

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.04.04	(73) Titular(es): MORPHOTEK, INC. 210 WELSH POOL ROAD EXTON, PA 19341 US
(30) Prioridade(s): 2007.04.05 US 910362 P 2007.10.15 US 980026 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.12.30	(72) Inventor(es): NICHOLAS C. NICOLAIDES US PHILIP M. SASS US YUHONG ZHOU US BRIAN E. TOMKOWICZ US LUIGI GRASSO US
(45) Data e BPI da concessão: 2014.03.05 056/2014	(74) Mandatário: FILIPTE TEIXEIRA BAPTISTA AV. ÁLVARES CABRAL 47, 1º 1250-215 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA INIBIR A LIGAÇÃO DA ENDOSIALINA A LIGANDOS**

(57) Resumo:

INVENÇÃO PROPORCIONA MÉTODOS PARA INIBIR A INTERACÇÃO DA ENDOSIALINA COM LIGANDOS DA ENDOSIALINA. A INIBIÇÃO É EFECTUADA BLOQUEANDO A INTERACÇÃO DA ENDOSIALINA EXPRESSA NA SUPERFÍCIE DE UMA CÉLULA COM OS LIGANDOS TAIS COMO FIBRONECTINA E COLAGÉNIO COM UM ANTICORPO ANTI- ENDOSIALINA.

DESCRIÇÃO

MÉTODOS PARA INIBIR A LIGAÇÃO DA ENDOSIALINA A LIGANDOS

ÂMBITO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se genericamente à área de imunoterapêuticos. Mais especificamente, a invenção refere-se a composições para a interrupção da interação da endosialina com os seus substratos para inibir as funções celulares, incluindo a angiogénese e a motilidade celular.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Várias publicações incluindo patentes, aplicações publicadas, artigos técnicos e artigos académicos são citados ao longo da especificação.

A angiogénese é um processo regulado que envolve a formação de novos vasos sanguíneos. Desempenha um papel fundamental no crescimento normal, desenvolvimento embrionário, na cicatrização de feridas e em outros processos fisiológicos (Yancopoulos *et al.* (2000) *Nature*, 407:242-8). No âmbito do desenvolvimento capilar as proteínas da matriz extracelular (ECM) servem como *suporte* estrutural para a proliferação de tecidos endoteliais e tumorais e providenciam suporte para o crescimento de células tumorais. *De novo* a angiogénese está envolvida em diversos estados de doença incluindo o cancro, onde a formação de novos vasos sanguíneos do tipo embrionário (referidos aqui como neovascularização) diferem da vasculatura

normal em relação a estrutura e função (Hanahan *et al.* (2000) *Cell*, 100:57-70). Um número de estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram diferenças biológicas entre vasculatura normal e vasculatura associada a doença usando vários sistemas modelo de angiogénese, aumentando assim a possibilidade de novos compostos antiangiogénicos que podem inibir selectivamente a formação de vasos do tipo embrionário, células endoteliais associadas a tumor para a terapia de doença neovascular. À luz destas oportunidades para a terapia uma intensa busca de potenciais alvos que possam inibir especificamente tumores e outras células endoteliais associadas a doença neovascular ou crescimento de células estromais (fibroblastos, pericitos, etc.) e da função em curso.

Numa tentativa de identificar tais alvos têm sido concebidas estratégias para identificar antigénios da superfície celular de estroma do tumor, assim como isolar proteínas específicas ou RNA que são expressos em células estromais de tumor (Rettig *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 89:10832-6; St. Croix *et al.* (2000) *Science*, 289:1197-1202). Estas estratégias identificaram uma proteína da superfície celular que parece ser expressa especificamente em células estromais de tumor referida como endosialina (ou marcador de endotélio tumoral 1 (TEM 1) ou CD248).

A examinação de padrões de expressão génica em tecido normal e neoplásico indica um aumento da expressão de *mRNA* de endosialina em neovasos tumorais. (St Croix *et al.* (2000) *Science*, 289:1197-1202). Níveis semelhantes de expressão de endosialina foram observados em cancro do colo-rectal humano (Rmali *et al.* (2005) *World J. Gastroenterol.*, 11:1283-1286), em tecidos de cancro da mama (Davies *et al.* (2004) *Clin. Exp.*

Metastasis, 21:31-37) e em histiocitomas (Dolznic et al. (2005) *Cancer Immun.*, 5: 10). A expressão de endosialina humana tem sido observada em glioblastomas altamente invasivos, astrocitoma anaplásico e carcinomas metastáticos, incluindo, melanomas (Brady et al. (2004) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 63:1274-1283; Huber et al. (2006) *J. Cutan. Pathol.*, 33:145-155).

A utilização de anticorpos em estudos de imuno-histoquímica demonstrou uma expressão robusta de endosialina em células endoteliais neovasculares, fibroblastos e/ou pericitos (Virgintino et al. (2007) *Angiogenesis*, 10:35-45) em tecidos malignos, enquanto a expressão em linhas de células derivadas de culturas endoteliais do tipo embrionário, tais como, mas não limitado, a HUVEC (células endoteliais da Veia umbilical Humana) ou HMVEC (células endoteliais de microvasculatura dermal neonatal) é limitada. Análise de anticorpos, polipéptidos ou ligandos não proteicos que se podem ligar à endosialina resultou na identificação de um subconjunto de tais moléculas que podem suprimir a capacidade da endosialina para se ligar ao seu substrato e/ou suprimir actividades intracelulares conduzindo à estagnação ou morte celular.

Rettig et al. descreveram anticorpos monoclonais que reconhecem antigénios em vasos relacionados com vários tipos de cancro (Rettig et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 89:10832-6). Um destes foi designado FB5 e foi gerado através de imunização de ratos com fibroblastos de embriões humanos. FB5 reconhece uma proteína de 100 kDa na superfície de uma linha de células de neuroblastoma, LA1-5s (Patente dos EUA Nr: 5,342,757). FB5 é um anticorpo de murina (IgG1) que se liga à endosialina e tem sido demonstrado que reconhece as células

endoteliais associadas a uma variedade de diferentes tipos de cancro. Avaliação estrutural classificou a endosialina como uma proteína integral da membrana do tipo C como a lectina, composta por cinco domínios extracelulares globulares (incluindo um domínio de lectina tipo C, um domínio com similaridade com o padrão Sushi/ccp/scr e três repetições EGF). A proteína também contém uma região de tipo mucina, um segmento transmembranar e uma curta cauda citoplasmática. A proteína parece ser uma glicoproteína. A análise de hidratos de carbono mostra que a proteína do núcleo da endosialina tem uma abundância de glicosilação de O-ligados (Christian *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:48588-48595). Trabalhos posteriores combinaram as regiões determinantes da complementaridade (CDRs) de FB5 de rato na estrutura molecular principal de IgG1 humano para criar um anticorpo humanizado que se liga aos vasos associados aos tecidos malignos, assim como um subconjunto de células em culturas HMVEC.

Ratos com TEM1 *knockout* desenvolvem-se normalmente e exibem cicatrização normal, sugerindo que a endosialina não é necessária para a neovascularização durante o desenvolvimento fetal ou para a reparação de feridas. (Nanda *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 103:3351-3356). Quando as células de cancro colo-rectal foram implantadas nos sítios abdominais de ratos com TEM1 *knockout*, contudo, a perda de expressão da endosialina correlaciona-se com uma diminuição no crescimento do tumor, invasão e metástases em comparação com os animais parentais. A ausência de expressão da endosialina tem mostrado reduzir o crescimento, invasão e metástases de transplantes de tumores humanos em ratos com endosialina *knockout* (Nanda *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 103:3351-3356). Adicionalmente, a falta de endosialina levou a um aumento de

pequenos vasos sanguíneos imaturos e diminuição do número de vasos tumorais médios e grandes.

A neovascularização está associada a um certo número de estados de doença. No cancro acredita-se que a neovascularização é importante no fornecimento de sangue aos tumores. No cancro não-oncológico ou doenças malignas, como retinopatia e degeneração macular, uma neovascularização descontrolada provoca perda de visão (Wilkinson-Berka (2004) *Curr. Pharm. Des.*, 10:3331-48; Das e McGuire (2003) *Prog. Retin. Eye Res.*, 22:721-48). Além disso, vários relatórios têm identificado um papel da neovascularização na doença inflamatória (Paleolog e Miotla (1998) *Angiogenesis*, 2(4):295-307). Métodos para compreender melhor as vias moleculares em células endoteliais do tipo embrionário e células precursoras, bem como, as células endoteliais associadas (pericitos, fibroblastos, etc.) a estes estados de doença vão conduzir ao desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento destas doenças. Por outro lado a neovascularização está associada com a cicatrização de feridas (Galiano et al. (2004) *Am. J. Pathol.*, 164:1935-47). Identificação das vias moleculares que promovem a vascularização para a cicatrização de feridas pode oferecer a capacidade de identificar fármacos e factores que podem promover estes processos para melhorar o tratamento de feridas associadas a traumas, queimaduras e infecções.

Um problema difícil em terapia anti-angiogénica e pró-angiogénica eficaz é a natureza indefinida de processos biológicos de moléculas e vias associadas que são importantes para a activação de processos celulares associados com a neovascularização (Bagley et al. (2003) *Cancer Res.*, 63:5866-73). A capacidade para identificar e elucidar as moléculas e a

sua função na regulação de uma determinada via pode conduzir ao isolamento de compostos eficazes que têm actividade estimulante ou inibitória em doenças associadas a neovasculares como, cancro, inflamação, doença ocular, doença cardiovascular e cicatrização de feridas. A capacidade de isolar e estudar estes compostos através de ensaios de base molecular proporcionaria maior utilidade para avaliar os seus efeitos para suprimir ou estimular especificamente a biologia normal das células envolvidas na neovascularização em contraste com as células endoteliais adultas associadas a vasos no tecido adulto normal (Asahara e Kawamoto (2004) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 287:C572-9).

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A invenção apresenta anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio que existem para inibir a interacção de uma célula que expressa endosialina com um ligando da endosialina.

Os ligandos da endosialina envolvidos na presente invenção são o colagénio ou a fibronectina. O ligando pode ser o colagénio I ou o colagénio IV. A célula pode ser uma célula de mamífero. A regulação da expressão de endosialina ao nível genético pode ser efectuada por quaisquer meios adequados na área, tais como moléculas de ácido nucleico antisense, RNA de cadeia dupla, ribozimas, ribozimas "cabeça de martelo", os oligonucleótidos decoy, e semelhantes. A regulação da expressão de endosialina também pode ser realizada inactivando o gene que codifica a endosialina. Noutro aspecto, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio podem obstruir fisicamente a endosialina expressa na superfície de uma célula que expressa endosialina, inibindo assim a interacção da célula com um ligando da

endosialina. Os ligandos da endosialina são o colagénio (e.g., colagénio I ou colagénio IV) ou fibronectina.

A obstrução da endosialina da superfície celular pode ser efectuada por quaisquer meios adequados na área, tal como anticorpos que se ligam especificamente à endosialina. Inibidores competitivos podem ser utilizados para inibir a interacção da endosialina ou de uma célula que expressa endosialina com um ligando da endosialina. Os inibidores competitivos podem ser ligandos da endosialina, fragmentos de ligação à endosialina de ligandos da endosialina, por exemplo, fragmentos de ligação à endosialina de colagénio ou fibronectina. Inibidores competitivos preferidos são fragmentos de ligação à endosialina de colagénio I, colagénio IV ou fibronectina. Os inibidores competitivos preferidos são o fragmento N-terminal de 70 kDa de fibronectina, o fragmento de 45 kDa de fibronectina de ligação à gelatina e o fragmento de 30 kDa de fibronectina de ligação à heparina.

Os anticorpos adequados podem ser anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos inteiramente humanos, fragmentos de ligação ao antigénio que se ligam especificamente ao antigénio, e semelhantes. Em algumas formas de realização a afinidade do anticorpo para o antigénio é, de preferência, menos do que cerca de 1×10^{-7} M, com maior preferência inferior a cerca de 1×10^{-8} M, ainda mais preferivelmente menos do que cerca de 1×10^{-9} M, e mais preferencialmente ainda menos do que cerca de 1×10^{-10} M. Em algumas formas de realização preferidas o anticorpo é um anticorpo anti-endosialina ou um fragmento de ligação ao antigénio que reconhece especificamente a endosialina. Em algumas formas de realização o anticorpo ou fragmento de

ligação ao antígeno compreende uma cadeia pesada, compreendendo CDR1, CDR2 e CDR3 de SEQ ID NO: 28 ,30 e 32, respectivamente, e uma cadeia leve compreendendo CDR1, CDR2 e CDR3 de SEQ ID NO: 13, 15 e 17, respectivamente. Em algumas formas de realização os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem compreender uma cadeia pesada que compreende um domínio variável de SEQ ID NO: 34 e uma cadeia leve que compreende um domínio variável de SEQ ID NO: 19. Em algumas formas de realização os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem compreender uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22 ou 26 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11. Anticorpos M4 e M4.1 são anticorpos humanizados para a endosialina humana. Enquanto os anticorpos M4 e M4.1 partilham uma sequência de cadeia leve por outro lado eles diferem na sua cadeia pesada por apenas uma sequência de aminoácidos mostrada, por exemplo, no resíduo 429 da SEQ ID NO: 20 em relação ao resíduo 429 da SEQ ID NO: 24. A alteração de aminoácido é o resultado de uma única alteração de nucleótido mostrada, por exemplo, no nucleótido 1286 da SEQ ID NO: 19 em relação ao nucleótido 1286 da SEQ ID NO: 23. Em algumas metodologias os anticorpos que podem ser utilizados de acordo com a invenção são produzidos por células que têm número de acesso ATCC: PTA-7554 ou número de acesso ATCC: PTA-9017.

A inibição da interacção da endosialina com ligandos para a endosialina pode afectar vias, cascatas e efeitos a jusante provocados pela interacção normal. Por exemplo, obstruir ou inibir a interacção de uma célula que expressa endosialina com um ligando da endosialina pode inibir a activação de integrinas, a activação de metaloproteases da matriz e/ou a expressão de metaloproteases da matriz. A motilidade celular

pode ser inibida. A angiogénese ou neovascularização é inibida.

Em algumas metodologias a inibição da interacção das células que expressam a endosialina com o seu ligando inibe a activação da integrina $\beta 1$, $\beta 2$ ou $\beta 3$. Em algumas metodologias a inibição da interacção das células que expressam a endosialina com o seu ligando inibe a migração celular. Em algumas metodologias a inibição da interacção das células que expressam a endosialina com o seu ligando inibe a activação ou a expressão de uma metaloprotease da matriz. Em metodologias preferidas a metaloprotease da matriz é MMP-9.

Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem estar envolvidos na inibição da angiogénese ou neovascularização *in vitro* e *in vivo*. Em alguns aspectos um anticorpo ou fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam especificamente à endosialina ou uma composição que obstrui a endosialina expressa na superfície de uma célula pode ser administrada numa composição tal que a interacção da célula com um ligando da endosialina é inibida. Esta inibição suprime a angiogénese e/ou neovascularização de um tecido, órgão ou neoplasias no sujeito ao qual a composição é administrada. Os ligandos da endosialina podem ser proteínas da matriz extracelular tais como o colagénio (por exemplo, colagénio I ou colagénio IV) ou fibronectina. A composição pode compreender qualquer molécula, tal como as descritas e exemplificadas aqui, que pode obstruir fisicamente a interacção da endosialina da superfície da célula com, pelo menos, um ligando da endosialina. Exemplos de tais moléculas incluem, sem limitação, inibidores de moléculas pequenas, inibidores de polipéptidos, anticorpos que se ligam

especificamente à endosialina, anticorpos que se ligam especificamente a um ligando da endosialina, fragmentos de ligação ao antigénio, e semelhantes. Os anticorpos adequados podem ser anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos inteiramente humanos, fragmentos de anticorpos, e semelhantes.

Agentes que melhoram ("agonistas") ou reduzem ("antagonistas") a interacção da endosialina com um ligando da endosialina podem ser identificados por vários métodos que possam compreender o contacto da endosialina com um "composto teste", formando assim um complexo endosialina-composto teste, contactando este complexo com um ligando para a endosialina. Podem ser efectuadas medidas quantificáveis da interacção da endosialina com o ligando na presença e na ausência do "composto teste", em que, uma diminuição no nível de interacção da endosialina com o ligando na presença do "composto teste" indica que o "composto teste" é um antagonista da interacção da endosialina com o ligando. Os métodos para identificar agonistas ou antagonistas da interacção da endosialina com um ligando para a endosialina compreende o contacto da endosialina com um ligando para a endosialina na presença e ausência de um "composto teste" e medir de forma quantificável a interacção da endosialina com o ligando onde um aumento ou uma diminuição do nível de interacção da endosialina com o ligando na presença do "composto teste" indica que o "composto teste" é um agonista ou antagonista, respectivamente, da interacção da endosialina com o ligando. A endosialina pode ligar-se a uma membrana celular, a um fragmento da membrana celular, a uma bicamada lipídica artificial, ou, a um suporte sólido. O ligando pode ligar-se a um suporte sólido. Os ligandos para a endosialina

podem ser proteínas da matriz extracelular, tais como, colagénio ou fibronectina.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As **figuras 1A e 1B** mostram a análise imuno-histoquímica de células positivas de endosialina de tecido maligno. Os tumores foram isolados de pacientes com cancro colo-rectal e congelados por congelamento *flash* em nitrogénio líquido. As amostras foram seccionadas em corte fino e coradas com anti-endosialina ou anticorpo de controlo isótipo. Como mostrado, os vasos do tumor (Figura 1A) coraram positivo para a endosialina, enquanto as secções de anticorpo de controlo isótipo coraram negativo (Figura 1B).

As **figuras 2A e 2B** mostram a análise imuno-histoquímica de células positivas de endosialina de tecido normal. Os tecidos normais foram isolados de pacientes por biopsia e congelados por congelamento *flash* em nitrogénio líquido. As amostras foram seccionadas em corte fino e coradas com anti-endosialina ou anticorpo de controlo isótipo. Como mostrado, o tecido normal continha EPCs (seta, Figura 2A), enquanto a secção de anticorpo de controlo isótipo foi negativo (Figura 2B). Muitos dos tecidos normais testados tinham EPCs como determinado por coloração *in situ* ou coloração de anticorpo.

A **figura 3** mostra o isolamento de células positivas de endosialina de culturas endoteliais primárias. Culturas HMVEC foram enriquecidas para EPCs por *panning*. Culturas *panned* de endosialina foram então comparadas com culturas parentais de HMVEC para a percentagem de células que expressam a endosialina. Como mostrado, a cultura *panned* tinha um número

muito mais elevado de células positivas de endosialina em comparação com a cultura parental não *panned*, tal como determinado por imunocoloração através de anticorpo anti-endosialina seguido de um anticorpo secundário conjugado fluorescente. O número de células de cada campo foi determinado por microscopia ótica.

A **figura 4** mostra que a endosialina recombinante (Fc-TEM1) liga-se às proteínas da matriz extracelular (EMPs). Placas de ELISA, previamente revestidas com EMP fibronectina (FN), colagénio (COL, incluindo colagénio tipo I (COL I) e colagénio tipo IV (COL IV)), vitronectina (VN), laminina (LN) ou gelatina (Gel), foram bloqueados com tampão de ensaio ELISA antes da adição da proteína purificada Fc-TEM1 em concentrações crescentes. Após uma incubação de duas horas as placas foram lavadas e analisadas quanto à ligação utilizando um mAb secundário HRP conjugado de cabra-anti-rato específico para a cauda Fc utilizando condições *standard* ELISA. As placas foram lavadas, desenvolvidas e, em seguida, analisadas utilizando um leitor de placas a OD 450 nm. Como mostra a figura 4A, Fc-TEM1 ligado robustamente a FN e COL enquanto fraca ligação foi observada com LM, VN ou Gel. Para a figura 4B, uma placa de ELISA foi pré-revestida durante a noite com os seguintes antigénios: *Staphylococcus* enterotoxina B (STEB), ovalbumina (OVA), globulina gama de bovino (BGG), antigénio de glicoproteína de 90-kDa associado a tumor expressado na maioria das células de melanoma (TA90), lisozima de ovo de galinha (HEL), toxóide do tétano (TT), 1% de BSA, mesotelina humana, GM-CSF humano, IgG de cabra e IgG de rato. Fc-TEM1 foi adicionado em quantidades crescentes (5, 10, 50 µg/mL) e deixou-se a aderir durante 2 horas. As placas foram então

lavadas e o anticorpo conjugado com HRP de cabra-anti-rato foi adicionado para detectar a ligação a Fc-TEM1.

A **figura 5** mostra o mapeamento de domínios de ligação da fibronectina (FN) à endosialina. Fragmentos proteolíticos e recombinantes derivados de fibronectina (FN) foram avaliados quanto à sua capacidade para suportar a ligação de TEM1. A avaliação de fragmentos FN inclui: o fragmento de 70 kDa N-terminal (Sigma Cat. Nr. F0287) (obtido por digestão da catepsina D de fibronectina); o fragmento de 30 kDa de ligação à heparina (Sigma Cat. Nr. F9911); o fragmento de 45 kDa de ligação à gelatina (Sigma Cat. Nr. F0162) (ambos obtidos a partir da digestão da tripsina do fragmento de 70 kDa); o fragmento de 120 kDa que contém o domínio de ligação de células ("o fragmento de 120 kDa"); e dois fragmentos recombinantes: FN2, que contém os primeiros 7 domínios do tipo FN III, e FN4, que contém o local de pontes dissulfeto intercadeias e o domínio de ligação de integrina $\alpha 4\beta 1$. O diagrama de estrutura de FN foi adaptado a partir de Wierzbicka-Patynowski *et al.* (2003) *J. Cell Sci.*, 116:3269-76.

A **figura 6** mostra a ligação de Fc-TEM1 recombinante a EMP e fibronectina na presença de inibidores. M4 é um anticorpo humanizado para a endosialina humana, enquanto rbtTEM1 é um anticorpo de coelho para a endosialina humana. O ensaio foi realizado como descrito na figura 4, excepto que foram adicionados anticorpos para medir a capacidade de perturbar ou bloquear a ligação de Fc-TEM1 a FN. Como mostrado nesta figura, M4 foi capaz de inibir Fc-TEM1 de se ligar a FN, enquanto um controlo não específico (HuIgG) não foi.

