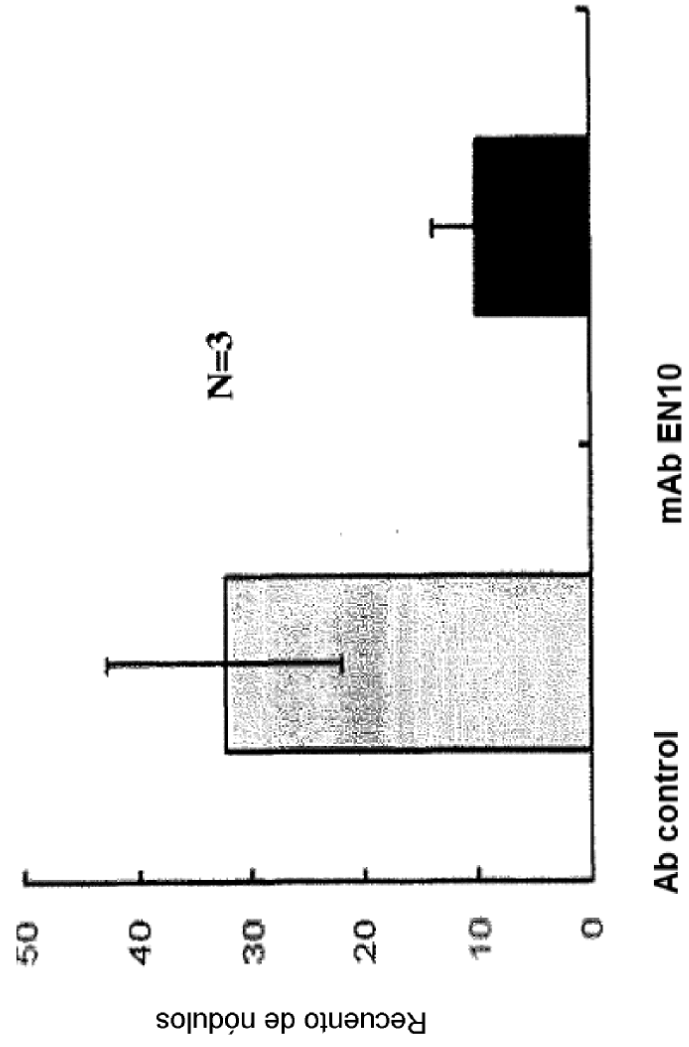


FIG. 17B

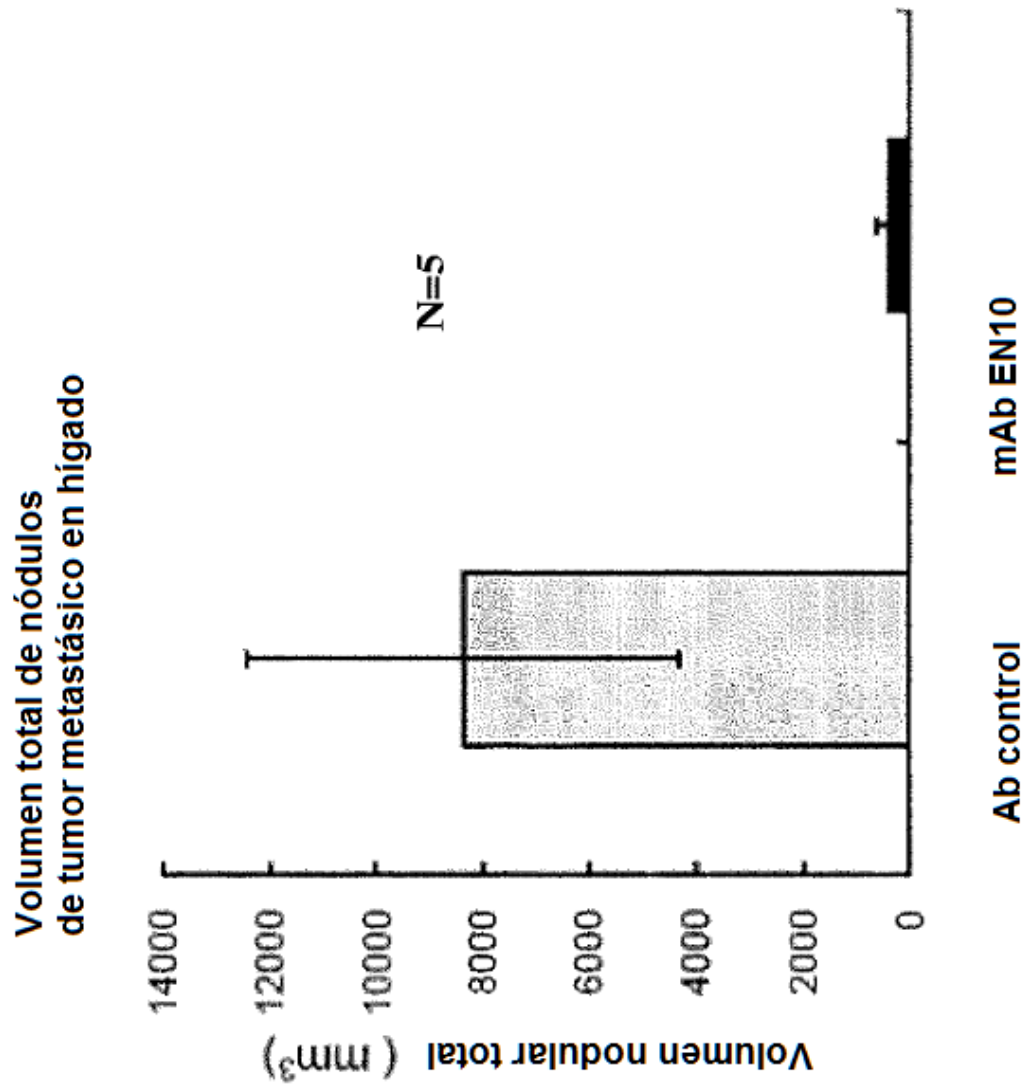


FIG. 17C