A **figura 7** mostra a ligação da endosialina a fragmentos de EMP e a sua inibição por compostos inibidores de endosialina-EMP. Os fragmentos de fibronectina estão ilustrados na figura 5. A figura 7A mostra a ligação a fragmentos proteicos derivados de FN nativa. A figura 7B mostra a ligação a fragmentos proteicos derivados de FN desnaturado. Para as figuras 7A e 7B, um fragmento de FN foi revestido sobre uma placa ELISA nas concentrações indicadas. Um anticorpo policlonal anti-FN seguido da adição de anticorpo secundário HRP conjugado de cabra-anti-coelho foi utilizado para detectar proteínas intactas ligadas. Fc-TEM1 (1,25 µg/mL) foi adicionado e deixou-se a ligar durante 2 horas. As placas foram então lavadas e o anticorpo HRP conjugado de cabra-anti-rato foi adicionado para detectar Fc-TEM1 ligado. A barra de (Fc-TEM1 nativa) na Figura 7B representa a ligação de Fc-TEM1 a FN não desnaturado. Como mostrado, a endosialina liga-se à região N-terminal de fibronectina, enquanto pouca ou nenhuma ligação foi detectada para a ligação a fragmentos FN2, FN4, ou 120 kDa. Os anticorpos policlonais para a fibronectina ligam-se a todos os fragmentos. As figuras 7C e 7D mostram a ligação de Fc-TEM1 ao fragmento de 70 kDa de FN e a inibição da interacção de compostos inibidores de endosialina-EMP. FN inteira e a proteína FN de 70 kDa foram revestidas sobre uma placa ELISA a uma concentração fixa de cerca de 15 nmol/poço para ambas as proteínas. Fc-TEM1 (1,25 µg/mL) foi pré-incubado a 4°C durante 1 hora com quantidades crescentes de anticorpo M4 anti-endosialina ou controlo isótipo IgG. Compostos Fc-TEM1/M4 (figura 7C) ou Fc-TEM1/IgG (figura 7D) foram adicionados a FN e 70 kDa poços revestidos e incubou-se durante 2 horas à temperatura ambiente. A proteína ligada a Fc-TEM1 foi detectada pela adição de anticorpo secundário HRP conjugado de cabra-anti-rato.

A **figura 8** ilustra uma alteração na morfologia celular numa mistura gelatinosa de proteínas vendida sob o nome comercial de Matrigel (*BD Biosciences*) após expressão da endosialina. Células de 8E4 de ambos CHO-K1 ou CHO-TEM1 foram colocadas numa placa de 96 poços revestida com Matrigel e incubou-se a 37°C. As células foram fotografadas durante a noite, após a incubação, para exame macroscópico de formação de túbulos.

A **figura 9** mostra a ligação celular mediada por endosialina ligada a fragmentos de EMP. As células CHO foram transfectadas com um vector que expressa endosialina ou *cDNA* simulado. As células confirmaram expressar endosialina da superfície celular (CHO-TEM1) enquanto aquelas transfectadas com o simulado (CHO-K1) não. Para a figura 9A as células de ovário de hamster chinês (CHO) foram adicionadas a uma placa de 96 poços pré-revestida contendo várias proteínas de ECM. As células foram deixadas a aderir durante 1 hora a 37°C e os poços foram lavados extensivamente para remover quaisquer células fracamente ligadas. O número de células ligadas foi determinado utilizando o ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo. Abreviações: Col - Colagénio; FN - Fibronectina; LN - Laminina; TN - Tenascina; VN - Vitronectina; Neg - Albumina de soro bovino. Para a figura 9B as células de ovário de hamster chinês (CHO) foram transfectadas com um vector que expressa endosialina ou *cDNA* simulado. As células confirmaram expressar, por análise FACS, endosialina da superfície celular (CHO-TEM1), enquanto aquelas transfectadas com o simulado (CHO-K1) não. As células foram então testadas quanto à capacidade de se ligarem a EMP fibronectina sozinha ou em combinação com anticorpos anti-endosialina M4 ou controlo IgG. A figura 9B mostra que o

anticorpo anti-endosialina M4 reduz a adesão celular mediada pela endosialina a FN. As células (1.5E5) foram pré-incubadas durante 1 hora a 4°C com anticorpo M4 (100 µg/mL) ou um anticorpo de controlo isótipo IgG (100 µg/mL). Para a figura 9C, as células foram testadas quanto à capacidade de se ligarem a FN inteira ou apenas a fragmentos. Como mostrado na figura 9A, o número de células aderentes de CHO-TEM1 foi 6 vezes superior ao número de células parentais de CHO-K1 em poços revestidos com FN. Não foram observadas diferenças significativas na aderência entre CHO-K1 e CHO-TEM1 em superfícies revestidas com laminina ou vitronectina, enquanto a adesão aos colagénios e tenascina foi demasiado fraca para serem susceptíveis de avaliação (figura 9A). O pré-tratamento das células CHO-TEM1 com o anticorpo M4 resultou na redução de 50% da adesão celular TEM1-FN dependente, ao passo que, o anticorpo de controlo IgG não teve nenhum efeito (figura 9B). Tratamento com o anticorpo M4 não afectou a adesão FN-dependente, endosialina-independente (adesão base) de células CHO-K1 parentais. As células CHO-TEM1 mostraram 3 a 5 vezes maior aderência a fragmentos de FN, 70 kDa e 30 kDa, em comparação com as células CHO-K1 parentais, enquanto nenhuma aderência significativa foi observada em fragmentos de 45 kDa ou fragmentos FN2. As células CHO-TEM1 ligaram-se a Matrigel 5 vezes melhor do que as células CHO-K1 (figura 9C).

A figura 10 mostra a identificação de compostos inibidores de colagénio EMP-endosialina. As células CHO foram transfectadas com um vector que expressa endosialina ou *cDNA* simulado. As células confirmaram expressar endosialina da superfície celular (CHO-TEM1) enquanto aquelas transfectadas com o simulado (CHO-K1) não. As células foram então testadas quanto à capacidade para se ligarem a EMP colagénio do tipo I (COL I)

sozinho ou em combinação com o anticorpo anti-endosialina M4 ou controlo IgG. Como mostrado, a sobre-expressão da endosialina resulta num aumento da ligação da célula a COL I, que pode ser bloqueada por inibidores da endosialina, tal como, M4 em contraste com a molécula de controlo (IgG). RbtTEM1 também suprimiu a ligação de Fc-TEM1 a COL I (dados não mostrados).

A figura 11 mostra a ligação celular mediada pela endosialina a EMP colagénio. As células CHO foram transfectadas com um vector que expressa endosialina ou *cDNA* simulado. As células confirmaram expressar a endosialina da superfície celular (CHO-TEM1), enquanto aquelas transfectadas com o simulado (CHO-K1) não. As células foram então testadas quanto à capacidade para se ligarem a EMP colagénio do tipo I. Como se mostra, a sobre-expressão da endosialina resulta num aumento da ligação da célula a COL I.

A figura 12 mostra a mediação por endosialina da migração celular e a sua inibição por anticorpos anti-endosialina M4. A capacidade de M4 para inibir a migração celular de CHO-TEM1 e CHO-K1 através de membranas revestidas com Matrigel (figura 12A) ou FN (figura 12B), foi determinada. As células foram adicionadas à câmara superior e deixadas a migrar durante 48 horas a 37°C. A membrana foi removida e o número de células que migraram foi determinado utilizando o ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo. Onde indicado, as células foram tratadas com M4 ou controlo isótipo IgG durante a experiência. Como mostrado na figura 12A, as células CHO-K1 exibiram migração celular modesta, ao passo que, as células CHO-TEM1 apresentaram uma migração 10 vezes superior. Tratamento com anticorpo M4, mas não com o controlo IgG,

aboluiu a migração das células CHO-TEM1. Resultados semelhantes foram observados em experimentos de migração que utilizem câmaras transpoço revestidas com FN (figura 12B).

A **figura 13** mostra uma melhoria das vias celulares da endosialina. As células CHO foram transfectadas com um vector que expressa endosialina ou *cDNA* simulado. As células confirmaram expressar a endosialina da superfície celular (CHO-TEM1), enquanto aquelas transfectadas com o simulado (CHO-K1) não. As células foram então testadas quanto à sua capacidade para regular positivamente as vias celulares. Um exemplo é a via MMP-9, que desempenha um papel na migração celular. Como mostrado, a sobre-expressão de endosialina resulta num aumento da actividade de MMP-9, em contraste com as células de controlo.

A **figura 14** mostra o efeito do bloqueio da endosialina na activação de β integrina. Células embrionárias de rim humano 293 (HEK293) foram transfectadas com um vector que expressa endosialina ou *cDNA* simulado. As células confirmaram expressar a endosialina da superfície celular (293TEM1), enquanto aquelas transfectadas com o simulado (293T) não. As células foram então testadas quanto à sua capacidade para regular positivamente as vias celulares. Um exemplo é a via de integrina que desempenha um papel na migração celular. Como mostrado, a sobre-expressão de endosialina resulta num aumento da actividade da integrina $\beta 1$ (figura 14B) em contraste com as células de controlo enquanto o efeito directo na superfície da célula, a expressão de $\beta 1$, não é alterada (figura 14A). O tratamento de células com o inibidor M4 de endosialina resultou na supressão da actividade de integrina enquanto nenhum efeito sobre os níveis da superfície celular foram

observados (figura 14B). Estes dados demonstram a capacidade para utilizar inibidores de endosialina para suprimir a função da integrina nas células que expressam endosialina.

A **figura 15** mostra que o anticorpo M4.1 reconhece TEM1 humano não reduzido em células CHO-TEM1 e pericitos primários humanos mas não reconhece TEM1 de murina em células de rato 2H11. Policlonal de coelho contra TEM1 humano (rabPAb TEM1) reconhece TEM1 humano em células CHO-TEM1 e pericitos humanos, mas também reconhece TEM1 de murina em células de rato 2H11. Nem M4.1 nem rabPAb TEM1 reagiram contra lisados de células CHO-K1 parentais ou células NS0 e MS1 de rato devido à falta expressão de TEM1 nestas células. Apenas rabPAb TEM1 reagiu com TEM1 humano reduzido ainda que numa menor extensão quando comparado com TEM1 não reduzido.

DESCRIÇÃO DETALHADADA DOS MODOS DE REALIZAÇÃO ILUSTRATIVOS DA INVENÇÃO

Vários termos relacionados com os métodos e outros aspectos da presente invenção são usados ao longo da especificação e reivindicações. Esses termos são para ser dados consoante o significado natural da arte a menos que indicado de forma contrária. Outros termos especificamente definidos são para ser interpretados de uma forma consistente com a definição aqui proporcionada.

É para ser entendido que esta invenção não é limitada a métodos particulares, reagentes, compostos, composições ou sistemas biológicos que podem, é claro, variar. É também para ser compreendido que a terminologia utilizada aqui é para o

propósito de descrever apenas metodologias particulares e não se destina a ser limitativa.

Tal como é usado nesta especificação e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem referentes plurais a não ser que o contexto indique claramente o contrário. Assim, por exemplo, a referência a "uma célula" inclui uma combinação de duas ou mais células, e assim por diante.

Cada série aqui citada inclui todas as combinações e sub-combinações de intervalos, bem como números específicos neles contidos.

O termo "cerca de", tal como aqui utilizado, quando se refere a um valor mensurável, tal como uma quantidade, uma duração temporal e semelhantes, destina-se a englobar as variações de $\pm 20\%$ ou $\pm 10\%$, preferencialmente $\pm 5\%$, ainda mais preferencialmente $\pm 1\%$, e ainda mais preferível $\pm 0,1\%$ do valor especificado, uma vez que tais variações são apropriadas para executar os métodos divulgados.

"Ensaio específico da endosialina" (ESA) refere-se a ensaios que podem ser utilizados para identificar compostos que podem, directa ou indirectamente, perturbar a expressão ou actividade biológica da endosialina que resulta na modificação directa ou indirecta da ligação de células que expressam a endosialina ou endosialina via EMPs ou mecanismos mediados pela endosialina, bem como modificar vias celulares endógenas, tais como mas não limitadas, metaloproteases de matriz (MMP) e/ou proliferação ou sobrevivência celular.

"Polinucleótido" refere-se a "ácido nucleico" refere-se a qualquer poli-ribonucleótido ou poli-desoxirribonucleótido que possa modificar, ou não, o RNA ou DNA. "Polinucleótidos" incluem, sem limitações, DNA de cadeia simples e dupla, RNA de cadeia simples e dupla, moléculas híbridas compreendendo DNA e RNA que podem ser de cadeia simples ou, mais tipicamente, de cadeia dupla ou uma mistura de regiões de cadeia simples ou dupla. Em adição, "polinucleótido" refere-se a regiões de cadeia tripla compreendendo RNA ou DNA ou ambos RNA e DNA. O termo polinucleótido também inclui RNA ou DNA que contem, uma ou mais, bases modificadas e DNA ou RNA com estruturas modificadas para a estabilidade ou para outras funções. Bases "modificadas" incluem, por exemplo, bases tritiladas e bases invulgares como a inosina. Uma variedade de modificações pode ser feita com o RNA e DNA. Assim, "polinucleótido" abrange formas de polinucleótidos modificadas química, enzimática ou metabolicamente como encontrados na natureza, bem como as formas químicas de RNA e DNA características de vírus e células. "Polinucleótido" também abrange cadeias de ácidos nucleicos relativamente curtos frequentemente referidos como oligonucleótidos.

Um "vector" é um replicação, tal como o plasmídeo, fago, cosmídeo ou vírus no qual outro segmento de ácido nucleico pode ser operacionalmente inserido para produzir a replicação ou expressão do segmento.

"Polipéptido", "péptido" e "proteína" são utilizados alternadamente aqui para referir um polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos aplicam-se a polímeros de aminoácidos onde um ou mais resíduos de aminoácidos são um mimético químico artificial de um aminoácido correspondente de

ocorrência natural bem como polímeros de aminoácidos de ocorrência natural e não natural. Os polipéptidos do invento incluem as variantes modificadas de forma conservadora. Um perito reconhece que substituições, deleções ou adições a um ácido nucleico, péptido, polipéptido ou sequência de proteínas que altera, adiciona ou elimina um único aminoácido ou uma pequena percentagem de aminoácidos na sequência codificada é uma "variante modificada de forma conservadora" em que a alteração resulta na substituição de um aminoácido por um aminoácido quimicamente semelhante. Tabelas de substituição conservativa que fornecem aminoácidos funcionalmente semelhantes são bem conhecidas na área. Tais variantes modificadas de forma conservadora são, em adição a, e, não excluem variantes polimórficas, homólogos entre espécies e alelos do invento.

O termo "expresso" ou "expressão" de um ácido nucleico refere-se à biossíntese de um produto genético. O termo engloba a transcrição de um gene em RNA. Por exemplo, mas não como limitação, um gene regulador, tal como um RNA antisense ou de RNAi ou *shRNA*. O termo também engloba a tradução de RNA em um ou mais polipéptidos e engloba todas as modificações pós-transcrição e pós-tradução que ocorrem naturalmente.

Uma célula foi "transformada" ou "transfectada" por ácidos nucleicos endógenos ou heterólogos, tal como o DNA, quando tal DNA foi introduzido dentro da célula. O DNA pode, ou não, ser integrado (ligado covalentemente) no genoma da célula. Em procariotas, leveduras e células de mamíferos, por exemplo, o DNA transformado pode ser mantido num elemento episomal, tal como o plasmídeo. No que diz respeito às células eucarióticas, uma célula transformada de forma estável, ou "células estável"

é aquela na qual o *DNA* transformante se tornou integrado num cromossoma de modo que seja herdado pelas células filhas contendo o *DNA* transformante. Um "clone" é uma população de células derivadas de uma única célula ou ancestral comum por mitose. Uma "linha de células" é um clone de uma célula primária que é capaz de ter crescimento estável *in vitro* durante muitas gerações.

Tal como aqui utilizado, "composto teste" refere-se a qualquer molécula purificada, substancialmente purificada, moléculas que são componentes de uma mistura de compostos, ou uma mistura de compostos com qualquer outra matéria que pode ser utilizado de acordo com o presente invento. Os "compostos teste" podem ser produtos químicos orgânicos ou inorgânicos, ou biomoléculas, e todos os fragmentos, análogos, homólogos, conjugados e os seus derivados. "Biomoléculas" incluem proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, lípidos, monossacarídeos, polissacarídeos, e todos os fragmentos, análogos, homólogos, conjugados e os seus derivados. Os compostos teste podem ser de origem natural ou sintética e podem ser isolados ou purificados a partir das suas fontes naturais, ou podem ser sintetizados *de novo*. Os compostos testes podem ser definidos em termos de estrutura ou composição, ou podem ser indefinidos. O composto pode ser um produto isolado de estrutura desconhecida, uma mistura de vários produtos conhecidos, ou uma composição indefinida incluindo um ou mais compostos. Exemplos de composições indefinidas incluem extractos de células e tecido, meio de crescimento em que as células procarióticas, eucarióticas e células de *arqueobactérias* foram cultivadas, caldos de fermentação, bibliotecas de expressão de proteínas, e assim por diante.

"*Knockdown*" refere-se a uma célula ou organismo com expressão reduzida de um ou mais genes. Como será apreciado pelos peritos da técnica, um *knockdown* exhibe pelo menos cerca de 50% de redução na expressão, de preferência, apresentam pelo menos cerca de uma redução de 67% na expressão, e mais preferencialmente apresentarão pelo menos cerca de 75% de redução na expressão, apesar de reduções mais elevadas serem possíveis, incluindo, pelo menos, cerca de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais redução na expressão.

"Inibir" ou "inibição" ou "interferir" significa reduzir, diminuir, bloquear, prevenir, retardar, suprimir, inactivar, parar, ou diminuir a actividade biológica ou a expressão de um gene, o produto do gene (e.g., polipéptido), ou via de interesse.

A inibição da expressão ou a actividade biológica de uma proteína ou via de interesse, por exemplo, via endossialina ou migração celular, refere-se a uma diminuição (inibição ou diminuição) maior do que cerca de 50% até cerca de 99%, mais especificamente, cerca 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83 %, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais. A inibição pode ser directa, i.e., operar na molécula ou via interesse, ou indirecta, isto é, operar numa molécula ou via que afecta a molécula ou via de interesse.

"Recombinante" quando utilizado com referência, e.g., a uma célula ou ácido nucleico, proteína ou vector, indica que a célula, ácido nucleico, proteína ou vector, foi modificado pela introdução de um ácido nucleico heterólogo ou proteína ou alteração de um ácido nucleico nativo ou proteína ou que a célula é derivada de uma célula assim modificada. Assim, por exemplo, células recombinantes expressam genes que não são encontrados na forma nativa (não recombinante) da célula ou expressam genes nativos que, pelo contrário, são anormalmente expressos, pouco expressos ou não expressos de todos.

Os termos "quantidade eficaz" e "quantidade terapêutica eficaz" são aqui usados de forma indiferente e referem-se a uma quantidade de um anticorpo, fragmento de ligação ao antigénio, ou composição conforme aqui descrito, eficaz para se conseguir um resultado biológico particular, tal como, mas não limitado, aos resultados biológicos divulgados, descritos, ou exemplificados aqui. Tais resultados podem incluir, mas não estão limitados, ao tratamento de doenças associadas com a angiogénese ou neovascularização, conforme determinado por qualquer meio apropriado na área.

Tal como aqui utilizado, "medida" ou "determinada" refere-se a quaisquer determinações qualitativas e quantitativas.

"Ligando da endosialina" refere-se a qualquer produto químico, biomolécula, complexo, derivado, análogo ou homólogo que pode ligar-se a, interagir com, estimular e/ou alterar a expressão de endosialina.

Salvo indicação contrária, os termos "sujeito" ou "paciente" são utilizados de forma intercambiável e referem-se a

mamíferos, tais como, pacientes humanos e primatas não humanos, assim como animais experimentais, como coelhos, cães, gatos, ratos e outros animais. Consequentemente, um "sujeito" ou "paciente" como aqui usado significa qualquer paciente mamífero ou objecto para o qual as composições da invenção podem ser administradas.

"Angiogénese" refere-se à formação de novos vasos sanguíneos.

"Neovascularização" refere-se a uma proliferação patológica de novos vasos sanguíneos em tecido(s) ou órgão(s) que normalmente não contém vasos sanguíneos, ou, a uma proliferação patológica dos vasos sanguíneos de um tipo diferente ou quantidade que o normal para um tecido ou órgão específico.

"Epitopo" refere-se a um determinante imunológico de um antigénio que serve como um local de ligação ao anticorpo. Tal como aqui utilizado, o termo "epitopo conformacional" refere-se a um epitopo descontínuo formado por uma relação espacial entre os aminoácidos de um antigénio que não sejam de uma série ininterrupta de aminoácidos.

"Isolado" significa alterado "pela mão do homem" do estado natural. Se uma molécula ou composição ocorre na natureza foi "isolada" se foi alterada ou removida do seu ambiente original, ou ambos. Por exemplo, um polinucleótido ou um polipéptido presente naturalmente numa planta viva ou animal não está "isolado" mas, o mesmo polinucleótido ou polipéptido separado dos materiais coexistentes do seu estado natural é "isolado", tal como o termo é aqui empregue.

"Substancialmente as mesmas" em relação às sequências de ácidos nucleicos ou de aminoácidos significa que pelo menos cerca de 65% de identidade entre duas ou mais sequências. De preferência, o termo refere-se a pelo menos cerca de 70% de identidade entre duas ou mais sequências, mais preferivelmente pelo menos cerca de 75% de identidade, mais preferivelmente ainda pelo menos cerca de 80% de identidade, mais preferivelmente pelo menos cerca de 85% de identidade, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% de identidade, mais preferivelmente pelo menos cerca de 91% de identidade, mais preferivelmente pelo menos cerca de 92% de identidade, mais preferivelmente pelo menos cerca de 93% de identidade, mais preferivelmente pelo menos cerca de 94% de identidade, mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% de identidade, mais de preferência pelo menos cerca de 96% de identidade, mais preferivelmente pelo menos cerca de 97% de identidade, mais preferivelmente pelo menos cerca de 98% de identidade e mais preferencialmente pelo menos cerca de 99% de identidade ou maior identidade.

Foi descoberto de acordo com a presente invenção que a endosialina interage especificamente com proteínas da matriz extracelular, a fibronectina ou o colagénio. Também foi descoberto que esta interacção promove a migração de células e ainda promove e facilita a angiogénese. Para além destas observações foi descoberto que a ruptura da interacção entre a endosialina e proteínas da matriz extracelular pode suprimir a migração de células e pode suprimir a angiogénese. Por conseguinte, o invento apresenta anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio dos mesmos para inibir a interacção de endosialina com ligandos da endosialina.

Num aspecto, a invenção caracteriza anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio dos mesmos para inibir a interacção de endosialina expressa por uma célula que expressa endosialina com um ligando da endosialina.

A expressão da endosialina pela célula pode também ser inibida. A inibição da expressão de endosialina pode ocorrer ao nível do gene ou ao nível da proteína. Por exemplo, a inibição da expressão de endosialina pode compreender como alvo o *DNA* que codifica a endosialina, ou, visando o *mRNA* transcrito do gene da endosialina.

Os métodos de regulação dos genes são conhecidos e facilmente postos em prática. Por exemplo, nas células especificamente concebidas para expressar um transgene que codifique a endosialina (e.g., SEQ ID NO: 1, 3 ou 5). O transgene pode ser colocado sob o controlo de um promotor induzível. Os promotores induzíveis adequados para utilização neste método serão conhecidos pelos peritos na área.

Os genes que codificam a endosialina podem ser inibidos através do uso de uma variedade de outras técnicas de silenciamento pós-transcricional (silenciamento de *RNA*). Silenciamento de *RNA* envolve o processamento de *RNA* de cadeia dupla (*dsRNA*) em 21-28 pequenos fragmentos de nucleótidos por uma enzima RNase H ("Dicer" ou "tipo Dicer"). Os produtos de clivagem, que são, *arc siRNA* (pequeno *RNA* de interferência) ou *miRNA* (micro-*RNA*) são incorporados em complexos de proteínas efetoras que regulam a expressão de genes de uma forma específica de sequência.

RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo de silenciamento genético pós-transcricional mediada por RNA de cadeia dupla (*dsRNA*), que é distinto de abordagens antisense e abordagens baseadas em ribozimas (ver Jain, *Pharmacogenomics* (2004) 5:239-42, para uma revisão de RNAi e siRNA). RNA de interferência é útil como método para a inibição da expressão de endosialina numa célula ou num animal, tal como num humano, transformando a célula ou por administração ao animal de um ácido nucleico (e.g., *dsRNA*) que sofre hibridação sob condições rigorosas para um gene que codifica endosialina e atenua a expressão do gene alvo. RNA de interferência fornece *shRNA* ou *siRNA* que compreendem múltiplas sequências que têm como alvo uma ou mais regiões do gene endosialina. Acredita-se que as moléculas (*shRNA* ou *siRNA*) de RNA de cadeia dupla (*dsRNA*) possam dirigir a degradação de uma sequência específica de *mRNA* em variados tipos de células depois de serem processadas por uma enzima tipo RNase III chamada Dicer (Bernstein E et al. (2001) *Nature* 409:363-366) em moléculas de *dsRNA* menores constituídas por duas cadeias de 21 nt, cada uma das quais contendo um grupo fosfato a 5' e um grupo hidroxilo a 3', e inclui uma região de 19 nt precisamente complementar com a outra cadeia, de modo que há uma região dúplex de 19 nt flanqueada por 2nt - 3' salientes. RNAi é assim mediado por pequenos RNAs de interferência (*siRNA*) que tipicamente compreendem uma região de cadeia dupla de cerca de 19 nucleótidos de comprimento com 1-2 nucleótidos 3' salientes em cada cadeia, resultando num comprimento total de cerca de 21 e 23 nucleótidos. Em células de mamíferos *dsRNA* mais longos do que cerca de 30 nucleótidos tipicamente induzem a degradação não específica de *mRNA* via resposta de interferon. Contudo, a presença de *siRNA* em células de mamíferos, em vez de induzir a

resposta do interferon, resulta no silenciamento de genes de sequência específica.

Os vectores virais ou vectores de *DNA* codificam pequenos *RNA* em forma de gancho (*shRNA*) que são processados no citoplasma da célula para *RNA* de interferência curto (*siRNA*). Em geral um *RNA* de interferência curto (*siRNA*) compreende um dúplex de *RNA* que é de preferência cerca de 19 pares de bases de comprimento e, opcionalmente, compreende ainda uma ou duas cadeias simples salientes ou *loops*. Um *siRNA* pode compreender duas cadeias de *RNA* híbridas em conjunto, ou pode, alternativamente, compreender uma única cadeia de *RNA* que inclui uma porção de auto-hibridização. *siRNAs* podem incluir uma ou mais extremidades de cadeia livre que podem incluir fosfatos e/ou grupos hidroxilo. *siRNAs* tipicamente incluem uma porção que hibridiza sob condições rigorosas com um transcrito alvo. Uma cadeia de *siRNA* (ou a porção de auto-hibridização do *siRNA*) é precisamente complementar com uma região do transcrito alvo o que significa que o *siRNA* hibridiza para o transcrito alvo sem uma única incompatibilidade. Quando a complementaridade perfeita não é conseguida é geralmente preferido que quaisquer incompatibilidades estejam localizadas no/ou perto do *siRNA termini*.

siRNAs mostraram diminuir a expressão genética quando transferidos para células de mamífero através de métodos como a transfecção, electroporação, transfecção mediada por lipossomas catiónicos, micro-injecção, ou, quando expressos em células por meio de qualquer uma das várias abordagens baseadas em plasmídeos. *RNA* de interferência que usa *siRNA* é revisto em, e.g., Tuschl (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20:446-8; Yu J-Y et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 99:6047-52; Sui

G et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 99:5515-20; Paddinson et al. (2002) *Genes and Dev.*, 16:948-58; Brummelkamp et al. (2002) *Science*, 296:550-3, 2002; Miyagashi et al. (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20:497-500; e, Paul et al. (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20:505-8. Tal como descrito nestas e noutras referências, o *siRNA* pode ser constituído por duas cadeias de ácidos nucleicos individuais ou de um única cadeia com uma região auto-complementar capaz de formar uma estrutura em forma de gancho (*haste-loop*). Um certo número de variações na estrutura, comprimento, número de incompatibilidades, tamanho do *loop*, identidade de nucleótidos nas saliências, etc., é consistente com o eficaz silenciamento de genes desencadeado por *siRNA*. Embora não desejando ser limitado por qualquer teoria, pensa-se que o processamento intracelular (e.g., por Dicer) de uma variedade de diferentes precursores resulta na produção de *siRNA* capaz de mediar eficazmente o silenciamento do gene. Geralmente é preferível marcar os exões em vez dos intrões, e também pode ser preferível seleccionar sequências complementares para as regiões dentro da porção 3' do transcrito alvo. Geralmente prefere-se seleccionar sequências que contêm um rácio aproximadamente equimolar de diferentes nucleótidos e para evitar estiramentos no qual um único resíduo é repetido várias vezes.

siRNAs podem assim compreender moléculas de RNA possuindo uma região de cadeia dupla de cerca de 19 nucleótidos de comprimento com 1-2 nucleótidos 3' salientes em cada cadeia, resultando num comprimento total cerca de 21 e 23 nucleótidos. Tal como aqui utilizado, *siRNAs* também incluem várias estruturas de RNA que podem ser processadas *in vivo* para gerar tais moléculas. Tais estruturas incluem cadeias de RNA contendo dois elementos complementares que hibridizam um com o

outro para formar uma haste, um *loop*, e, opcionalmente, uma saliência, de preferência, uma saliência em 3'. De preferência, a haste tem cerca de 19 pb de comprimento, o *loop* é de cerca de 1-20 nt, mais preferivelmente cerca de 4-10 nt e ainda mais preferivelmente cerca de 6-8 nt de comprimento e/ou a saliência é de cerca de 1-20 nt e mais preferivelmente cerca de 2 -15 nt de comprimento. A haste pode ter minimamente 19 nucleótidos de comprimento e pode ter até cerca de 29 nucleótidos. *Loops* de 4 nucleótidos ou maiores são menos susceptíveis a restrições de natureza espacial que os *loops* mais curtos e, portanto, podem ser preferidos. A saliência pode incluir um fosfato 5' e um 3' hidroxilo. A saliência pode, mas não precisa de, compreender uma pluralidade de resíduos U, e.g., entre 1 e 5 resíduos U. Clássicos *siRNAs*, como descrito acima, desencadeiam a degradação de *mRNAs* para os quais estão orientados, reduzindo assim a taxa de síntese de proteína. Para além dos *siRNAs* que actuam através da via clássica certos *siRNAs* que se ligam a UTR 3' de um transcrito molde podem inibir a expressão de uma proteína codificada pelo transcrito molde através de um mecanismo relacionado com, mas distinto, do RNA de interferência clássico, e.g., reduzindo a tradução do transcrito em vez de diminuir a sua estabilidade. Tais *RNAs* são referidos como *microRNAs* (*miRNAs*) e tem, tipicamente, entre 20 e 26 nucleótidos de comprimento, como por exemplo, 22. Acredita-se que eles são derivados a partir de precursores maiores conhecidos como pequenos *RNAs* temporais (*stRNAs*) ou precursores de *mRNA*, os quais tem, tipicamente, cerca de 70 nt de comprimento, com um *loop* de 4-15 nt aproximadamente (Grishok et al. (2001) *Cell*, 106:23-4; Hutvagner et al. (2001) *Science*, 293:834-8; Ketting et al. (2001) *Genes Dev.*, 15:2654-9). *RNAs* endógenos deste tipo têm sido identificados numa série de organismos, incluindo

mamíferos, sugerindo que este mecanismo de silenciamento genético pós-transcricional pode ser generalizado (Lagos-Quintana *et al.* (2001) *Science*, 294:853-8, 2001; Pasquinelli (2002) *Trends Gen.*, 18:171-3). *MicroRNAs* mostraram bloquear a tradução de transcritos alvo contendo sítios alvo em células de mamíferos (Zeng *et al.* (2002) *Mol. Cell*, 9:1327-33).

siRNAs como os *mRNAs* que ocorrem natural ou artificialmente (*i.e.*, concebidos por seres humanos) que se ligam a dentro de UTR 3' (ou em outras posições do transcrito alvo) e inibem a tradução podem tolerar um maior número de incompatibilidades no dúplex *siRNA*/molde, e em particular podem tolerar desemparelhamentos dentro da região central do dúplex. De facto há evidências de que algumas inadequações podem ser desejáveis ou necessárias como *stRNAs* que ocorrem naturalmente apresentam com frequência tais desemparelhamentos como *mRNAs* que mostraram inibir a tradução *in vitro*. Por exemplo, após sofrer hibridização com o transcrito alvo tais *siRNAs* frequentemente incluem dois trechos de complementaridade perfeita separadas por uma região de desemparelhamento. É possível uma variedade de estruturas. Por exemplo, o *mRNA* pode incluir várias zonas de não-identidade (incompatibilidade). As zonas de não-identidade (incompatibilidade) não precisam de ser simétricas no sentido em que, tanto o alvo como o *mRNA* incluem nucleótidos não emparelhados. Tipicamente os trechos de complementaridade perfeita tem pelo menos 5 nucleótidos de comprimento, por exemplo 6, 7 ou mais nucleótidos enquanto as regiões de incompatibilidade podem ter, por exemplo de 1, 2, 3, ou 4 nucleótidos de comprimento.

Estruturas em forma de gancho concebidas para imitar os *siRNAs* e precursores de *mRNA* são processadas no meio intracelular em

moléculas capazes de reduzir ou inibir a expressão de transcrito alvo (McManus *et al.* (2002) *RNA* 8:842-50). Estas estruturas em forma de gancho que são baseadas em *siRNAs* clássicos constituídas por duas cadeias de *RNA* que formam uma estrutura dupla de 19 pb classificadas como estruturas em forma de gancho de classe I ou classe II. Estruturas em forma de gancho de classe I incorporam um *loop* na extremidade 5' ou 3' da cadeia antisenso de *siRNA* (*i.e.*, a cadeia complementar ao transcrito alvo cuja inibição é desejada) mas são de outra forma idênticos aos *siRNAs* clássicos. Estruturas em forma de gancho de classe II assemelham-se a precursores de *mRNA* em que eles incluem uma região dupla de 19 nt e um *loop* em ambas as extremidade 3' e 5' da cadeia antisenso da dupla além de uma ou mais diferenças de nucleótidos na haste. Estas moléculas são processadas no meio intracelular em estruturas duplas de pequenos *RNA* capazes de mediar o silenciamento. Eles parecem exercer os seus efeitos através da degradação do *mRNA* alvo em vez de ser através da repressão da tradução, como se pensa ser o caso, para o *mRNA* e *siRNAs* que ocorrem naturalmente.

Assim, é evidente que um conjunto diversificado de moléculas de *RNA* que contêm estruturas dúplex é capaz de mediar o silenciamento através de vários mecanismos. Qualquer tal *RNA*, uma porção dos quais se liga a um transcrito alvo e reduz a sua expressão, quer por desencadear a degradação, por inibição da tradução, ou por outros meios, é considerado ser um *siRNA*, e qualquer estrutura que gera um tal *siRNA* (*i.e.*, serve como um precursor para o *RNA*) é útil nos métodos descritos acima.

Um outro método de *RNA* de interferência é o uso de *RNAs* em forma de gancho (*shRNA*). Um plasmídeo contendo uma sequência de *DNA* que codifica para uma sequência de *siRNA* desejada é

entregue a uma célula alvo através da transfecção ou infecção viral. Uma vez na célula, a sequência de *DNA* é continuamente transcrita em moléculas de *RNA* que formam *loops* sobre si mesmos e acabam por formar estruturas em forma de gancho através do emparelhamento intramolecular de bases. Estas estruturas em gancho uma vez processadas pela célula são equivalentes a moléculas de *siRNA* transfectadas e são usadas pela célula para mediar *RNAi* da proteína desejada. O uso de *shRNA* tem uma vantagem sobre a transfecção de *siRNA* pois pode levar a uma inibição estável e de longa duração da expressão da proteína. A inibição da expressão da proteína por *siRNAs* transfectados é um fenómeno transitório que não ocorre em períodos de tempo mais longos do que alguns dias. Em alguns casos isto pode ser preferível e desejado. Nos casos em que são necessários períodos mais longos de inibição da proteína a inibição mediada por *shRNA* é preferível. O uso de *shRNA* é particularmente preferido. Tipicamente os vectores de codificação de *siRNA* são construções compreendendo um promotor, uma sequência do gene alvo a ser silenciada na orientação do "sentido", um espaçador, o antisenso da sequência do gene alvo e um terminador.

A inibição da expressão de endossialina também pode ser efectuada por outros meios conhecidos e facilmente postos em prática na técnica. Por exemplo, os ácidos nucleicos antisenso podem ser utilizados. Transcritos de *RNA* antisenso têm uma sequência de bases complementar a uma parte ou à totalidade de qualquer outra molécula de *RNA* transcrita na mesma célula. Esses transcritos mostraram conseguir modular a expressão de genes através de uma variedade de mecanismos, incluindo a modulação de *splicing* de *RNA*, a modulação do transporte de *RNA* e da modulação da tradução de *mRNA* (Denhardt (1992) *Ann. NY*

Acad. Sci., 660:70-6, 1992; Nellen *et al.* (1993) *Trends Biochem. Sci.*, 18:419-23; e, Baker *et al.* (1999) *Biochim. Biophys. Acta.*, 1489: 3-18). Por conseguinte, a inibição de endosialina numa célula pode ser conseguida e realizada por expressão de uma molécula de ácido nucleico antisense nas células.

Ácidos nucleicos antisense são geralmente ácidos nucleicos de cadeia simples (*DNA*, *RNA*, *DNA* modificado ou *RNA* modificado) complementares a uma porção de um ácido nucleico alvo (por exemplo, um transcrito de *mRNA*) e, por conseguinte, capazes de se ligarem ao alvo para formar um dúplex. Tipicamente, eles são oligonucleótidos que variam de 15 a 35 nucleótidos de comprimento mas podem variar desde 10 até aproximadamente 50 nucleótidos de comprimento. A ligação tipicamente reduz ou inibe a função do ácido nucleico alvo, tal como um gene que codifica a endosialina. Por exemplo, oligonucleótidos antisense podem bloquear a transcrição quando ligada a *DNA* genómico, inibir a tradução quando ligado ao *mRNA*, e/ou provocar a degradação do ácido nucleico. A inibição da expressão de endosialina pode ser alcançada pela administração de ácidos nucleicos antisense ou de ácidos nucleicos de péptidos que compreendem as sequências complementares, aquelas do *mRNA* que codificam a proteína endosialina. A tecnologia antisense e as suas aplicações são bem conhecidas na área e são descritas em Phillips (ed.) *Antisense Technology, Methods Enzymol.*, 2000, Volumes 313 e 314, Academic Press, San Diego, e referências aí citadas. Ver também Crooke (ed.) "*Antisense Drug Technology: Principles, Strategies and Applications*" (1ª Edição) Marcel Dekker e referências ali citadas.

Oligonucleótidos antisense podem ser sintetizados com uma sequência de bases que é complementar a uma porção de qualquer molécula de RNA transcrita na célula. Oligonucleótidos antisense são capazes de modular a expressão de genes através de uma variedade de mecanismos incluindo a modulação de *splicing* de RNA, a modulação do transporte de RNA e da modulação da tradução do mRNA. Várias propriedades dos oligonucleótidos antisense incluindo, estabilidade, toxicidade, distribuição no tecido, absorção celular e afinidade da ligação podem ser alteradas através de modificações químicas como: (i) substituição do esqueleto de fosfodiéster (e.g., ácidos nucleicos de péptidos, oligonucleótidos tioatos de fósforo e oligonucleótidos de fosfoamidatos), (ii) modificação da base de açúcar (e.g., 2'-O-propilribose e 2'-metoxietoxiribose) e (iii) a modificação de nucleosídeo (e.g., C-5 propinilo U, C-5 tiazole U e fenoxazina C). (Wagner (1995) *Nat. Medicine*, 1:1116-8; Varga et al. (1999) *Immun. Lett.*, 69:217-24; Neilsen (1999) *Curr. Opin. Biotech.*, 10:71-5; e Woolf (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18:1763-9).

A inibição da expressão do gene endosialina também pode ser efectuada por utilização de ribozimas. Certas moléculas de ácidos nucleicos referidas como ribozimas ou desoxiribozimas demonstraram catalisar a clivagem específica da sequência de moléculas de RNA. O sítio de clivagem é determinado por emparelhamento complementar de nucleótidos no RNA ou enzima do DNA com nucleótidos no RNA alvo. Assim, as enzimas de RNA e DNA podem ser concebidas para clivar qualquer molécula de RNA, aumentando, assim, a sua taxa de degradação (Cotten et al. (1989) *EMBO J.* 8:861-6; e, Usman et al. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1:527-33). Ribozimas "cabeça de martelo" também

são usadas rotineiramente na regulação genética (Lyngstadaas (2001) *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 12:469-78).

As células visadas pelos métodos anteriores podem ser especificamente transformadas com ácidos nucleicos que silenciam a transcrição, tais como *shRNA* ou *siRNA*, ou podem ser transformadas com vectores que codificam tais ácidos nucleicos de tal modo que a célula expresse as moléculas inibitórias de ácidos nucleicos. A transformação das células pode ser realizada de acordo com quaisquer meios adequados na área, incluindo aqueles aqui descritos e exemplificados.

Oligonucleótidos *decoy* também são adequados para a regulação da expressão de genes que codificam endosialina. Ensaio clínico recentes têm testado a capacidade dos oligonucleótidos *decoy* para sequestrar proteínas patogénicas. Oligonucleótidos *decoy* contêm geralmente um elemento potenciador que pode penetrar nas células e, uma vez dentro destas, os oligonucleótidos *decoy* ligam-se a proteínas que se ligam a sequências específicas de *DNA* e interferem com a transcrição (Fichou *et al.* (2006) *Trends Biotechnol.*, 24:563-70; Nakamura *et al.* (2002) *In Vivo*, 16:45-8, Tomita *et al.* (1997) *Exp. Nephrol.*, 5:429-34).

A regulação genética da expressão de endosialina também pode ser efectuada por *knockdown* do gene que codifica a endosialina. Como será observado por peritos na área, a sequência do gene da endosialina (a partir de qualquer organismo de interesse), por exemplo, SEQ ID NO: 1, 3 ou 5, pode ser usada para gerar moléculas de ácidos nucleicos e vectores para *knockdown* da expressão do gene da endosialina. Considerada em termos das suas sequências, as moléculas de

ácido nucleico que codificam sequências reguladoras, particularmente inibidoras, derivadas a partir de SEQ ID NO: 1, 3 ou 5, e incluem variantes alélicas, homólogas e mutantes naturais de SEQ ID NO: 1, 3 e 5. Devido a tais variantes e homólogos espera-se que possuam certas diferenças na sequência de nucleótidos, polinucleótidos isolados que possuem pelo menos cerca de 60%, de preferência pelo menos cerca de 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% ou 70%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% ou 80 %, e ainda mais preferencialmente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, e ainda mais preferencialmente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, e mais preferencialmente 96%, 97%, 98% e 99% ou mais de identidade com qualquer ácido nucleico *knockdown* derivado de SEQ ID NO: 1, 3 ou 5. Por causa da variação natural da sequência que provavelmente existe entre os genes que codificam estas sequências reguladoras em diferentes organismos, um perito na área esperaria encontrar este nível de variação, conseguindo manter ainda as propriedades únicas dos polinucleótidos *knockdown*. Deste modo estas variantes e homólogos são consideradas substancialmente iguais um ao outro.

As moléculas de ácido nucleico de *knockdown* podem ser preparadas por dois métodos gerais: (1) elas podem ser sintetizadas a partir de trifosfatos de nucleótidos apropriados ou (2) podem ser isolados a partir de fontes biológicas. Ambos os métodos utilizam protocolos bem conhecidos na área.

A disponibilidade da informação da sequência de nucleótidos tal como toda a sequência de ácidos nucleicos de endosialina, por exemplo, SEQ ID NO: 1, 3 e 5 permitem a preparação de uma

molécula de ácido nucleico isolado por síntese de oligonucleótidos. Os oligonucleótidos sintéticos podem ser preparados pelo método fosforoamidite empregue num sintetizador de DNA 38^a de biosistemas aplicados ou dispositivos semelhantes. A construção resultante pode ser purificada de acordo com métodos conhecidos na área como a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Uma molécula de DNA sintético construído pode ser então clonado e amplificado com um vector apropriado.

Os ácidos nucleicos de *knockdown* podem ser mantidos como DNA em qualquer vector de clonagem conveniente. Os clones podem ser mantidos no plasmídeo de clonagem/vector de expressão e cada um dos quais pode ser propagado numa célula hospedeira procariótica ou eucariótica adequada.

Moléculas de ácidos nucleicos *knockdown* incluem *cDNA*, DNA genómico, RNA e fragmentos destes que podem ser de cadeia simples, dupla ou até mesmo tripla. Assim, oligonucleótidos (cadeias de DNA ou RNA senso ou antisenso) que possuem sequências capazes de sofrer hibridização com, pelo menos, uma sequência de uma molécula de ácido nucleico como discutido acima pode ser usada, em particular, nas SEQ ID NO: 1, 3 ou 5. Tais oligonucleótidos são úteis como sondas para a detecção de genes que codificam a endosialina ou para a regulação positiva ou negativa da expressão de genes que codificam a endosialina antes ou na tradução do *mRNA* na proteína. Métodos nos quais os oligonucleótidos ou os polinucleótidos podem ser utilizados como sondas para tais ensaios incluem, mas não estão limitados a: (1) a hibridização *in situ*, (2) hibridização de Southern (3) hibridização de Northern; e, (4) reacções de amplificação

variadas, tais como, reacções em cadeia de polimerase (PCR) e de reacção em cadeia da ligase (LCR).

Vectores e *kits* para a produção de células hospedeiras transgénicas que compreendem um polinucleótido que codifica uma sequência reguladora para a inibição da expressão da endosialina, ou homólogo, análogo ou variante, numa orientação senso ou antisenso, ou de uma construção sob controlo da célula ou promotores específicos de tecido e/ou outras sequências reguladoras podem ser usadas. Estes vectores são adequados para a modulação e, de preferência, inibindo a expressão da endosialina.

As células hospedeiras adequadas incluem, mas não estão limitadas a, células de plantas, células de bactérias, células de levedura e de outras células de fungos, células de insectos e células de mamíferos que expressam endosialina. As células podem ser neoplasticamente transformadas. As células com mais preferidas são as células humanas.

Os vectores para a transformação de uma grande variedade destas células hospedeiras são bem conhecidos dos peritos na área. Eles incluem, mas não estão limitados a, plasmídeos, fagemídeos, cosmídeos, baculovírus, bacmids, cromossomas artificiais bacterianos (BACs), cromossomas artificiais de levedura (YACs), bem como de outros vectores de bactérias, leveduras e virais.

A região de codificação de uma sequência reguladora pode ser colocado sob um promotor constitutivo potente, tal como os promotores para os seguintes genes: hipoxantina fosforribosil-transferase (HPRT), adenosina deaminase, piruvato quinase,

beta-actina, miosina humana, hemoglobina humana, creatina do músculo humano e outros. Além disso, muitos promotores virais funcionam constitutivamente em células eucarióticas e a sua utilização é adequada na presente invenção. Estes promotores virais incluem, sem limitação, citomegalovírus (CMV) promotor precoce imediato, os promotores precoces e tardios de SV40, o promotor do vírus do tumor mamário de rato (MMTV), as repetições terminais longas (LTRs) do vírus da leucemia de Moloney, vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus de Epstein Barr (EBV), vírus do sarcoma de Rous (RSV) entre outros retrovírus, e ainda o promotor da timidina quinase do vírus herpes simplex. Outros promotores que são conhecidos pelos peritos na área. A região de codificação da sequência reguladora pode ser colocada sob um promotor induzível, tal como o promotor de metalotioneína, promotor induzível de tetraciclina, promotor induzível de doxíciclina, promotores que contêm um ou mais elementos de resposta estimulada por interferon (ISRE), tais como a proteína quinase R 2', 5' - oligoadenilato sintetase, genes Mx, ADAR1 e semelhantes. Outros promotores induzíveis adequados serão conhecidos dos peritos na área.

Vectores de *knockdown* podem ser utilizados para transformar várias células que expressam endosialina com sequências reguladoras de ácidos nucleicos. Inúmeras técnicas são conhecidas na área para a introdução de genes estranhos em células e podem ser utilizadas para construir células recombinantes para fins de realização dos métodos acima descritos. A técnica utilizada deverá proporcionar uma transferência estável da sequência do gene heterólogo para a célula hospedeira de tal modo que a sequência do gene heterólogo é hereditária e expressa pela descendência da

célula de modo que o desenvolvimento necessário e funções fisiológicas das células recipientes não são interrompidos. Técnicas que podem ser utilizadas incluem, mas não estão limitadas a, transferência de cromossoma (e.g., fusão celular, transferência de genes mediada por cromossomas, micro transferência de genes mediada por células), métodos físicos (e.g., transfecção, fusão de esferoplastos, microinjecção, electroporação, transportadores de lipossomas), transferência de vectores virais (e.g., vírus de DNA recombinante, vírus de RNA recombinante) e similares (descritos em Cline (1985) *Pharmac. Ther.*, 29:69-92).

Células de *knockdown* com expressão inibida de endosialina podem ser criadas através da inibição da tradução do *mRNA* que codifica a proteína de transporte por "silenciamento de genes pós-transcricional". O gene das espécies marcadas para a regulação negativa, ou um fragmento, podem ser utilizados para controlar a produção da proteína codificada. Moléculas antisense de comprimento total podem ser utilizadas para esta finalidade. Alternativamente podem ser utilizados oligonucleótidos antisense marcados para regiões específicas do *mRNA* que são críticas para a tradução. Moléculas antisense podem ser providenciadas *in situ* por células de transformação com uma construção de DNA que, aquando da transcrição, produz as sequências de RNA antisense. Tais construções podem ser concebidas para produzir produtos antisense de comprimento total ou sequências parciais. Este efeito de silenciamento de genes pode ser aumentado por sobre-produção transgénica tanto de RNA senso como antisense da sequência de codificação do gene de tal modo que uma elevada quantidade de *dsRNA* é produzida (por exemplo, ver Waterhouse *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 95:13959-64). A este respeito, o *dsRNA*

contendo as sequências que correspondem a uma parte ou à totalidade de pelo menos um intrão tem sido particularmente eficaz. Parte ou toda a sequência antisenso de codificação pode ser expressa por um transgene. A hibridização de cadeias senso e antisenso de parte ou da totalidade da sequência de codificação para uma endosialina são expressas transgenicamente.

As células marcadas, ou de outra forma usadas nos métodos acima, incluem células que naturalmente expressam endosialina ou células transfectadas com um plasmídeo recombinante expressando endosialina. As células primárias que expressam endosialina podem ser isoladas a partir de tecidos ou adquiridas a partir de vendedores de células endoteliais, tais como, mas não limitadas, a HUVEC ou HMVEC bem como fibroblastos primários e cultivados. As células transfectadas incluem qualquer linha de células de expressão de insectos conhecida, como por exemplo, células de *Spodoptera frugiperda*. As linhas celulares de expressão podem também ser linhas de células de levedura, como por exemplo, células de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Schizosaccharomyces pombe*. As células de expressão podem também ser células de mamíferos, tais como, por exemplo, células de ovário de hamster chinês, células de rim de hamster bebé, linha 293 de células de rim embrionário humano, as linhas de células de rim de cão, as linhas de células de rim de gato, células de rim de macaco, células de rim de macaco verde africano, células COS e células não oncogénicas de mioblastos G8 de rato, linhas de células de fibroblastos, linhas de células de mieloma, células de rato NIH/3T3, células LMTK, células de Sertoli de rato, células de carcinoma do cervical humano, células de fígado de rato búfalo, células de pulmão humano, células de fígado humano,

células de tumor mamário de rato, células TR1, células MRC 5 e células FS4.

A inibição da expressão de endosialina inibe a interacção de endosialina com qualquer ligando de endosialina. Ligandos de endosialina incluem proteínas da matriz extracelular, tais como fibronectina e colagénio.

De acordo com a presente invenção também podem ser anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio dos mesmos para inibir a interacção de endosialina expressa por uma célula de expressão de endosialina com um ligando de endosialina que compreendem o bloqueio ou obstrução da expressão de endosialina pela célula. Assim, por exemplo, uma barreira física serve para inibir ou, de outro modo, impedir a interacção da endosialina expressa com um ligando de endosialina. Quaisquer químicos ou biomoléculas podem servir para obstruir essa interacção.

Em algumas das metodologias preferidas, inibir a interacção de uma célula que expressa endosialina com um ligando para a endosialina compreende a inibição da ligação do ligando da endosialina à endosialina expressa. Por exemplo, a interacção entre endosialina e o seu ligando está impedida, bloqueada, impedida, ou de outro modo obstruída com uma barreira molecular. Deste modo, o acesso à célula pelo ligando está, assim, impedido, inibido, bloqueado, impedido, obstruído ou prevenido. A obstrução da endosialina pode ocorrer por quaisquer meios adequado na área como, por exemplo, pelo uso de um químico ou biomolécula.

Os produtos químicos incluem, mas não estão limitados, a estruturas de aminoácidos, esteróides, ciclinas, antracenos,

metais pesados, quinolonas, terpenos, compostos fenólicos, glicosídeos, alcalóides, lípidos, etc., ou misturas que podem exercer um efeito biológico em células que expressam endosialina. Os produtos químicos podem ser gerados por síntese química ou derivados de biocatálise ou derivados a partir de fluidos biológicos. Os produtos químicos podem ser derivados de humanos, de mamífero não humanos, plantas, leveduras, fungos e/ou fontes procarióticas.

Os inibidores competitivos podem ser empregues para inibir a interacção de endosialina ou uma célula que expressa endosialina com um ligando da endosialina. Um "inibidor competitivo" compete com o ligando para o local de ligação à endosialina. Os inibidores competitivos podem ser ligandos da endosialina, por exemplo, colagénio (e.g., colagénio I ou IV), fibronectina ou os seus fragmentos de ligação da endosialina. Inibidores competitivos mais preferidos são: o fragmento de 70 kDa N-terminal de fibronectina, o fragmento de ligação de gelatina de 45 kDa de fibronectina e o fragmento de ligação de heparina de 30 kDa de fibronectina.

Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio dos mesmos são usados para obstruir a interacção da endosialina expressa com ligandos da endosialina. Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio podem ser específicos para um epitopo na endosialina, ou pode ser específico para um epitopo num ligando da endosialina. Anticorpos e fragmentos de ligação ao antigénio específico para endosialina são mais preferidos. Os anticorpos para os ligandos, como a fibronectina, colagénio, e semelhantes estão comercialmente disponíveis.

Os anticorpos adequados podem ser policlonais ou monoclonais, ou podem ser derivados ou fragmentos de anticorpos que retêm a especificidade para a endosialina ou um ligando da endosialina. Os anticorpos podem ser de qualquer uma das cinco classes de anticorpos, *i.e.*, os isótipos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Anticorpos adequados também incluem o isótipo IgY geralmente encontrado em serum de galinha ou de peru e gema d'ovo de galinha ou peru.

Derivados de anticorpos e fragmentos de antígeno de ligação são adequados para utilização nos métodos da invenção, e tais derivados compreendem porções de anticorpos intactos que retêm a especificidade de ligação ao antígeno da molécula de anticorpo parental. Por exemplo, derivados podem incluir, pelo menos, uma região variável (tanto uma região variável de cadeia pesada como de cadeia leve). Exemplos de derivados de anticorpos e fragmentos adequados incluem, sem limitação, anticorpos com especificidade poliepitópica, anticorpos bi-específicos, diacorpos e moléculas de cadeia simples, bem como as moléculas Fab, F(ab')₂, Fd, Fabc e Fv, anticorpos de cadeia simples (Sc), cadeias leves de anticorpos individuais, cadeias pesadas de anticorpos individuais, fusões quiméricas entre cadeias de anticorpos e outras moléculas, monómeros ou dímeros de cadeia pesada, monómeros ou dímeros da cadeia leve, dímeros constituídos por uma cadeia pesada e uma leve, e similares. Todos os isótipos de anticorpos podem ser usados para produzir derivados de anticorpos e fragmentos. Derivados de anticorpos e fragmentos podem ser produzidos de forma recombinante.

Os anticorpos podem ser derivados de qualquer espécie. Por exemplo, os anticorpos podem ser de murganho, rato, cabra, cavalo, suínos, bovinos, galinha, coelho, burro, humano, e

outros semelhantes. Para utilização nos métodos de tratamento, ou para a administração a seres humanos, anticorpos derivados não humanos podem ser estruturalmente modificado para ser menos antigénico após a administração a um paciente humano.

Assim, em algumas formas de realização da invenção os anticorpos utilizados são anticorpos quiméricos. Os anticorpos quiméricos e os métodos para produzi-los são bem conhecidos e estabelecidos na área. Por exemplo, um anticorpo quimérico pode compreender um domínio de ligação ao antigénio de um murganho com *Fc* humano, ou outro domínio estrutural.

Em algumas metodologias, os anticorpos são anticorpos humanizados. Os anticorpos humanizados podem ser imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou fragmentos (tais como *Fv*, *Fab*, *Fab'*, *F(ab')₂* ou outras subsequências de anticorpos de ligação ao antigénio) que contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Para a maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais resíduos de uma região determinante de complementaridade (*CDR*) do receptor são substituídos por resíduos de uma *CDR* de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como o murganho, rato ou coelho, possuindo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, resíduos da região estrutural de *Fv* (*FWR*) da imunoglobulina humana são substituídos pelos resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo receptor nem nas sequências de *CDR* ou nas estruturais importadas. Estas modificações são feitas para refinar mais e otimizar o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá

substancialmente a totalidade de pelo menos um, e tipicamente de dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FWR são as de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado optimamente também compreenderá, pelo menos, uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, consulte Jones *et al.* (1986) *Nature*, 321:522-5; Reichmann *et al.* (1988) *Nature*, 332:323-9; e, Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-6.

Em aspectos preferidos da invenção os anticorpos são totalmente humanos. Isto significa que o anticorpo é apenas de origem humana ou de outro modo consiste numa sequência de aminoácidos idêntica a uma forma humana do anticorpo.

Os anticorpos da invenção podem ser marcados ou de outra forma conjugados com vários grupos funcionais químicos ou biomoléculas, por exemplo, para aplicações terapêuticas ou de diagnóstico. As porções podem ser citotóxicas, por exemplo, toxinas bacterianas, toxinas virais, radioisótopos e afins. As porções podem ser marcadores detectáveis, por exemplo, marcadores fluorescentes, marcadores radioactivos, biotina e afins. Porções adicionais incluem, mas não estão limitadas a, glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação e formação de amidas. Os anticorpos da invenção podem ser derivados de grupos protectores/bloqueadores conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou de outras proteínas, e outros semelhantes.

Os peritos na área reconhecerão que a especificidade do anticorpo é determinada principalmente pelas seis regiões CDR, em particular a cadeia H CDR3 (Kala *et al.* (2002) *J. Biochem.*, 132:535-41; Morea *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.*, 275:269-94; e, Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901-17). Regiões estruturas de anticorpos, no entanto, podem desempenhar um papel em interações antigénio-anticorpo (Panka *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 85:3080-4), em particular no que diz respeito ao seu papel na conformação de *loops* CDR (Foote *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.*, 224:487-99). Assim, os anticorpos podem compreender qualquer combinação de H ou cadeia L de regiões CDR ou FWR que conferem a especificidade do anticorpo para a endosialina ou para ligandos da endosialina.

Em algumas metodologias a invenção contempla a utilização de anticorpos humanos isolados e fragmentos de ligação ao antigénio, que se ligam especificamente à endosialina. Em algumas formas de realização os anticorpos adequados ou fragmentos de ligação ao antigénio podem compreender uma cadeia pesada compreendendo CDR1, CDR2 e CDR3 de SEQ ID NO: 28, 30 e 32, respectivamente, e uma cadeia leve compreendendo CDR1, CDR2 e CDR3 de SEQ ID NO: 13, 15 e 17, respectivamente.

As cadeias pesadas CDR1, CDR2 e CDR3 são codificadas por sequências de nucleótidos de SEQ ID NO: 27, 29 e 31, respectivamente. As cadeias leves CDR1, CDR2 e CDR3 podem ser codificadas pelas sequências de nucleótidos de SEQ ID NO: 12, 14 e 16, respectivamente. Em algumas formas de realização os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio podem compreender uma cadeia pesada que compreende um domínio variável de SEQ ID NO: 34 e uma cadeia leve que compreende um domínio variável de SEQ ID NO: 19. O domínio variável da

cadeia pesada pode ser codificado pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 33. O domínio variável da cadeia leve está codificado pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 18. Em algumas metodologias os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem compreender uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22 ou 26 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11.

A cadeia pesada é codificada pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 21 ou 25 e a cadeia leve deve ser codificada pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 10.

Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem compreender uma cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 20 ou 24 e uma cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 9. Os anticorpos podem compreender uma cadeia pesada codificada pela sequência de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 ou 23. Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem compreender uma cadeia leve codificada pela sequência de ácidos nucleicos que compreendem a SEQ ID NO: 7.

As células produtoras de anticorpos produzem anticorpos que podem ser utilizados de acordo com a invenção foram colocados com a coleção de microorganismos Norte americana (10801 University Blvd., Manassas, Virgínia 20110-2209) em 24 de Abril de 2006 e em 11 de Março de 2008 e foram atribuídos Números de Acesso: PTA- 7554 e PTA- 9017, respectivamente.

É para ser compreendido que, por causa da variação natural de sequência que exista entre as cadeias pesadas e leves e os genes que as codificam, um perito na área esperaria encontrar

algum grau de variação dentro das sequências de aminoácidos ou os genes que os codificam, enquanto mantém as propriedades únicas de ligação (e.g., a especificidade e afinidade) de anticorpos da presente invenção. Essa expectativa é devida, em parte, à degeneração do código genético bem como ao sucesso evolutivo conhecido de variações conservativas da sequência de aminoácidos que não alteram apreciavelmente a natureza da proteína codificada. Deste modo, tais variantes e homólogos são consideradas substancialmente o mesmo que o outro e estão incluídos dentro do âmbito da presente invenção.

Variantes com substituições de aminoácidos simples ou múltiplas, deleções, adições ou substituições que retêm as propriedades biológicas (e.g., afinidade ou actividade efectiva imune) dos anticorpos aqui descritos são contemplados para uso no invento. O perito pode produzir variantes contendo substituições simples ou múltiplas de aminoácidos, deleções, adições ou substituições. Estas variantes podem incluir, por exemplo: (a) variantes em que um ou mais resíduos de aminoácidos são substituídos com aminoácidos conservativos ou não conservativos, (b) variantes em que um ou mais aminoácidos são adicionados ou eliminados do polipéptido, (c) variantes em que um ou mais aminoácidos incluem um grupo substituinte e (d) variantes em que o polipéptido é fundido com um outro péptido ou polipéptido, tal como um parceiro de fusão, uma marcação da proteína ou a outros grupos funcionais químicos, que possam conferir propriedades úteis para o polipéptido, tal como, por exemplo, um epitopo para um anticorpo, uma sequência de polihistidina, uma porção de biotina e semelhantes. Os anticorpos do invento podem incluir variantes em que os resíduos de aminoácidos de uma espécie são substituídos pelo resíduo correspondente de outra espécie, quer nas posições conservadas

ou não conservadas. Em outras metodologias, os resíduos de aminoácidos nas posições não conservadas são substituídos com resíduos conservativos ou não conservativos. As técnicas para a obtenção destas variantes, incluindo genéticas (supressões, deleções, mutações, etc.), químicas e enzimáticas são conhecidas pela pessoa com conhecimentos correntes na área.

A presente invenção contempla anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio que têm sequências de aminoácidos que são substancialmente as mesmas que as sequências de aminoácidos previamente descritas. Por exemplo, tais anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio devem incluir aqueles em que as cadeias pesadas CDR1, CDR2 e CDR3 são, pelo menos, 90% idênticas às da SEQ ID NO: 28, 30 e 32, respectivamente, e/ou em que as cadeias leves CDR1, CDR2 e CDR3 são, pelo menos, 90% idênticas às SEQ ID NO: 13, 15 e 17, respectivamente. Em algumas metodologias tais anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio devem incluir aqueles em que o domínio variável da cadeia pesada é pelo menos 90% idêntico à SEQ ID NO: 34 e/ou em que o domínio variável da cadeia leve é pelo menos 90% idêntico à SEQ ID NO: 19. Em algumas metodologias os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio podem incluir aqueles em que a cadeia pesada é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO: 22 ou 26 e/ou em que a cadeia leve é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO: 11. Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio podem incluir aqueles em que a cadeia pesada é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO: 20 ou 24 e/ou em que a cadeia leve é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO: 9. Por exemplo, os anticorpos M4 e M4.1 são anticorpos humanizados para a endosialina humana. Enquanto que os anticorpos M4 e M4.1 partilham uma sequência de cadeia leve por outro lado eles diferem na sua cadeia pesada por uma única

sequência de aminoácidos, por exemplo, no resíduo 429 da SEQ ID NO: 20 em relação ao resíduo 429 da SEQ ID NO: 24. O invento contempla ainda anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio que competem com os anticorpos M4 e M4.1 para a ligação à endosialina. O invento contempla ainda anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio que se ligam ao mesmo epitopo da endosialina que o anticorpo M4 ou M4.1.

Os anticorpos da invenção podem ter afinidades de ligação para o antigénio alvo, tal como a endosialina ou um ligando da endosialina, que inclui uma constante de dissociação (K_D) menor que 1×10^{-2} M, ou que 1×10^{-3} M, inferior a 1×10^{-4} M ou 1×10^{-5} M e ainda menor do que 1×10^{-6} M. Em outras metodologias o K_D é inferior a 1×10^{-7} M. O K_D pode ainda ser inferior a 1×10^{-8} M ou a 1×10^{-9} M, menos do que 1×10^{-10} M ou 1×10^{-11} M, menos de 1×10^{-12} M, 1×10^{-13} M, 1×10^{-14} M e ainda inferior a 1×10^{-15} M.

A especificidade e/ou afinidade de anticorpos que se ligam à endosialina podem, opcionalmente, ser optimizadas pela evolução directa de células que produzem o anticorpo pela utilização de um alelo negativo dominante de um gene de reparação de emparelhamentos incorrectos, como PMS1, PMS2, PMS2-134, PMSR2, PMSR3, MLH1, MLH2, MLH3, MLH4, MLH5, MLH6, PMSL9, MSH1 e MSH2 introduzidos nas células produtoras de anticorpos. As células que contêm o mutante negativo dominante tornar-se-ão hipermutáveis e acumularão mutações a uma taxa mais elevada do que as células de controlo não transfectadas. Um conjunto de células mutantes podem ser rastreadas para clones que produzem com maior afinidade/especificidade anticorpos ou proteínas de ligação, ou que produzem graus mais altos de anticorpos ou proteínas de ligação ou que

simplesmente crescem mais depressa ou melhor sob determinadas condições. A técnica para gerar células hipermutáveis utilizando alelos negativos dominantes de genes de reparação de emparelhamentos incorrectos é descrita na Patente dos EUA Nr: 6,146,894. Alternativamente, a reparação de emparelhamentos pode ser inibida utilizando os inibidores químicos de reparação de emparelhamentos incorrectos descritos em WO 02/054856. A técnica para melhorar os anticorpos utilizando os alelos negativos dominantes de genes de reparação de emparelhamentos incorrectos ou de inibidores químicos de reparação de emparelhamentos incorrectos podem ser aplicados às células de expressão de mamíferos, leveduras, plantas ou procariotas que expressam imunoglobulina clonada ou genes da proteína. Células que expressam os alelos negativos dominantes ou pequenas moléculas podem ser "curadas" onde o alelo negativo dominante pode ser "desligado", se induzível, eliminado da célula enquanto o pequeno químico pode ser removido da cultura resultando em células que são geneticamente estáveis uma vez mais e não acumulam mais mutações a uma taxa anormalmente elevada.

A inibição da expressão de endosialina inibe a interacção de endosialina com qualquer ligando da endosialina. Ligandos da endosialina são a fibronectina e colagénio. Qualquer subtipo de colagénio pode servir como um ligando da endosialina. Colagénio I e colagénio IV são mais preferidos.

A inibição da interacção da endosialina com ligandos da endosialina inibe as vias e cascatas que são reguladas ou de outro modo activadas como resultado desta interacção. Por exemplo, a interacção da endosialina com ligandos da endosialina pode promover a expressão e/ou activação de

moléculas de adesão, tal como integrinas que medeiam a ligação de células à matriz extracelular ou a outras células e que medeiam vias de sinalização celular, entre outras coisas.

As integrinas tendem a existir como heterodímeros contendo duas cadeias diferentes, uma subunidade α (alfa) e outra β (beta). Há aproximadamente 18 α e 8 β subunidades que foram caracterizadas. Além disso uma série de subunidades de integrina existe como variantes via *splicing* diferencial. As várias combinações de subunidades alfa e beta de integrina resultam em mais de 24 complexos de integrina activos únicos (Hynes (2002) *Cell*, 110:673). Subunidades de integrina penetram a membrana plasmática, e em geral contêm pequenos domínios citoplasmáticos de cerca de 40-70 aminoácidos. No exterior da membrana plasmática da célula as cadeias alfa e beta encontram-se em estreita proximidade umas com as outras ao longo de um comprimento de cerca de 23 nm. O amino-termini de cada cadeia da integrina está justaposto dentro de 5 nm de um ao outro para formar uma região de ligação ao ligando para interacção EMP. As integrinas são categorizadas usando vários critérios. As cadeias alfa são classificadas como tal por causa de um subconjunto das cadeias α que tem elementos estruturais inseridos perto do grupo amina terminal chamado domínio alfa-A porque tem uma estrutura semelhante aos domínios-A dentro do factor von Willebrand. As integrinas que transportam este domínio podem-se ligar aos colagénios (complexos de integrina $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$), ou agir como moléculas de adesão célula-célula com esses complexos contendo integrinas da família $\beta 2$. Duas funções principais das integrinas são a fixação da célula a proteínas da matriz extracelular e de transdução de sinal mediado pela ligação de EMP-integrina à célula. Além disso, as integrinas também estão

envolvidas numa ampla gama de outras actividades biológicas, incluindo, a ligação de vírus, como o adenovírus, vírus Echo, vírus Hanta, viroses da boca e do pé, assim como a ligação a células envolvidas no patrulhamento imunológico e contacto célula-célula para a migração celular. Integrinas acoplam EMPs (que dependem do complexo integrina) ao citoesqueleto dentro da célula. Vários ligandos de integrinas foram identificados. Os ligandos mais comuns são: a fibronectina, vitronectina, colagénio e laminina. As interacções entre as integrinas, EMP e os microfilamentos dentro da célula estão ligados a proteínas *scaffold* incluindo a talina, a paxilina e alfa-actinina. Estas interacções resultam na regulação de quinases como FAK (quinase de adesão focal) e membros da família de Src quinase para fosforilar substratos como p130CAS, para isso recrutando os adaptadores de sinalização, tais como Crk para mediar as respostas celulares, incluindo a activação da via, a proliferação celular e/ou sobrevivência. Qualquer destas funções associadas à integrina pode ser montada como um ensaio de rastreio para monitorizar a actividade de integrina como uma função da actividade da endosialina para ensaios com o objectivo de identificar os agentes farmacológicos ou uma eficaz marcação de moléculas com endosialina na presente invenção. Além disso, tendo em conta a invenção aqui revelada, marcando como alvo as integrinas com agentes farmacológicos para a endosialina em células que expressam endosialina têm amplas oportunidades para a supressão da infecção viral mediada pelas integrinas e outras patologias.

Assim, a inibição da interacção da endosialina com um ligando da endosialina inibe a expressão e/ou activação de moléculas de integrina na célula que expressa endosialina. A expressão

ou a activação de integrina $\beta 1$, $\beta 2$ ou $\beta 3$ pode ser suprimida pela inibição.

Outras moléculas e vias cuja expressão e/ou activação são afectadas pela inibição da interacção da endosialina com ligandos da endosialina incluem metaloproteínases da matriz (MMPs). As MMPs são proteases dependentes de zinco que desempenham um papel, entre outras coisas, na degradação de proteínas da matriz extracelular, nos receptores da superfície celular, e semelhantes. As MMPs desempenham funções na migração celular, proliferação e na angiogénese, entre outras coisas. A família MMP de enzimas tem um ponto em comum de ligação de zinco (HExxHxxGxxH) dentro do seu sítio activo, e uma metionina conservada que segue o sítio activo. As MMPs são classificadas pela sua homologia umas com as outras, pela especificidade do substrato e, em parte, pela sua localização na célula. Elas são em geral agrupadas em quatro classes: collagenase, estromalisina, gelatinase, e as MMPs do tipo membranar (MT-MMPs). MMPs do tipo collagenase são capazes de degradar colagénios fibrilares da tripla hélice em fragmentos distintos. Estes colagénios são os principais componentes do osso e cartilagem e esta classe de MMPs são as únicas enzimas de mamíferos capazes de degradá-los. Eles incluem a MMP-1 (collagenase intersticial); MMP-8 (collagenase de neutrófilos); MMP-13 (collagenase 3) e MMP-18. MMP enzimas do tipo estromalisina exibem uma ampla capacidade de clivar *EMPs* mas são incapazes de clivar os colagénios fibrilares da tripla hélice. Esta classe inclui: MMP-3 (estromalisina 1); MMP-10 (estromalisina 2); MMP-11 (estromalisina 3); MMP-12 (metaloelastase de macrófago); MMP-19 (RASI-1, também conhecida como estromalisina 4); e MMP-20 (enamalisina); MMP-22 (C-MMP) e MMP-27. MMPs do tipo gelatinase degradam

principalmente o colagénio do tipo IV, e gelatina, e distinguem-se pela presença de um domínio adicional inserido no domínio catalítico. Esta região de ligação à gelatina é posicionada imediatamente antes do ponto de ligação ao zinco e forma uma unidade de dobragem separada que não perturba a estrutura do domínio catalítico. Esta classe inclui MMP-2 (gelatinase de 72 kDa, gelatinase-A); MMP-9 (gelatinase de 92 kDa, gelatinase-B). Finalmente, as MMPs ligadas à membrana são aquelas que estão ligadas à membrana celular exterior. Elas incluem: cisteína transmembranar de tipo II da gama das MMP-23, as MMPs 17 e 26 ligadas ao glicosilfosfatidilinositol (MT4-MMP e MT6-MMP, respectivamente), e as MMPs transmembranares de tipo I 14, 15, 16, 24 (MT1, MT2-MMP, MT3-MMP, e MT5-MMP respectivamente). Todas estas MMPs têm um local de clivagem de furina no pró-péptido, que é também uma característica partilhada por MMP-11.

Assim, a inibição da interacção da endosialina com um ligando da endosialina inibe a expressão e/ou a activação de MMPs na célula que expressa endosialina. Em algumas metodologias preferidas, a expressão ou a activação de MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, ou MMP-18 é suprimida pela inibição.

Sem se pretender estar ligado a qualquer teoria ou mecanismo de operação particulares, crê-se que a endosialina tem função directa ou indirectamente na angiogénese, em particular no que diz respeito à neovascularização e doenças, como o cancro. Portanto, acredita-se que a interrupção da ligação da endosialina ou células que expressam a endosialina para os ligandos, ou interromper a activação de integrinas mediada pela endosialina, a expressão de MMPs e/ou proliferação

celular/sobrevivência possa suprimir a vascularização associada a doença neovascular.

Por conseguinte, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem ser usados para inibir a angiogénese. Os métodos podem ser levados a cabo *in vivo*. Um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno que obstrui a endosialina expressa na superfície celular pode ser administrado onde a obstrução inibe a interacção da dita célula com um ligando da endosialina, e aqui a inibição da interacção da célula com o ligando inibe a angiogénese de um tecido, órgão, ou neoplasma no sujeito.

Uma célula, cultura de células, tecido ou órgão pode contactar com uma composição que obstrui endosialina expressa na superfície celular, aqui refere-se que a obstrução inibe a interacção da célula com um ligando da endosialina, e aqui a inibição da referida interacção da célula com o ligando inibe a angiogénese pela célula, cultura de células, tecido ou órgãos.

A composição pode compreender pelo menos um inibidor competitivo descrito aqui. Os inibidores competitivos podem ser ligandos da endosialina, por exemplo, colagénio, fibronectina ou fragmentos de ligação à endosialina. Inibidores competitivos mais usados são fragmentos de colagénio tipo I, colagénio IV ou fibronectina. Os inibidores competitivos preferidos são os fragmentos de fibronectina de 70 kDa N-terminais, fragmentos de fibronectina de 45 kDa de ligação à gelatina e o fragmento de fibronectina de 30 kDa de ligação à heparina.

A composição pode compreender pelo menos um anticorpo que se liga especificamente à endosialina. Tais anticorpos têm preferencialmente uma afinidade para a endosialina que é menos do que cerca de 1×10^{-7} M, com maior preferência inferior a cerca de 1×10^{-8} M, menos do que 1×10^{-9} M e de preferência inferior a cerca 1×10^{-10} M. Os anticorpos que se ligam especificamente à endosialina podem incluir aqueles anticorpos cujas características estão aqui descritas e exemplificadas. Por exemplo, em alguns aspectos preferidos, o anticorpo que se liga especificamente à endosialina compreende uma cadeia pesada que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 da SEQ ID NO: 28, 30 e 32, respectivamente, e uma cadeia leve que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 da SEQ ID NO: 13, 15 e 17, respectivamente. As cadeias pesadas CDR1, CDR2 e CDR3 são codificadas por sequências de nucleótidos da SEQ ID NO: 27, 29 e 31, respectivamente.

As cadeias leves CDR1, CDR2 e CDR3 são codificadas por sequências de nucleótidos da SEQ ID NO: 12, 14 e 16, respectivamente. Em algumas metodologias os anticorpos podem compreender uma cadeia pesada que compreende um domínio variável da SEQ ID NO: 34 e uma cadeia leve que compreende um domínio variável da SEQ ID NO: 19. O domínio variável da cadeia pesada é codificado pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 33. O domínio variável da cadeia leve é codificado pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 18. Em algumas metodologias os anticorpos podem compreender uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22 ou 26 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11. A cadeia pesada é codificada pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 21 ou 25 e a cadeia leve é codificada pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 10. Os

anticorpos podem compreender uma cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 20 ou 24 e uma cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 9. Os anticorpos podem compreender uma cadeia pesada codificada pela sequência de ácidos nucleicos da SEQ ID NO:8 ou 23. Os anticorpos podem compreender uma cadeia leve codificada pela sequência de ácidos nucleicos que compreende a SEQ ID NO: 7. As células produtoras de anticorpos que produzem anticorpos que podem ser utilizados de acordo com a invenção foram colocadas com a colecção de microorganismos Norte americana (10801 University Blvd., Manassas, Virgínia 20110-2209) em 24 Abril de 2006 e em 11 de Março de 2008 e foram atribuídos Números de Acesso: PTA-7554 e PTA-9017, respectivamente. Os anticorpos podem ser policlonais, monoclonais, fragmentos de ligação ao antigénio, quiméricos, humanizados, totalmente humanos, e outros semelhantes, tal como aqui descrito.

A inibição da expressão de endosialina inibe a interacção de endosialina com qualquer ligando da endosialina. Ligandos da endosialina envolvidos nesta presente invenção são a fibronectina e o colagénio.

A invenção também pode ser usada inibir a neovascularização. Os métodos podem ser efectuados *in vitro* ou *in vivo*.

Uma quantidade terapêutica eficaz de uma composição que obstrui a endosialina expressa na superfície de uma célula pode ser administrada onde a obstrução inibe a interacção da célula com um ligando da endosialina e onde a inibição da dita interacção da célula com o ligando inibe a neovascularização de um tecido, órgão, ou neoplasma no sujeito.

Uma célula, cultura de células, tecidos ou órgãos podem contactar com uma composição que obstrui a endosialina expressa na superfície de uma célula, em que a dita obstrução inibe a interacção da referida célula com um ligando da endosialina e em que a inibição da referida interacção da referida célula com o ligando inibe a neovascularização da referida célula, cultura de células, tecido ou órgão.

A composição pode compreender, pelo menos, um inibidor competitivo aqui descrito. Os inibidores competitivos podem ser ligandos da endosialina, por exemplo, o colagénio, a fibronectina ou os seus fragmentos de ligação à endosialina. Inibidores competitivos preferidos são fragmentos de colagénio I, colagénio IV ou fibronectina. Os inibidores competitivos preferidos são os fragmentos de fibronectina de 70 kDa N-terminais, fragmentos de fibronectina de 45 kDa de ligação à gelatina e o fragmento de fibronectina de 30 kDa de ligação à heparina.

Em metodologias preferidas a composição pode compreender pelo menos um anticorpo que se liga especificamente à endosialina. Tais anticorpos têm preferencialmente uma afinidade para a endosialina que é menos do que cerca de 1×10^{-7} M, com maior preferência inferior a cerca de 1×10^{-8} M, menos do que 1×10^{-9} M e de preferência inferior a cerca 1×10^{-10} M. Os anticorpos que se ligam especificamente à endosialina podem incluir aqueles anticorpos cujas características estão aqui descritas e exemplificadas. Por exemplo, em alguns aspectos preferidos, o anticorpo que se liga especificamente à endosialina compreende uma cadeia pesada que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 da SEQ ID NO: 28, 30 e 32, respectivamente, e uma cadeia leve que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 das SEQ ID NO: 13,

15 e 17, respectivamente. As cadeias pesadas CDR1, CDR2 e CDR3 são codificadas por sequências de nucleótidos da SEQ ID NO: 27, 29 e 31, respectivamente. As cadeias leves CDR1, CDR2 e CDR3 são codificadas por sequências de nucleótidos da SEQ ID NO: 12, 14 e 16, respectivamente. Em algumas metodologias os anticorpos podem compreender uma cadeia pesada que compreende um domínio variável da SEQ ID NO: 34 e uma cadeia leve que compreende um domínio variável da SEQ ID NO: 19. O domínio variável da cadeia pesada é codificado pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 33. O domínio variável da cadeia leve é codificado pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 18. Em algumas metodologias os anticorpos podem compreender uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22 ou 26 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11. A cadeia pesada é codificada pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 21 ou 25 e a cadeia leve é codificada pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 10. Os anticorpos podem compreender uma cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 20 ou 24 e uma cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 9. Os anticorpos podem compreender uma cadeia pesada codificada pela sequência de ácidos nucleicos da SEQ ID NO: 8 ou 23. Os anticorpos podem compreender uma cadeia leve codificada pela sequência de ácidos nucleicos que compreende a SEQ ID NO: 7. As células produtoras de anticorpos que produzem anticorpos que podem ser utilizados de acordo com a invenção foram colocadas com a colecção de microorganismos Norte americana (*10801 University Blvd., Manassas, Virgínia 20110-2209*) em 24 Abril de 2006 e em 11 de Março de 2008 e foram atribuídos Números de Acesso: PTA-7554 e PTA-9017, respectivamente. Os anticorpos podem ser policlonais, monoclonais, fragmentos de ligação ao antigénio,

quiméricos, humanizados, totalmente humanos, e outros semelhantes, tal como aqui descrito.

A inibição da expressão de endosialina inibe a interacção de endosialina com qualquer ligando da endosialina. Ligandos da endosialina envolvidos nesta presente invenção são, por exemplo, fibronectina humana (SEQ ID NO: 35) e colagénio.

Agonistas e antagonistas da interacção da endosialina com um ligando da endosialina podem ser identificados. A identificação pode compreender o contacto da endosialina com um composto teste, o contacto do complexo endosialina-composto teste com um ligando da endosialina, e posterior medição, de forma quantificável, a interacção da endosialina com o ligando na presença e na ausência do composto teste. Um aumento ou diminuição no nível de interacção da endosialina com o ligando na presença do composto teste indica que o composto teste é um agonista ou antagonista, respectivamente, da interacção de endosialina com o ligando.

A identificação pode compreender o contacto de uma célula que expressa endosialina com um composto teste, o contacto da célula que expressa endosialina com um ligando da endosialina, e posterior medição, de forma quantificável, a expressão ou a activação de moléculas de integrina, tais como a integrina $\beta 1$, $\beta 2$ ou $\beta 3$ na célula na presença e na ausência do composto teste. Um aumento ou diminuição no nível de expressão ou activação das moléculas de integrina sob a célula, na presença do composto teste indica que o composto teste é um agonista ou antagonista, respectivamente, da interacção da endosialina com o referido ligando.

A identificação pode compreender o contacto de uma célula que expressa endosialina com um composto teste, o contacto da célula que expressa endosialina com um ligando da endosialina, posterior medição, de forma quantificável, da expressão ou da activação de *MMPs*, tais como MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP -9, MMP-12, MMP-13 ou MMP-18 sob a célula na presença e na ausência do composto teste. Um aumento ou diminuição no nível de expressão ou activação das moléculas MMP na célula na presença do composto teste indica que o composto teste é um agonista ou antagonista, respectivamente, da interacção da endosialina com o referido ligando.

Nos ensaios, a endosialina pode ligar-se a uma membrana celular, de preferência a uma membrana celular de mamífero, um fragmento de membrana celular, uma bicamada lipídica artificial ou a um suporte sólido adequado. O ligando da endosialina pode ser uma proteína da matriz extracelular, incluindo, sem limitação, fibronectina ou colagénio.

Uma estratégia para gerar compostos teste com uma actividade biológica potencial contra a endosialina ou células que expressam endosialina, *i.e.*, interacção potencial com endosialina, envolve, mas não está limitada, a bibliotecas de fagos de rastreio que produzem péptidos de revestimento de fago que podem ser rastreados para identificar os polipéptidos de uma biblioteca que pode servir potencialmente para inibir a interacção entre endosialina e um ligando da endosialina.

Os exemplos seguintes são fornecidos para descrever a invenção com maior detalhe. Eles destinam-se a ilustrar, não a limitar, a invenção.

Exemplo 1

Análise imuno-histoquímica da expressão da endosialina em tecido maligno

A utilização de anticorpos para detectar células que expressam endosialina foi demonstrada por imuno-histoquímica de tecidos malignos. O anticorpo anti-endosialina ou IgG normal foi aplicado a tecidos recém-congelados de cancro do colo-rectal humano em duas concentrações (0,5 µg/mL e 2,5 µg/mL). Salina tamponada com fosfato [PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,2)] + 1% de albumina de soro bovino serviu como diluente para os anticorpos primários. Os tecidos foram embebidos em *Tissue-Tek®* O.C.T. médio, congelados em gelo seco e armazenados em sacos de plástico hermeticamente fechados abaixo de -70°C. Os tecidos foram seccionados a aproximadamente 5 µm e fixados durante 10 minutos em acetona à temperatura ambiente. As lâminas foram guardadas abaixo de -70°C até à coloração. Pouco antes da coloração as lâminas foram fixadas por 10 segundos em 10% de formalina neutra tamponada.

Criocortes foram lavados duas vezes em solução de salina tamponada com fosfato (PBS [NaCl a 0,15 M, pH 7,2]). A peroxidase endógena foi bloqueada através da incubação das lâminas com a solução de peroxidase fornecida no *kit* *Dako EnVision™* durante 5 minutos e lavadas duas vezes com PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,2). Em seguida as lâminas foram tratadas com um bloco de proteínas concebido para reduzir ligações não específicas por 20 minutos. O bloco de proteínas foi preparado como se segue: PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,2); 0,5% de caseína, 1% de albumina de soro bovino (BSA); e 1,5% de soro de cabra normal. Seguindo o bloco de proteínas, o anticorpo primário

(artigo teste M4, anticorpo de controlo negativo, ou nenhum [apenas tampão como controlo do ensaio]) foi aplicado à temperatura ambiente durante uma hora. Em seguida as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,2), tratadas com o polímero anti-IgG com peroxidase marcada fornecido no *kit* *Dako EnVision™* durante 30 minutos (*EnVision™* utilizado na concentração fornecida pelo fabricante), lavadas duas vezes com PBS (NaCl 0,15 M, pH 7,2), e tratadas com a solução de substrato-cromogénio (DAB) fornecido no *kit* *Dako EnVision™* durante 8 minutos. Todas as lâminas foram lavadas em água, contrastadas com hematoxilina, desidratadas e cobertas com lamela para a interpretação. Como mostrado, os vasos do tumor (figura 1A) coraram positivo para a endosialina enquanto o anticorpo de controlo isótipo coraram negativo (figura 1B).

Exemplo 2

Análise imunohistoquímica da expressão de endosialina em tecidos saudáveis

A utilização de anticorpos para detectar células que expressam endosialina foi demonstrada por imuno-histoquímica de tecidos normais. Resumidamente, as amostras de tecidos normais foram seccionadas por crióstato e analisadas quanto à expressão da endosialina como descrito acima. Os tecidos normais que contêm muito poucos fibroblastos/células tipo dendríticas que expressam endosialina embora não de forma tão robusta ou homogénea como foi observado nos vasos dentro dos tumores (figuras 2A e B). Estas células são úteis para estudar os efeitos da neovascularização e podem ser isoladas para a expressão do gene para estudar os perfis de crescimento celular, diferenciação, migração ou identificação de

assinatura. Podem ser estudados *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*, utilizando métodos conhecidos pelos especialistas na área bem como os listados abaixo.

Exemplo 3

Isolamento e enriquecimento de células que expressam endosialina

Para demonstrar que as proteínas que se podem ligar à endosialina servem como uma forma eficaz para enriquecer o endotélio ou células que expressam endosialina semelhantes a fibroblastos, células endoteliais microvasculares humanas (HMVEC) foram *panned* utilizando um anticorpo que pode ligar-se à endosialina para isolar uma população enriquecida de células que expressam endosialina a partir de um *pool* de partida contendo 5-10% de células que expressam endosialina. Não querendo comprometer-se com o método ou reagentes especificados abaixo, este exemplo demonstra o uso de anticorpos de endosialina que podem isolar células que expressam endosialina.

Resumidamente, placas de 96 poços foram revestidas em condições estéreis com o anticorpo cabra anti IgG Fcγ humano. Em seguida, 20 µg/mL de um anticorpo M4 anti-endosialina humano foi adicionado às placas e três poços (A, B, C) como controlos sem o anticorpo e incubou-se durante 1 hora a 4°C. HMVEC foram colhidas a partir de 10 centímetros de culturas em placas de petri com DPBS/EDTA em vez de tripsina para evitar qualquer dano às membranas celulares, deixando assim as proteínas da endosialina da superfície celular intactas. As células de um *pool* foram plaqueadas em duas concentrações

diferentes, quer de 100,000 células/poço ou 50,000 células/poço em placas de 96 poços depois de se aspirar e lavar qualquer anticorpo anti-endosialina não ligado. As células foram incubadas em placas durante 1 hora a 4°C. As placas foram então lavadas com DPBS/FBS quatro vezes (até os poços de controlo A, B e C não apresentarem células dentro dos poços). A placa com 50,000 células/poço mostraram muito poucas células enquanto a placa com 100,000 células/poço continha um número de células que aderiram ao prato. As células foram então incubadas durante três dias em meio de crescimento adequado. Os poços de controlo B e C foram escolhidos a partir das placas com 100,000 células/poço para imunocoloração. Calceína, corante AM foi usado para corar as células para visualização utilizando um microscópio de fluorescência Nikon® Eclipse TS100. Culturas *panned* positivas foram expandidas para o crescimento e posterior análise de expressão homogénea de endosialina, tal como descrito abaixo.

Para determinar a capacidade de isolar as células que expressam endosialina, células HMVEC *panned* anticorpo anti-endosialina e culturas HMVEC não *panned* foram preparadas para a imunocoloração utilizando um anticorpo fluorescente anti-endosialina ou anticorpo fluorescente α - β 1-integrina como controlo. Tal como esperado mais de 90% das células coraram positivo para α - β 1-integrina de culturas *panned* e não *panned* (não mostrado), enquanto mais de 90% de células coraram positivo para endosialina de culturas *panned* enquanto apenas 5-7% de células coraram positivo para endosialina em culturas HMVEC não *panned*. Estes dados demonstram a capacidade para isolar e enriquecer células viáveis que expressam endosialina utilizam proteínas de ligação à endosialina como anticorpos.

Como mostrado na figura 3, a cultura *panned* tinha um número muito maior de células positivas de endosialina em comparação com a cultura parental não *panned* como determinado por imunocoloração via anticorpo anti-endosialina seguido de um anticorpo secundário conjugado fluorescente. O número de células de cada campo foi determinado por microscopia ótica.

Exemplo 4

Interação da endosialina com proteínas da matriz extracelular

Construção de plasmídeos de expressão TEM1 e Fc-TEM1: PCR foi utilizado para amplificar um fragmento de DNA representando os aminoácidos 1-685 do quadro de leitura de TEM1 (GenBank # AF279142) a partir de DNA genômico LA1-5S. Os produtos de amplificação resultantes foram digeridos com *EcoRI* e *XbaI* e ligados a pEF6-V5-hisa (*Invitrogen*). Para gerar Fc-TEM1, a região extracelular de TEM1 foi fundida com domínio IgG2_b Fcγ monomérico de murina e ligado ao vector derivado de pEF6-EK-Mm-IgG2_b-Fcγ-ND que contém uma região de reconhecimento da enteroquinase (DDDD) seguido por um domínio modificado de murina IgG2_b Fcγ (articulação (*hinge*) através CH₃). Para prevenir a dimerização os quatro resíduos de cisteína responsáveis pelas pontes de dissulfito entre cadeias pesadas foram alterados para serina. O monomérico resultante, proteína de fusão segregada consiste no domínio extracelular de TEM1 completo e murina IgG2_b Fcγ. A integridade de todas as sequências de plasmídeos foi verificada utilizando química Beckman® DTCS (Beckman Coulter, Fullerton, Califórnia). Os dados em bruto foram obtidos com um sequenciador de DNA, CEQ 8000, e analisados utilizando o software VectorNTI® (*Invitrogen*).

Purificação de Fc-TEM1: As células CHO-TEM1-Fc γ foram cultivadas em escala 25 L em meio IS-CHO-CD (*Irvine Scientific, Santa Ana, Califórnia*), suplementado com 2 mM de L-glutamina, 1X Penicilina/Estreptomicina, 6 g/L de hidrolisado de soja e 2,2 g/L de bicarbonato de sódio (*Irvine Scientific*) sob uma plataforma Wave20/50EH equipada com um Cellbag50 ® (*GE Healthcare, Piscataway, NJ*) até que a viabilidade da cultura atingiu 50-70%. Meio extracelular condicionado foi clarificado utilizando um piloto de bancada de sistema de fibra oca FlexStand® (*GE Healthcare*) equipado com um cartucho de fibra oca de 0,2 μ m (*GE Healthcare*) até 0,5 L de cultura permaneceu no vaso de retenção. Neste ponto, a massa celular concentrada foi lavada com 4 L de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 20 mM de K fosfato, 150 mM NaCl, pH 7,2), para recuperar o restante do fluido extracelular. A lavagem de 4 L foi agrupada com a matéria-prima clarificada. O meio de cultura clarificado foi então concentrado doze vezes (29 L a 2,5 L); usando um Prep/Scale® Spiral Wound 2,5 ft² 100 k situado numa Prep/Scale (*Millipore, Billerica, Massachusetts*) e accionado por uma bomba peristáltica a uma pressão de entrada de 20 PSI e a uma taxa de recirculação de cerca de 400 mL/min. A matéria-prima concentrada resultante foi esterilizada por filtração através de filtros de "gargalo de garrafa" equipados com uma membrana de 0,2 μ m (*Nalgene*). TEM1-Fc γ foi capturado pela cromatografia de afinidade da proteína A, sobre uma coluna de 10x100 mm ProSep-vA® (*Millipore*) e eluiu-se através da adição de 5 volumes de coluna de tampão de eluição (100 mM citrato/10 mM de acetato, pH 3,0). O material eluído foi dialisado contra tampão de QA (20 mM Tris-Cl, pH 8,0) e adicionalmente purificado por cromatografia de troca iónica ao longo de uma coluna 5 mL

HiTrap® Q-FF (GE Healthcare). As proteínas ligadas foram lavadas com 15 % tampão QB (20 mM Tris-Cl, 1 M de NaCl, pH 8,0) seguido de eluição do limite Fc-TEM1 utilizando 35% tampão QB. Proteínas eluídas foram concentradas por ultrafiltração em Modelo 8400 módulo de ultrafiltração a pressão positiva (Millipore) equipado com uma membrana de MWCO de 100 kDa (Millipore) para um volume final de cerca de 5 mL. Fc-TEM1 concentrado foi purificado por cromatografia preparativa de exclusão de tamanho numa coluna 26 x 60 *Sephacryl® S-300HR* (GE Healthcare) equilibrada com PBS. As fracções contendo Fc-TEM1 purificado foram reunidas, concentradas para um intervalo nominal entre 0,1-1 mg/mL por ultrafiltração utilizando uma membrana de 100 kDa MWCO e armazenado em alíquotas de uso único a -80°C.

Fc-TEM1 purificado (2,9 µg) foi carregado em de 4-12% Bis-Tris gel (*Invitrogen*) e sujeito a electroforese em tampão de corrida MOPS (50 mM de MOPS, Tris 50 mM, SDS 3,5 mM, 1 mM EDTA, pH 7,7) durante 40 minutos. Para a coloração o gel foi fixado durante 15 minutos com solução de fixar (50% de metanol, ácido acético a 10%) lavado duas vezes durante 10 minutos em água desionizada e corado durante pelo menos 1 hora usando corante azul coloidal de Coomassie (*Pierce*). O gel foi descorado por repetidas lavagens com água desionizada.

Fibronectina pré-revestida (FN), colagénio I (Col I), colagénio IV (Col IV), laminina (LN) (*BD Biosciences, San Diego Califórnia*), vitronectina (VN) ou gelatina (Gel) (*Chemicon Intl.*) placas de 96 poços foram utilizadas para avaliar a ligação de Fc-TEM1. A ligação de TEM1 a Col I, Col IV e FN não foi devida a rastrear os contaminantes da proteína purificada a partir de plasma humano uma vez que não foi

detectado nem Col I nem Col IV em FN pelo anticorpo anti-Col ELISA e não foi detectado FN em Col (dados não mostrados). Todas as placas foram bloqueadas com tampão de ensaio (0,5% BSA, 0,5 % Tween-20 em PBS) durante 2 h antes da adição de Fc-TEM1 da proteína de fusão, uma endosialina solúvel gerada por fusão da sequência de comando N-terminal e a totalidade do domínio extracelular da endosialina para uma cadeia pesada gama de murina. Seguiu-se 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas e o anticorpo HPR cabra anti-humano IgG (H+L) (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA*) foi adicionado durante 1h. O desenvolvimento da cor foi avaliado usando o substrato *SureBlue™* TMB Peroxidase (*KPL, Gaithersburg, MD*). Ambos BSA e um anticorpo de controlo isótipo humano foram utilizados como controlos negativos. Fc-TEM1 não se ligou a BSA nem o isótipo humano se ligou a qualquer uma das proteínas ECM (dados não mostrados).

Como mostrado na Figura 4A, Fc-TEM1 ligou-se à fibronectina e ao colagénio I e IV de um modo dependente da dose enquanto não foi observada ligação dentro de toda a gama de doses para LN ou VN. Curiosamente, embora Fc-TEM1 se tenha ligado ao colagénio, não foi observada uma ligação detectável à gelatina (colagénio desnaturado pelo calor). Nenhum dos quatro anticorpos de isótipo IgG de murina testados pode ligar-se a qualquer uma das proteínas *ECM*, excluindo a possibilidade de que as interacções eram mediadas pela cadeia molecular principal de Fc de murina da proteína de fusão de Fc-TEM1 (dados não mostrados). Uma proteína de fusão que contém a cadeia pesada gama de murina e apenas o domínio de lectina da endosialina também se liga a FN (dados não mostrados).

Para confirmar a selectividade da interacção de proteínas Fc-TEM1 e ECM, Fc-TEM1 foi aplicado a placas de ELISA revestidas com diferentes proteínas purificadas. ELISAs específicas para antigénio foram realizados revestindo placas de *TP Immunomini ELISA* com 1 µg/mL STEB (vacina *Staphylococcus enterotoxina B*), 2 µg/mL de globulina gama de bovino, 2 µg/mL antigénio glicoproteína de 90 kD associada a tumor expresso na maioria das células de melanoma (TA90), 2 µg/mL de lisozima de ovo de galinha, diluição 1:500 de toxóide de tétano, 1% BSA, 0,2 µg/mL de mesotelina humana, 2 µg/mL de ovalbumina (OVA), 1 µg/mL de GM-CSF humano, 2 µg/mL de IgG de cabra, 2 µg/mL de IgG de rato dissolvido em tampão de revestimento de bicarbonato (pH 9,6) (*Sigma*) durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (contendo 0,5% de Tween-20) bloqueada com 1 × tampão de ensaio durante 2 horas à temperatura ambiente e ELISA foi realizado como descrito acima. Como mostrado na figura 4B, Fc-TEM1 não se ligaram a qualquer uma das proteínas testadas, excepto para Fc anti-rato utilizados como um controlo positivo.

Exemplo 5

Inibição da ligação de TEM1 a Fibronectina do plasma humano

Placas de 96 poços foram pré-revestidas com fibronectina (FN) e a capacidade de anticorpos anti-TEM1 bloquearem a adesão mediada por Fc-TEM1 foi avaliada por ELISA. Resumidamente, a placa revestida com FN foi bloqueada com tampão de ensaio (0,5 % BSA, 0,5% Tween-20 em PBS) durante 2h antes da adição de proteínas de fusão. Fc-TEM1 foi pré-incubada durante 1 hora a 4°C com anticorpos M4 (um anticorpo anti-endosialina humanizado descrito como ES1 na Patente dos EUA, número da

publicação: 20060239911), isótipo humano (HuIgG), ou anticorpo anti-TEM1 criado em coelhos (RbtTEM1). M4 não se liga a espécies homólogas de endosialina com a excepção dos primatas não humanos. O epitopo de ligação para M4 foi mapeado para o domínio extracelular de lectina da endosialina. O complexo proteína/anticorpo foi adicionado à placa revestida com FN e deixou-se a aderir durante 1h à temperatura ambiente, altura em que as placas foram lavadas e o anticorpo HRP cabra anti-IgG humano (H+L) (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA*) foi adicionado durante 1h. O desenvolvimento da cor foi avaliado usando o substrato *SureBlue™* TMB peroxidase (*KPL, Gaithersburg, MD*). Como mostrado na figura 6, M4 suprimiu a ligação de Fc-TEM1 à fibronectina, ao passo que, um controlo não específico (*HuIgG*) não suprimiu a ligação. RbtTEM1 também suprimiu a ligação de Fc-TEM1 à fibronectina (dados não mostrados).

Exemplo 6

Endosialina medeia a adesão a fibronectina

As células CHO-TEM1 que expressam estavelmente endosialina (verificada por FACS com anticorpo M4; dados não mostrados) foram geradas. As células CHO-K1 foram mantidas em RPMI suplementado com L-glutamina, 1% mínimo de aminoácidos essenciais, piruvato de sódio, aminoácidos não-essenciais e 10% de FBS inactivado pelo calor (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). As células CHO-K1 (3E6) (*ATCC, Manassas, VA*) foram electroporadas com 10 µg de DNA linearizado de plasmídeo numa cuvete de electroporação 0,4 milímetros. Um pulso de 170V/1000 µF foi entregue usando um *Gene Pulser* (*BioRad, Hercules, CA*). As células electroporadas foram deixadas a recuperar durante

24 horas depois de clones resistentes de blasticidina (5 µg/mL) foram seleccionados. A expressão de endosialina foi verificada por FACS e as células foram classificadas para expressão elevada.

As células ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram lavadas e suspensas em PBS contendo Mg^{2+} / Ca^{2+} e adicionadas em quadruplicado a uma placa de 96 poços revestida com fibronectina e deixou-se aderir durante 1 hora. Onde indicado, as células foram pré-incubadas com anticorpo M4 (100 µg/mL) ou isótipo humano (IgG) durante 1h antes do início dos ensaios. Depois das células serem deixadas a aderir a placa foi lavada 5 vezes com PBS e a viabilidade foi medida utilizando *CellTiter-Glo®* (Promega, Madison, WI). A figura 9B mostra que a sobre-expressão dos resultados da endosialina num aumento da ligação celular à fibronectina pode ser bloqueada por inibidores de endosialina, como o anticorpo M4, em contraste com os controlos não-específicos, tal como IgG.

Exemplo 7

A ligação de endosialina a fibronectina e a fragmentos de fibronectina

A fibronectina é um grande complexo de glicoproteína que existe como um dímero covalentemente ligado por uma ponte de dissulfito na extremidade C-terminal da proteína (Ruoslahti et al. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:7277-7281; Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer (2003) *J. Cell Sci.*, 116:3269-3276; Magnusson & Mosher (1998) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18:1363-1370). Fragmentos de fibronectina, tanto derivados da degradação enzimática como de *splicing* alternativo, têm sido

relatados para serem associados com certos estados de doença e possuem funções biológicas distintas (Magnusson & Mosher (1998) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18:1363-1370; Labat-Robert (2002) *Semin. Cancer Biol.*, 12:187-195; Homandberg (1999) *Front Biosci.*, 4:D713-730).

A capacidade de Fc-TEM1 para se ligar a diferentes fragmentos de fibronectina foi avaliada. Quantidades equimolares de proteínas foram diluídas em tampão de revestimento (50 mM de carbonato-bicarbonato, pH 9,4), adicionadas a uma placa de ELISA (*Greiner Bio-one, Monroe, NC*) e foram incubadas durante a noite a 4°C. Todas as placas foram bloqueadas com doseamento tampão (0,5% de BSA, 0,5 % Tween-20 em PBS) durante 2 h antes da adição de Fc-TEM1. Seguiu-se 1 hora de incubação à temperatura ambiente e as placas foram lavadas e o anticorpo HRP cabra anti-IgG humano (H+L) (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA*) foi adicionado durante 1 h. O desenvolvimento da cor foi avaliado usando o substrato *SureBlue™* TMB peroxidase (*KPL, Gaithersburg, MD*). Para avaliar a integridade das proteínas revestidas a fibronectina o anticorpo policlonal de coelho dirigido contra a fibronectina (FN Ab) foi utilizado para detectar que todos os fragmentos FN foram reconhecidos e revestidos uniformemente.

A fibronectina purificada de comprimento total presente no plasma humano e fragmentos FN de 120 kDa de fixação às células foram adquiridos da *Chemicon Intl.* (Temucula, Califórnia), fragmentos proteolíticos de 30 kDa, 45 kDa e 70 kDa da *Sigma* (St. Louis, Missouri) e os fragmentos de fibronectina humana recombinante 2 e 4 (FN2 e FN4, respectivamente) a partir de *R&D Systems* (Minneapolis, MN).

Como mostrado na figura 7A, Fc-TEM1 liga-se ao fragmento N-terminal de 70 kDa de FN e aos seus produtos de clivagem proteolítica (45 kDa e 30 kDa, fragmentos). A extensão da ligação variou entre os diferentes fragmentos e foi inferior à observada com FN de comprimento total. Em contraste, Fc-TEM1 não se ligou ao fragmento de FN de 120 kDa FN ou aos fragmentos recombinantes Fn2 ou Fn4. Esta falta de ligação era improvável devido ao revestimento irregular ou degradação uma vez que todos os fragmentos FN foram fortemente detectados por um anticorpo policlonal anti-FN. Esta é uma prova de que o domínio de FN está envolvido na interacção com resíduos de endosialina no interior da porção N-terminal de 70 kDa. Para determinar se a capacidade de ligação reduzida mediante a digestão do fragmento de 70 kDa indica que Fc-TEM1 liga-se a uma região localizada em estreita proximidade com o local de clivagem proteolítica ou que TEM1 reconhece epitopos dependentes da conformação dentro do terminal amino de FN, que é alterado depois da digestão, a capacidade de Fc-TEM1 para ligar formas reduzidas de proteínas FN foi examinada. Enquanto o anticorpo anti-FN foi capaz de reconhecer FN reduzida, indicando revestimento equivalente, a ligação de Fc-TEM1 foi completamente excisada como mostrado na figura 7B. Semelhante a toda a FN, o anticorpo anti-endosialina M4 bloqueou a ligação de Fc-TEM1 ao fragmento de 70 kDa de uma maneira dose-dependente (figura 7C) enquanto um anticorpo de controlo de isótipo não teve efeito (figura 7D). Estes resultados indicam que Fc-TEM1 reconhece epitopos dependentes da conformação que se encontrem no terminal amino da FN que pode ser afectada com a continuação da degradação proteolítica.

Exemplo 8

Associação de fibronectina da superfície celular com endosialina

As células CHO-TEM1 que expressam estavelmente endosialina (verificada por FACS com anticorpo M4; dados não mostrados) foram geradas. As células CHO-K1 foram mantidas em RPMI suplementado com L-glutamina, 1% mínimo de aminoácidos essenciais, piruvato de sódio, aminoácidos não-essenciais e 10% de FBS inactivado pelo calor (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). As células CHO-K1 (3E6) (*ATCC, Manassas, VA*) foram electroporadas com 10 µg de DNA linearizado de plasmídeo numa cuvete de electroporação 0,4 milímetros. Um pulso de 170V/1000 µF foi entregue usando um *Gene Pulser (BioRad, Hercules, CA)*. As células electroporadas foram deixadas a recuperar durante 24 horas depois de clones resistentes a blasticidina (5 µg/mL) foram seleccionados. A expressão de endosialina foi verificada por FACS e as células foram classificadas para expressão elevada.

O nível de FN da superfície celular foi analisado por citometria de fluxo em células CHO-K1 e CHO-TEM1 parentais utilizando um anticorpo policlonal anti-FN. As células foram colhidas em tampão de dissociação celular (*Invitrogen, Carlsbad, CA*), lavadas e ressuspensas em PBS gelado + 1% de FBS. As células foram incubadas durante 1 hora em gelo com o anticorpo primário, M4 (10 µg/mL), lavado e incubado com anticorpo secundário FITC-conjugado cabra anti-humano (*Southern Biotech, Birmingham, AL*) e analisadas num citômetro de fluxo *EASYSYTE (Guava Technologies, Hayward, CA)*. Níveis mais elevados 15-20% de FN da superfície em células CHO-TEM1 em comparação com as células CHO-K1 foram observados

constantemente (dados não mostrados). A associação de FN da superfície celular com endosialina foi examinada.

Utilizando um anticorpo anti-FN a FN foi imunoprecipitada a partir de ambos os lisados CHO-K1 e CHO-TEM1, seguido por *Western blot* utilizando o mesmo anticorpo ou um anticorpo anti-TEM1 (M4). As células (10E7) foram lisadas em tampão de radioimunoprecipitação (RIPA) (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1% de NP-40, 0,5% desoxicolato de sódio, NaCl 150 mM, dodecilsulfato de sódio a 0,1% [SDS]) suplementado com cocktail inibidor completo de mini proteases (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) e centrifugado a 13,000 rpm durante 15 min para remover os detritos. Proteína G-Sepharose 6 Fast Flow Beads (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) foram lavadas três vezes com PBS e o anticorpo anti-FN (1 µg) foi capturado por agitação suave a 4°C. Quantidades iguais de proteína por amostra foram pré-limpas por meio da adição de proteína G não ligada. Após 2 horas de incubação, a proteína G foi removida e o sobrenadante foi adicionado ao complexo anticorpo-Sepharose e incubado durante a noite a 4°C. Após lavagem extensiva com tampão RIPA, a proteína ligada foi removida por ebulição durante 10 minutos em tampão amostra NuPAGE® LDS (Invitrogen) contendo 5% β-mercaptoetanol. As proteínas foram separadas através de electroforese em gel SDS-poliacrilamida a gel Bis-Tris 4-12% (Invitrogen) e transferidas para membrana de PVDF. A imunotransferência foi realizada usando anticorpos policlonais de coelho específicos para a fibronectina (Abcam, Cambridge, MA) ou endosialina (Morphotek, Inc., Exton, PA) detectados com um anticorpo HRP-conjugado de cabra anti-coelho e visualizada utilizando Substrato Quimioluminescente Supersignal West Pico (Pierce, Rockford, IL). A integridade e a pureza de Fc-TEM1 solúvel foram também monitorizadas por *Western blot*. Proteína

(5 µg) foi levada à ebulição durante 5 min em 4 × tampão amostra *NuPAGE LDS* (Invitrogen) contendo 5% β-mercaptoetanol submetido a electroforese num gel *NuPAGE 4-12% Bis-Tris* (Invitrogen) e transferidas para membrana de PVDF e imunotransferência foi realizada como descrito acima.

Verificou-se que FN pode imunoprecipitar endosialina a partir de lisados de CHO-TEM1 (dados não mostrados). Em contraste, em lisados celulares imunoprecipitados com IgG normal que não precipitaram FN não se detectou endosialina (dados não mostrados). Pelo menos duas abordagens diferentes (ELISA e co-immunoprecipitação) fornecem forte evidência de FN e interacção de endosialina. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando células HEK-293T expressando ectopicamente endosialina (dados não mostrados).

Exemplo 9

Células que expressam endosialina cultivadas em Matrigel formam estruturas tipo teia

Enquanto não foram observadas diferenças no crescimento ou sobrevivência entre células parentais CHO-K1 e CHO-TEM1 cultivadas em superfície plástica, uma morfologia drasticamente diferente foi observada quando estas células foram cultivadas em Matrigel. As células CHO-K1 parentais cresceram em aglomerados de células isolados com saliências mínimas após 2 dias de cultura (figura 8, painéis superiores), enquanto as células CHO-TEM1 cresceram em aglomerados formando uma rede de teia semelhante (figura 8, painel inferior esquerdo). Além disso, células CHO-TEM1 dentro do aglomerado exibiu perturberâncias alcançando outros aglomerados (Figura

8, painel inferior direito). Ao longo do tempo, as células CHO-TEM1 mas não as células CHO-K1 aproximaram-se umas das outras para formar agregados maiores (dados não mostrados).

Exemplo 10

A expressão de endosialina aumenta a adesão celular a fibronectina e aos 70 kD ou 30 kD N-Terminal de fibronectina

Para avaliar a aderência aos fragmentos FN, quantidades equimolares de fragmentos de proteína foram pré-revestidas durante a noite e, em seguida, bloqueadas durante 2 h com PBS contendo 10 mg/mL de BSA. Matrigel serviu como controle positivo. As células CHO-K1 ou CHO-TEM1 ($1,5 \times 10^5$ células/poço) colhidas em tampão de dissociação celular foram lavadas e suspensas em PBS contendo Mg^{2+}/Ca^{2+} e adicionadas em quadruplicado a um Kit da adesão celular (Millipore) ou plaqueadas em placas individuais revestidas com FN, LN, Gel e Col I (BD Biosciences) e deixou-se aderir durante 1 h. Após a incubação, cada poço foi lavado 5 vezes com PBS e a viabilidade foi medida utilizando *CellTiter-Glo*®. Onde indicado, as células foram pré-incubadas com anticorpo durante 1 hora antes do início do ensaio. Como mostrado na figura 9A, o número de células CHO-TEM1 aderentes foi 6 vezes maior do que o número de células CHO-K1 parentais em poços revestidos com FN. Não foram observadas diferenças significativas na adesão entre CHO-K1 e CHO-TEM1 em superfícies revestidas com laminina ou vitronectina, enquanto que, a adesão aos colagénios e tenascina era demasiado fraca para avaliar as diferenças de valor (figura 9A). O pré-tratamento das células CHO-TEM1 com anticorpo M4 resultou na redução de 50% da adesão celular TEM1-FN-dependente, ao passo que, o anticorpo de

controle IgG não teve efeito (figura 9B). Tratamento com o anticorpo M4 não afectou FN-dependente, adesão celular independente de endosialina (adesão de referência) de células CHO-K1 parentais.

As placas foram pré-revestidas com quantidades equimolares de FN completa, fragmentos proteolíticos de FN e Matrigel. As células CHO-TEM1 mostraram um aumento 3 a 5 vezes maior de adesão a FN, fragmentos de 70 kDa e 30 kDa, em comparação com as células CHO-K1 parentais, enquanto nenhuma adesão significativa foi observada a fragmentos 45 kDa ou fragmentos FN2. As células CHO-TEM1 ligam-se a Matrigel cinco vezes melhor do que as células CHO-K1 (figura 9C). Estes dados indicam que a endosialina aumenta a adesão das células a matrizes extracelulares e que o N-terminal de FN está envolvido nestas interacções.

Exemplo 11

Endosialina liga-se Colagénio I e M4 inibe essa ligação

Uma placa de 96 poços pré-revestida com colagénio I foi utilizada para avaliar a capacidade de M4 para bloquear a ligação de Fc-TEM1. A placa foi bloqueada com tampão de ensaio (0,5% BSA, 0,5% Tween-20 em PBS) durante 2 h antes da adição de proteína na concentração indicada ($\mu\text{g/mL}$). Fc-TEM1 foi pré-incubada durante 1h a 4°C com os anticorpos M4 ou isótipo humano (IgG humano). O complexo proteína/anticorpo foi então adicionado à placa de Col I revestida e deixou-se a aderir durante 1 h à temperatura ambiente, altura em que as placas foram lavadas e o anticorpo HRP de cabra anti-IgG humano (H+L) (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA*) foi

adicionado durante 1h. O desenvolvimento da cor foi avaliado usando o substrato *SureBlue™* TMB peroxidase (KPL, Gaithersburg, MD). Como mostrado na figura 10, a sobre-expressão da endosialina resulta num aumento de ligação celular a Col I que pode ser bloqueada por inibidores da endosialina tal como M4, em contraste com os controlos tal como IgG não específico. RbtTEM1 também suprimiu a ligação de Fc-TEM1 para Col I (dados não mostrados).

Exemplo 12

Endosialina aumenta a adesão celular ao colagénio

As células CHO-K1 ou CHO-TEM1 ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram lavadas e suspensas em PBS contendo Mg^{2+}/Ca^{2+} e adicionadas em quadruplicado a uma placa de 96 poços revestidos com colagénio I e deixadas a aderir durante os tempos indicados. Depois das células terem sido deixadas a aderir a placa foi lavada 5 vezes com PBS e a viabilidade foi medida utilizando *CellTiter-Glo®*. Como mostrado na figura 11 a sobre-expressão de endosialina resulta num aumento da ligação da célula a Colagénio I.

Exemplo 13

Ensaio de migração celular

O sistema *BD BioCoat™* para invasão tumoral (*BD Bioscience*) e fibronectina humana inserida em culturas de células (*BD Bioscience*) foram utilizados para avaliar a migração celular mediada por TEM1. As células foram recolhidas com um tampão de dissociação de células não enzimático e diluídas para uma

concentração de 4E5 células/mL em média de crescimento, suplementado com 2% de soro fetal de bovino (*FBS*) e 500 µL de suspensão celular foi adicionado à câmara de topo do inserto de membrana. Para criar um gradiente foi adicionado um meio de crescimento contendo 20% de *FBS* foi adicionado à câmara do fundo. As células foram incubadas durante 48 horas, após esse tempo a inserção foi removida e as células que migraram através da membrana revestida foram contadas utilizando *CellTiter-Glo* (*Promega*). As células foram pré-tratadas com o anticorpo como indicado na descrição da figura 12 e a migração foi avaliada na presença contínua de anticorpos. Para examinar a formação de túbulos em Matrigel as células (células 8E4/poço) foram adicionadas a uma placa de 96 poços revestidos com Matrigel (*BD Bioscience*), incubada durante a noite e fotografada com a ampliação de 200-400x.

Como mostrado na Figura 12A, as células CHO-K1 exibiram migração celular modesta, ao passo que, as células CHO-TEM1 apresentaram uma migração 10 vezes superior. Tratamento com anticorpo M4, mas não com controlo IgG, aboliu a migração de células CHO-TEM1. Resultados semelhantes foram observados em experimentos de migração que utilizaram câmaras transpoço revestidas com FN (figura 12B).

Exemplo 14

Endosialina aumenta a actividade de MMP-9

Endosialina, MMP-2 e Col IV mostraram co-localização em áreas de tecidos caracterizadas por saliências em forma de dedo de processos angiogénicos precoces (Virgintino *et al.* (2007) *Angiogenesis*, 10:35-45). Para avaliar a actividade de MMP as

células foram semeadas numa placa de 6 poços e privadas de soro durante 48 h. O sobrenadante da cultura foi recolhido e clarificado por centrifugação (13,000 rpm, 15 min.) a 4°C para remover todos os detritos. Quantidades iguais de proteína foram submetidas a zimografia de gelatina e caseína sob condições não redutoras (*Invitrogen*) de acordo com o protocolo do fabricante. Os controlos positivos de MMP-2 humana e MMP-9 (*Chemicon, International*) foram utilizados para indicar a migração de MMP-2 e MMP-9 e utilizado como referência para os sobrenadantes de CHO-K1 e CHO-TEM1. Como mostrado na figura 13 a actividade de MMP-9 foi significativamente aumentada em células CHO-TEM1 em comparação com as células CHO-K1 parentais. O reforço da actividade de MMP-9 está correlacionado com o aumento da secreção da proteína MMP-9 no sobrenadante de células CHO-TEM1 como medido por ELISA específico da MMP (dados não mostrados). Estes dados indicam que a indução da secreção de MMP-9 contribui para a capacidade de migração melhorada de células CHO-TEM1 através de Matrigel e de transpoços revestidos com FN aqui demonstrado.

Exemplo 15

Endosialina aumenta a actividade da β -integrina

As integrinas (e.g., $\alpha 4\beta$, $\alpha 5\beta$) são receptores bem caracterizados que medeiam a adesão celular dependente de FN (Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer 2003; Magnusson & Mosher, 1998). Além disso, um receptor celular não identificado foi funcionalmente descrito que se liga à região de 70 kDa N-terminal de FN (McKeown Longo-& Mosher (1983) *J. Cell Biol.*, 97:466-472) e é necessário para expor o local de ligação crítico da integrina (ponto RGD) de FN solúvel

envolvido com as interacções integrina-FN e FN-FN (Tomasini-Johansson *et al.* (2006) *Matrix Biol.*, 25:282-293; McKeown Longo-& Mosher (1985) *J. Cell Biol.*, 100:364-374). A endosialina é aqui identificada como um novo receptor que interage com a região N-terminal de 70 kDa de FN e melhora a adesão celular dependente de FN. O melhoramento da ligação de FN medido nesses sistemas celulares *in vitro* pode ser o resultado de uma interacção sequencial com endosialina e integrinas.

Células humanas embrionárias de rim 293 (HEK293) foram transfectadas com um vector que expressa endosialina ou *cDNA* simulado. As células confirmaram expressar endosialina da superfície celular (293TEM1) enquanto aquelas transfectadas com o simulado (293T) não o fizeram. As células foram testadas para a capacidade de regular a expressão e a actividade de integrina na presença do anticorpo M4. A figura 14B mostra que a sobre-expressão da endosialina resulta num aumento da actividade da integrina $\beta 1$ em relação às células de controlo. A figura 14A mostra que a expressão de integrina $\beta 1$ da superfície celular não foi alterada. O tratamento de células com o inibidor de endosialina M4 resultou na supressão da actividade de integrina enquanto nenhum efeito sobre os níveis da superfície celular foi observado (figura 14B). Embora não desejando ficar ligado a qualquer teoria, a interacção entre a endosialina e o fragmento N-terminal de 70 kDa de FN solúvel pode ser responsável por iniciar a montagem de FN numa forma de elevada afinidade multimérica capaz de ligar integrinas.

Exemplo 16

M4.1 reconhece TEM1 humana não reduzida mas não TEM1 de murina

Células CHO-TEM1, células 2H11 de rato, células CHO-K1 parentais, as células NS0 de rato e células MS1 de rato foram cultivadas em RPMI 1640 completo (RPMI1640; piruvato de sódio; aminoácidos não essenciais; L-glutamina e FBS; Invitrogen Corp.). Pericitos primários humanos foram cultivados em meio de pericitos (500 mL de meio basal (Cat #1201), 10 mL (2%) de soro fetal bovino (FBS, Cat Nr: 0025), 5 mL de suplemento de crescimento de pericitos (PGS, Cat Nr: 1252) e 5 mL de solução de penicilina/estreptomicina (P/S, Cat Nr: 0503); Invitrogen Corp.). As células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂ numa incubadora humidificada. As células foram deixadas a aderir com TrypLE™ Select (Invitrogen Corp., catálogo nr: 12563-011) foram lavadas e contadas. As células foram lisadas em 2×10^7 células em tampão de lise RIPA contendo inibidores de proteases e incubados em gelo durante 10 minutos. O material insolúvel foi sedimentado a 10,000xG durante 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos. As alíquotas foram misturadas com um volume igual de 2 vezes tampão de carregamento de proteína com ou sem 10% de 2-mercaptoetanol (agente de redução). 15 µl ($1,5 \times 10^5$ células) de lisado foram carregados para um poço de 15 poços 4-12% Bis/Tris SDS-PAGE gel e sujeito a electroforese durante 30 minutos a 200V em tampão de corrida MES. Fez-se o *electroblotting* do gel para PVDF e depois bloqueou-se durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação em 5% de leite-TBST (5% M-TBST). Manchas de M4.1 foram sondadas com M4.1 em 5% M-TBST a 3,3 µg/mL durante a noite a 4°C.

Anticorpos policlonais anti-TEM1 transferidos foram sondados com uma diluição de 1:300 (4,5 mg/mL, Nr de Lote: NB487-76) de anticorpo em 5% M-TBST durante a noite a 4°C. O anticorpo

M4.1, como o anticorpo M4, é um anticorpo humanizado para a endosialina humana. As membranas foram lavadas 5 vezes durante 5 minutos cada com 30 mL de TBST à temperatura ambiente. HRP conjugado cabra anti-IgG humano (H+L) (*Jackson Immuno*, 1 mg/mL de *stock*) foi diluído 1:20,000 em 5% M-TBST como um anticorpo secundário para sondar os transferidos de M4.1 durante 30 minutos à temperatura ambiente. Anticorpo secundário HRP conjugado cabra anti-coelho (H+L) foi usado para manchar os policlonais anti-TEM1 durante 30 minutos à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 5 vezes durante 5 minutos cada, com 30 mL de TBST à temperatura ambiente. O sinal foi detectado por quimioluminescência utilizando o sistema de detecção de mancha *Western Femto* (*Pierce*) de acordo com o manual.

Tal como ilustrado na figura 15, M4.1 reconhece TEM1 humano não reduzido em células CHO-TEM1 e células de pericitos primários humanos mas não TEM1 de murina (SEQ ID NO: 2) em células 2S11 de rato (figura 15). Policlonal de coelho contra TEM1 humano (rabPAb TEM1) reconhece TEM1 humano em células CHO-TEM1 e pericitos humanos mas também em células TEM1 de murina em células 2S11 de rato. Nem M4.1 nem rabPAb TEM1 reagiram contra lisados de células *CHO-K1* parentais ou células de rato NS0 e células MS1 devido à falta de expressão de TEM1 nestas células. Apenas rabPAb TEM1 reagiu com TEM1 humano reduzido ainda que em menor extensão quando comparado com TEM1 não reduzido.

A presente invenção não está limitada às metodologias descritas e exemplificadas acima, mas é susceptível de variações e modificações dentro do âmbito das reivindicações anexas.

Lista de Sequências

<110> Morphotek, Inc.
 Zhou, Yuhong
 Tomkowiak, Brian
 Grasso, Luigi
 Nicolaides, Nicholas
 Sasa, Philip M.

<120> MÉTODOS PARA INIBIR A LIGAÇÃO DA ENDOSIALINA A LIGANDOS

<130> MOR-0727

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

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

<160> 35

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 2660
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 1
 gtcaagagca ggggcaggcc cgagccgggc cagtcggggg gcgtcgcat gctgctggc 60
 ctgctgctgg cctgggtggc cgggtgccc gcactgggc aggtccctg gacgcggag 120
 cctcgagccg cgtgcggccc cagcagctgc tacgcgtct ttcctcggcg ccgcacattc 180
 ctggaagctt ggggggctg ccgcgaattg gggggcaacc tggccacacc ggggacccca 240
 gaggaggccc agcgtgtgga cagcctggg ggggtcggc cggccaacgg gctgctatgg 300
 attgggttgc agcggcagc taggcaatgc cagccgcagc gccactgcg gggcttcata 360
 tggaccacgg gagaccagga caccgccttc accaactggg ccagccggc tacggaagga 420
 cctgcccag ccagcgctg tgcagcctt gaggccagc gagagcatcg ctggctcgaa 480
 ggctcgtgca cactggctgt cgatggctac ctctgccagt ttggttttga gggtgctgc 540
 cctgccttgc cgcttgaggt gggtcaggcc ggtcccctg tctacaccac acccttcac 600
 ctggtttcca gcgagttcga atggctgccc ttgggtccg tggcagctgt gcagtgcac 660
 gctggcaggg gagcttctct gctgtgctg aaacagcctt caggtggctt gggctggctc 720
 cagactggcc cgctgtgccc agggactggc tgtggctctg acaatggggg ttgcgaacat 780
 gagtgtgtgg aagaggttga cggctctgtg tctgcccgt gcagtgaagg cttcagctca 840
 gcagcagatg ggcacagttg tgaagacccc tgtgccagg cccctgtga gcagcagctg 900
 gaacctggag ggcacacagg ctatagctgc cactgtccc ttggcttcog gccagctgag 960

gatgatccac accgctgcgt ggacacggat gagtgccaga ttgctggtgt gtgccagrag 1020
atgtgtgtca actatgttgg tggttttgag tgttactgca gggagggtca cgagettgag 1080
gcagatggtg tcagctgtag ccctgcagga gccatgggtg occaggcttc ccaggatctc 1140
agagatgagt tgctggatga tggagaagaa ggggaggatg aagaggagcc ctgggaggac 1200
tttgatggca cctggacaga ggaacagggg atcctatggc tggcacctac acatccacct 1260
gactttggcc tgccttatag gcccaacttc ccacaggatg gagagcctca gagattgcac 1320
ctggagccta cctggccacc cccacttagt gcccraggg gccctacca ctctcagtg 1380
gtgtctgcca cagggcccat ggtgatctct gccactcgac ccacactacc ttctgccac 1440
aagacotctg ttatttcagc tacacgcca cccctgagcc ctgtccccc acctgccatg 1500
gcccctgcca caccctcagc tgtgttctct gaggaccaga tccccaaat caaggccaat 1560
tatccagacc tgccttttgg ccacaagcct gggataacct cggccactca cccagcacgg 1620
tctctccgt accagccccc cattatctca accaactatc cccaagtctt cctcccccac 1680
caggccctca tgtctccaga taccacact atcaattatt tgcctccagt ccccccctac 1740
cttgatcctg gggataccac ttctaaagcc catcaacacc ctltgctcc agatgctcca 1800
ggtatcagaa cccaggcccc ccagctttct gtctcagctc tccagccccc tcttctacc 1860
aactccaggt ctctctgcca tgaacctct gtgcctgctg ccaaccagcc cccagccttc 1920
ccttcttctc cctccccc tcagaggccc actaaccaga cctcatctat cagccctaca 1980
cattctatt ccagagcccc tctagtccca agggaaggag ttccagctc caaatcagtg 2040
ccacagctgc cctcggtgcc ctccacagca gctccacag cctggcaga gtcaggtctt 2100
gcaggccaaa gccaaaggga tgaccgctgg ctgctggtgg cactcctggt gccacatgt 2160
gtcttcttgg tggctgctgt tgcctgggc attgtgtact gcactcgtg tggctccac 2220
gcacccaaca agcggatcac ggactgctat cgtgggtca cactgctgg gaacaagagc 2280
tcacagaaac ccattgcccc cagaggcagc cttaacaggg tacagacctg tagaaccagt 2340
gtgtgatggg gtgcagatgc cctttgtgg gatagaagaa aaggacttgc tttagacaca 2400
tggctgagac cacaccaagg acttatgggg gctgcccagc tgacagagga ggttctgttc 2460
tttgagccca gcattccatg caaaggacac accaggactc caggacctca aggggtgggt 2520
gctgggatct tctccataa atggggtgcr aacctcccc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2580
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2640
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2660

<210> 2
<211> 765

<212> PRT

<213> Mos musculus

<400> 2

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

Gli Gln Val Pro Trp Tre Pro Glu Pro Arg Ala Ala Cys Gli Pro Ser
20 25 30

Ser Cys Tir Ala Leu Fen Pro Arg Arg Arg Tre Fen Leu Glu Ala Trp
35 40 45

Arg Ala Cys Arg Glu Leu Gli Gli Asn Leu Ala Tre Pro Arg Tre Pro
55 60

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

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

Gln Arg Pro Leu Arg Gli Fen Ile Trp Tre Tre Gli Asp Gln Asp Tre
100 105 110

Ala Fen Tre Asn Trp Ala Gln Pro Ala Tre Glu Gli Pro Cys Pro Ala
115 120 125

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

Gli Ser Cys Tre Leu Ala Val Asp Gli Tir Leu Cys Gln Fen Gli Fen
145 150 155 160

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

Ala Val Tir Tre Tre Pro Fen Asn Leu Val Ser Ser Glu Fen Glu Trp
180 185 190

Leu Pro Fen Gli Ser Val Ala Ala Val Gln Cys Gln Ala Gli Arg Gli
195 200 205

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

Gln Trp Glu Pro Leu Cys Pro Glu Trp Glu Cys Glu Pro Asp Asn Glu
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp His Pro Pro Asp Phe Glu Leu Pro Tyr Arg Pro Asn Phe Pro Gln
405 410 415

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

Leu Ser Ala Pro Arg Glu Pro Tyr His Ser Ser Val Val Ser Ala Trp
435 440 445

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

Lys Trp Ser Val Ile Ser Ala Trp Arg Pro Pro Leu Ser Pro Val His

465		470		475		480
Pro Pro Ala Met	Ala Pro Ala Tre	Pro Pro Ala Val	Fen Ser Glu His			
	485	490	495			
Gln Ile Pro Lis	Ile Lis Ala Asn	Tir Pro Asp Leu	Pro Fen Gli His			
	500	505	510			
Lis Pro Gli Ile	Tre Ser Ala Tre	His Pro Ala Arg	Ser Pro Pro Tir			
	515	520	525			
Gln Pro Pro Ile	Ile Ser Tre Asn	Tir Pro Gln Val	Fen Pro Pro His			
	530	535	540			
Gln Ala Pro Met	Ser Pro Asp Tre	His Tre Ile Tre	Tir Leu Pro Pro			
545	550	555	560			
Val Pro Pro His	Leu Asp Pro Gli	Asp Tre Tre Ser	Lis Ala His Gln			
	565	570	575			
His Pro Leu Leu	Pro Asp Ala Pro	Gli Ile Arg Tre	Gln Ala Pro Gln			
	580	585	590			
Leu Ser Val Ser	Ala Leu Gln Pro	Pro Leu Pro Tre	Asn Ser Arg Ser			
	595	600	605			
Ser Val His Glu	Tre Pro Val Pro	Ala Ala Asn Gln	Pro Pro Ala Fen			
610	615	620				
Pro Ser Ser Pro	Leu Pro Pro Gln	Arg Pro Tre Asn	Gln Tre Ser Ser			
625	630	635	640			
Ile Ser Pro Tre	His Ser Tir Ser	Arg Ala Pro Leu	Val Pro Arg Glu			
	645	650	655			
Gli Val Pro Ser	Pro Lis Ser Val	Pro Gln Leu Pro	Ser Val Pro Ser			
	660	665	670			
Tre Ala Ala Pro	Tre Ala Leu Ala	Glu Ser Gli Leu	Ala Gli Gln Ser			
	675	680	685			
Gln Arg Asp Asp	Arg Trp Leu Leu	Val Ala Leu Leu	Val Pro Tre Cis			
690	695	700				
Val Fen Leu Val	Val Leu Leu Ala	Leu Gli Ile Val	Tir Cis Tre Arg			
705	710	715	720			

Cis Gln Ser His Ala Pro Asn Lys Arg Ile Trp Asp Cys Trp Arg Trp
725 730 735

Val Trp His Ala Gln Asn Lys Ser Ser Trp Glu Pro Met Pro Pro Arg
740 745 750

Gln Ser Leu Trp Gln Val Gln Trp Cys Arg Trp Ser Val
755 760 765

<210> 3
<211> 2576
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
agtcgggggg catcgcgatg ctgctgcgcc tgttgctggc ctgggcggcc gcagggccca 60
cactggggcca ggacccctgg gctgctgagc cccgtgccgc ctgcccggcc agcagctgct 120
acgctctctt cccacggggc cgcaccttc tggaggcctg gggggcctgc cgcgagctgg 180
ggggcgacct ggcactcct cggacccccg aggaggccca gctgtggac agcctgggtg 240
gtggggggcc agccagccgg ctgctgtgga tggggctgca ggggcaggcc cggcaatgcc 300
agctgcagcg cccactgcgc ggttcacgt ggaccacagg ggaccaggac acggtttcca 360
ccaactgggc ccagccagcc tctggaggcc cctgccgggc ccagcgctgt gtggccctgg 420
aggcaagtgg cgagcacggc tggctggagg gctcgtgcac gctggctgtc gacggctacc 480
tgtgccagtt tggcttcgag ggcgcctgcc cggcgctgca agatgaggcg ggccaggccg 540
gcccgccgt gtataccacg ccttccacc tggctccac agagtttgag tggctgcct 600
tcggctctgt ggccgctgtg cagtgcacag ctggcagggg agcctctctg ctctgcgtga 660
agcagcctga gggaggtgtg ggctggtcac gggtggggc cctgtgcctg gggactggct 720
ggagccctga caacgggggc tgcgaacacg aatgtgtgga ggaggtggat ggtcacgtgt 780
cctgcogctg cactgagggc ttccgctgg cagcagacgg gcgcagttgc gaggacccct 840
gtgcccaggc tccgtgcgag cagcagtggt agcccgggtg gccacaaggc tacagctgcc 900
actgtccctt gggtttccgg ccagcggagg atgatccga ccgctgtgtg gacacagatg 960
agtgccagat tgcgggtgtg tgcagcaga tgtgtgtcaa ctacgttggg ggttcgagt 1020
gttattgtag cgagggacat gagctggagg ctgatggcat cagctgcagc cctgcagggg 1080
ccatgggtgc ccaggttcc caggacctcg gagatgagtt gctggatgac ggggaggatg 1140
aggaagatga agacgaggcc tgggaaggcct tcaacgggtg ctggacggag atgcttggga 1200
tcctgtggat ggagcctacg cagccgcctg actttgccct ggcctataga ccgagcttcc 1260

cagaggacag agagccacag ataccctacc cggagcccac ctggccaccc ccgctcagtg 1320
 cccccagggt cccctaccac tctcagtgcc tctccgtcac ccggcctgtg gtggtctctg 1380
 ccacgcctcc cacactgect tctgcccacc agcctctgtg gatccctgcc acacacccag 1440
 ctttgtcccg tgaccaccag atccccgtga tcgcagccaa ctatccagat ctgccttctg 1500
 cctaccaacc cggatattctc tctgtctctc attcagcaca gcctcctgcc caccagcccc 1560
 ctatgatctc aaccaaatat ccggagctct tccctgccca ccagtccccc atgtttccag 1620
 acacccgggt cgtctggcac cagaccacca ctccatttgc tggaatccca cctaaccatg 1680
 cccctctggt caccacccctc ggtgcccagc taacccctca agccccagat gcccttgctc 1740
 tcagaaccca ggccaccacg ctccccatta tcccaactgc ccagccctct ctgaccacca 1800
 cctccaggtc cctgtgtctc cctgcccatc aaatctctgt gcctgctgcc acccagcccc 1860
 cagccctccc caccctctctg cctctccaga gcccactaa ccagacctca cccatcagcc 1920
 ctacscatcc ccattccaaa gccccccaaa tcccaaggga agatggcccc agtcccaagt 1980
 tggccctgtg gctgccctca ccagctccca cagcagcccc aacagccctg ggggaggctg 2040
 gtcttgccga gcacagccag agggatgacc ggtggctgct ggtggcactc ctggtgccaa 2100
 cgtgtgtctt tttggtggtc ctgcttgccac tgggcatcgt gtactgcacc cgtgtggcc 2160
 cccatgcacc caacaagcgc atcactgact gctatcgctg ggtcatccat gctgggagca 2220
 agagcccaac agaaccctat cccccagggt gcagcctcac aggggtgcag acctgcagaa 2280
 ccagcgtgtg atgggggtgca gacccccctc atggagtatg gggcgctgga cacatggccg 2340
 gggtgcacc agggacccat gggggctgcc cagctggaca gatggcttcc tgctccccag 2400
 gccagccag ggtctctctc caaccactag acttggtctc caggaaactct gcttcttggc 2460
 ccagcgtctg tgaccaagga tacaccaaag cctttaagac ctgagggggc ggtgctggg 2520
 gtcttctcca ataatgggg tgtcaacctt acccaaggaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2576

<210> 4
 <211> 757
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

275

280

285

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

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

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

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

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

Leu Asp Asp Gln Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Ala Trp Lys Ala
370 375 380

Phe Asn Gln Gln Trp Trp Glu Met Pro Gln Ile Leu Trp Met Glu Pro
385 390 395 400

Trp Gln Pro Pro Asp Phe Ala Leu Ala Tyr Arg Pro Ser Phe Pro Glu
405 410 415

Asp Arg Glu Pro Gln Ile Pro Tyr Pro Glu Pro Trp Trp Pro Pro Pro
420 425 430

Leu Ser Ala Pro Arg Val Pro Tyr His Ser Ser Val Leu Ser Val Trp
435 440 445

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

Gln Pro Pro Val Ile Pro Ala Trp His Pro Ala Leu Ser Arg Asp His
465 470 475 480

Gln Ile Pro Val Ile Ala Ala Asn Tyr Pro Asp Leu Pro Ser Ala Tyr
485 490 495

Gln Pro Gln Ile Leu Ser Val Ser His Ser Ala Gln Pro Pro Ala His
500 505 510

Gln Pro Pro Met Ile Ser Trp Lys Tyr Pro Glu Leu Phe Pro Ala His
515 520 525

Gln Ser Pro Met Fen Pro Asp Tre Arg Val Ala Gln Tre Gln Tre Tre
530 535 540

Tre His Leu Pro Gln Ile Pro Pro Asn His Ala Pro Leu Val Tre Tre
545 550 555 560

Leu Gln Ala Gln Leu Pro Pro Gln Ala Pro Asp Ala Leu Val Leu Arg
565 570 575

Tre Gln Ala Tre Gln Leu Pro Ile Ile Pro Tre Ala Gln Pro Ser Leu
580 585 590

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

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

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

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

Leu Trp Leu Pro Ser Pro Ala Pro Tre Ala Ala Pro Tre Ala Leu Gln
660 665 670

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

Val Ala Leu Leu Val Pro Tre Cys Val Fen Leu Val Val Leu Leu Ala
690 695 700

Leu Gln Ile Val Trp Cys Tre Arg Cys Gln Pro His Ala Pro Asn Lis
705 710 715 720

Arg Ile Tre Asp Cys Trp Arg Trp Val Ile His Ala Gln Ser Lis Ser
725 730 735

Pro Tre Glu Pro Met Pro Pro Arg Gln Ser Leu Tre Gln Val Gln Tre
740 745 750

Cys Arg Tre Ser Val
755

<210> 5
 <211> 2397
 <212> DNA
 <213> Rattus rattus

<400> 5
 atgctgctgc gcctgctgct ggccctgggag gccgcgggtgc ccgcactggg ccaggccccc 60
 tggacgcggg agcctagagg cgccctgcggc ccacgcagct gctacgctct etttccccgg 120
 cgcgcacacat tectggaggg ttggcggctg tgcgcggaat tggggggcaa cctggccaca 180
 ccgaggaccc cggaggaggc ccgacgtgtg gacagcctgg tggcgctcgg acccgccaac 240
 gggctgctat ggattgggtt gcagcggcag gctcggcaat gccagccaca ggcgccactg 300
 cggggcttca tatggaccac gggagaccag gacaccgctt tcaactaactg gggccagccg 360
 gctacggag gacccctgcc gggccagcgc tgtgctgcc ttgaggccag cggagaacat 420
 cgctggctcg aaggctcgtg cacactggct gtcgatggct acctctgcc gtttggtttt 480
 gagggtgctt gtctgctt gccgcttgag gtggggccaag ccggtccagc tatctacacc 540
 acacccttca acctgggttc cagtgaagtc gaatggctac cctttggctc cgtggcagct 600
 gtgcagtgcc aagctggcag ggaacgtct ctgttgtgtg tgaacaacc ttccaggtggc 660
 gttggttggc ccagactgg ccactgtgt ccagggaactg gctgtggtcc tgacaatggg 720
 gggttgcgac atgaatgtgt ggaagagttg gatggcggtg tgcctgccg ctgcagtga 780
 ggcttccgtc tagcagcaga tgggcacagt tgtgaagacc ctgtgcccc gggccctgt 840
 gagcagcagt gtgagcctgg tgggccacaa ggcctacagct gccactgtcg cctaggtctc 900
 cggccagctg aggatgagcc acaccgctgc gtggacacgg atgagtcca gattgctggt 960
 gtgtgccagc agatgtgtgt caactatgtt ggtggctttg agtgttactg caggaggagg 1020
 catgagcttg aggcagatgg tatcagttgt agccctgcag gagctatggg tgcccaggct 1080
 tcccaggatc ttagagacga gttgctggat gatggagaag aaggggagga tgagaggag 1140
 ccctgggagg acttcgatgg caccctggaca gaggagcagg ggaacctatg gatggcact 1200
 acacatccgc ctgactttgg cctgccctat agggccaaact tcccacagga tggagagcct 1260
 cagagattgc acctggagcc tacctggcca ccccaactta gggcccccag gggccctac 1320
 cactcctcag tgggtgtctg cacacggccc atggtaatct ctgcactcg accacacaa 1380
 ccttctgccc gaagacctc tgtatttca gccacacacc tacccttaa cctgtccac 1440
 ccacctgcc tagccctac cacacctca gccgtgctcc ctgagcacca gatccccaa 1500
 atcaaggcca gttatccaga ctgtcctttt gggcacaagc ctgggataac ctgagccact 1560
 cccccagcag agcctcctcc tcaaccagcc cccatcatct caacgaata tccccagtc 1620

tttccctcccc agcaggccccc tatgtctcca gacacccaca ctatcactaa tttgcctcta 1680
 atcccatctc accttgaccc tggggatacc acttcccaag ccggtcacca tccittgttc 1740
 ccagatgttc caggtatcag aacccagget ccccaggttt ctgtctcage tctccagccc 1800
 tctctgccta ccaactccag gtctttctgtc catgaacccc ctgtgcttac tgccaaccag 1860
 cccccagcct tcccttctcc cctgccccct cagagcccca ttaaccagac ctcatctatc 1920
 agccctacac actcctattc cagagccctt caggtcccaa gggaaggagg tcccagtcct 1980
 aaatcagttc caaggtctga ctccagtggc cccacagcag ctccaacagc cctggcagag 2040
 ttgggtcttg caggccaaag ccagagagat gaccgatggc tgctgggtggc actcttggtt 2100
 ccaacgtgtg tcttcttggg ggtcctgttc gcattgggca ttgtgtactg cactcgctgt 2160
 ggctcccata cgcaccaaac gcgtatcact gactgctatc gctgggtcac gcattgtggg 2220
 aacaagagct caacagaacc catgcccccc agatggacag agaaggttct gttccttgaa 2280
 cccagcattc atggcaaagg acacactgaa ggactccagg acctcaaggg gtgggtgctg 2340
 ggatcttctc caataaatgg cgtgcccaacc tcacccaag tccgtgatac ccgtctga 2397

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

<400> 6

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

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

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

Arg Ser Cys Arg Glu Leu Gln Gln Asn Leu Ala Trp Pro Arg Trp Pro
 50 55 60

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

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

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

Ala Fen Tre Asn Trp Ala Gln Pro Ala Tre Glu Gln Pro Cys Pro Ala
115 120 125

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

Gln Ser Cys Tre Leu Ala Val Asp Gln Tyr Leu Cys Gln Fen Gln Fen
145 150 155 160

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

Ala Ile Tyr Tre Tre Pro Fen Asn Leu Val Ser Ser Glu Fen Glu Trp
180 185 190

Leu Pro Fen Gln Ser Val Ala Ala Val Gln Cys Gln Ala Gln Arg Gln
195 200 205

Tre Ser Leu Leu Cys Val His Gln Pro Ser Gln Gln Val Gln Trp Ser
210 215 220

Gln Tre Gln Pro Leu Cys Pro Gln Tre Gln Cys Gln Pro Asp Asn Gln
225 230 235 240

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

Arg Cys Ser Glu Gln Fen Arg Leu Ala Ala Asp Gln His Ser Cys Glu
260 265 270

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

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

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

Val Cys Gln Gln Met Cys Val Asn Tyr Val Gln Gln Fen Glu Cys Tyr
325 330 335

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

Ala Gln Ala Met Gln Ala Gln Ala Ser Gln Asp Leu Arg Asp Glu Leu
 355 360 365
 Leu Asp Asp Gln Glu Glu Gln Glu Asp Glu Glu Glu Pro Trp Glu Asp
 370 375 380
 Phe Asp Gln Thr Trp Trp Glu Glu Gln Gln Trp Leu Trp Met Ala Pro
 385 390 395 400
 Trp His Pro Pro Asp Phe Gln Leu Pro Trp Arg Pro Asn Phe Pro Gln
 405 410 415
 Asp Gln Glu Pro Gln Arg Leu His Leu Glu Pro Trp Trp Pro Pro Pro
 420 425 430
 Leu Ser Ala Pro Arg Gln Pro Trp His Ser Ser Val Val Ser Ala Trp
 435 440 445
 Arg Pro Met Val Ile Ser Ala Trp Arg Pro Trp Gln Pro Ser Ala Arg
 450 455 460
 Lys Trp Ser Val Ile Ser Ala Trp His Leu Pro Leu Asn Pro Val His
 465 470 475 480
 Pro Pro Ala Leu Ala Pro Trp Trp Pro Pro Ala Val Leu Pro Glu His
 485 490 495
 Gln Ile Pro Lys Ile Lys Ala Ser Trp Pro Asp Leu Pro Phe Gln His
 500 505 510
 Lys Pro Gln Ile Trp Ser Ala Trp His Pro Ala Gln Pro Pro Pro His
 515 520 525
 Gln Pro Pro Ile Ile Ser Trp Lys Trp Pro Gln Val Phe Pro Pro Gln
 530 535 540
 Gln Ala Pro Met Ser Pro Asp Trp His Trp Ile Trp Asn Leu Pro Leu
 545 550 555 560
 Ile Pro Ser His Leu Asp Pro Gln Asp Trp Trp Ser Gln Ala Gln His
 565 570 575
 His Pro Leu Leu Pro Asp Val Pro Gln Ile Arg Trp Gln Ala Pro Gln
 580 585 590
 Val Ser Val Ser Ala Leu Gln Pro Ser Leu Pro Trp Asn Ser Arg Ser

595 600 605
 Ser Val His Glu Pro Pro Val Pro Tre Ala Asn Gln Pro Pro Ala Fen
 610 615 620
 Pro Ser Pro Leu Pro Pro Gln Ser Pro Ile Asn Gln Tre Ser Ser Ile
 625 630 635 640
 Ser Pro Tre His Ser Tir Ser Arg Ala Pro Gln Val Pro Arg Glu Gln
 645 650 655
 Ala Pro Ser Pro Lis Ser Val Pro Arg Leu His Ser Val Ala Pro Tre
 660 665 670
 Ala Ala Pro Tre Ala Leu Ala Glu Leu Gln Leu Ala Gln Gln Ser Gln
 675 680 685
 Arg Asp Asp Arg Trp Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Pro Tre Cys Val
 690 695 700
 Fen Leu Val Val Leu Leu Ala Leu Gly Ile Val Tir Cys Tre Arg Cys
 705 710 715 720
 Gln Ser His Tre Pro Asn Lis Arg Ile Tre Asp Cys Tir Arg Trp Val
 725 730 735
 Tre His Ala Gln Asn Lis Ser Ser Tre Glu Pro Met Pro Pro Arg Trp
 740 745 750
 Tre Glu Lis Val Leu Fen Leu Glu Pro Ser Ile His Gln Lis Gln His
 755 760 765
 Tre Glu Gln Leu Gln Asp Leu Lis Gln Trp Val Leu Gln Ser Ser Pro
 770 775 780
 Ile Asn Gln Val Pro Tre Ser Pro Lis Val Arg Asp Pro Arg
 785 790 795

<210> 7
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Sequência de ácidos nucleicos que codificam a cadeia leve de Anticorpos M4 e M4.1
 com sequência líder
 <400> 7

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgac	60
atccagatga cccagagccc aagcagcctg agcggcagcg tgggtgacag agtgaccatc	120
acctgtagag ccagccagaa tgtgggtact gctgtagcct ggctacagca gaccccaggt	180
aaggctccaa agctgctgat ctactcggca tcgaatcggg acactggtgt gccaaagcaga	240
ttcagcggta gcggtagcgg taccgactac accttcacca tcagcagcct ccagccagag	300
gacatcgcca cctactactg ccagcaatat accaactatc ccatgtacac gttcggccaa	360
gggaccaagg tgcaaatcaa acgaactgtg gctgcacct ctgtcttcat cttcccgcca	420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgc tctgttgtgt gctgctgaa taacttctat	480
cccagagagg ccaaatgaca gtggaagggt gataacggcc tccaatcggg taactcccag	540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc	660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaa	705

<210> 8

<211> 1422

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de ácidos nucleicos que codificam a cadeia pesada de Anticorpos M4 com sequência líder

<400> 8

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag	60
gtccaaactgc aggagagcgg tccaggtctt gtgagacctt gccagacctt gagcctgacc	120
tgcaccgcgt ctggctacac cttcaactgac tatgttatat actgggtgaa acagccacct	180
ggacgaggtc ttgagtggat tggatatatt aatccttatg atgatgatac taactacaac	240
cagaagttca agggcagagt gacaatgctg gtagacacca gctccaacac agcctacctg	300
agactcagca gcgtgacagc cgaggacacc gcggtctatt attgtgcaag aagggggaat	360
tcctatgatg gttactttga ctactctatg gactactggg gatccgggac ccgggtcacc	420
gtctcctcag cctccaccaa gggcccctcg gtcttcccc tggcacctc ctccagagc	480
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggccaagg actacttccc cgaaccgggtg	540
acgggtgtcgt ggaactcagg cgccttgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta	600
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc	660
acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa	720
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc	780

ctgggggggac cgtcagtttt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 840
 cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 900
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcttcaccc tctgcacca ggactggctg 1020
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1080
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc 1140
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg ctctatccc 1200
 agcgacatcg cctggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1260
 cctcccgtgc tggactcga cggctcttc tctcttaca gcaagctcac cgtggacaag 1320
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgcctcgtga tgcctgagge tctgcacaac 1380
 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cccgggaat ga 1422

<210> 9
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de aminoácidos da cadeia leve de anticorpos M4 e M4.1 com sequência líder

<400> 9

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

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

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

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

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

Phe Ser Gln Ser Gln Ser Gln Thr Asp Thr Thr Phe Thr Ile Ser Ser
 85 90 95

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

Tir Pro Met Tir Tre Fen Gli Gln Gli Tre Lis Val Gln Ile Lis Arg
115 120 125

Tre Val Ala Ala Pro Ser Val Fen Ile Fen Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lis Ser Gli Tre Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Fen Tir
145 150 155 160

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

Gli Asn Ser Gln Glu Ser Val Tre Glu Gln Asp Ser Lis Asp Ser Tre
180 185 190

Tir Ser Leu Ser Ser Tre Leu Tre Leu Ser Lis Ala Asp Tir Glu Lis
195 200 205

His Lis Val Tir Ala Cys Glu Val Tre His Gln Gli Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Tre Lis Ser Fen Asn Arg Gli Glu Cys
225 230

<210> 10

<211> 648

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de nucleótidos que codificam a cadeia leve de anticorpos M4 e M4.1 sem sequência líder

<400> 10

gacatccaga tgaccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgaac 60

atcacctgta gagccagcca gaatgtgggt actgctgtag cctggctaca gcagacccca 120

ggtaaggctc caaagctgct gatctactcg gcatcgaatc ggtacactgg tgtgccaagc 180

agattcagcg gtagcggtag cggtaacgac tacaccttca ccatcagcag cctccagcca 240

gaggacatcg ccacctacta ctgccagcaa tataccaact atcccatgta caggttcggc 300

caagggacca aggtgcaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcttgcg gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagccicag cagcacctcg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacagggag agtgtaa 648

<210> 11
<211> 215
<212> P&T
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência de aminoácidos da cadeia leve de anticorpos M4 e M4.1 sem
sequência líder

<400> 11

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

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

Val Ala Trp Leu Gln Gln Tre Pro Gln Lis Ala Pro Lis Leu Leu Ile
35 40 45

Tir Ser Ala Ser Asn Arg Tir Tre Gln Val Pro Ser Arg Fen Ser Gln
50 55 60

Ser Gln Ser Gln Tre Asp Tir Tre Fen Tre Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Tre Tir Tir Cys Gln Gln Tir Tre Asn Tir Pro Met
85 90 95

Tir Tre Fen Gln Gln Gln Tre Lis Val Gln Ile Lis Arg Tre Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Fen Ile Fen Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lis Ser
115 120 125

Gln Tre Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Fen Tir Pro Arg Glu
130 135 140

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

Gln Gln Ser Val Tre Glu Gln Asp Ser Lis Asp Ser Tre Tir Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Tre Leu Tre Leu Ser Lis Ala Asp Tir Glu Lis His Lis Val

180 185 190

Tir Ala Cys Glu Val Tre His Gln Gln Leu Ser Ser Pro Val Tre Lis
 195 200 205

Ser Fen Asn Arg Gln Glu Cys
 210 215

<210> 12
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de ácidos nucleicos que codificam CDR1 da cadeia leve de anticorpos M4 e M4.1

<400> 12
 agagccagcc agaattgtggg tactgctgta gcc 33

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de aminoácidos de CDR1 da cadeia leve de anticorpos M4 e M4.1

<400> 13
 Arg Ala Ser Gln Asn Val Gln Tre Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleótidos que codificam CDR2 da cadeia leve de anticorpos M4 e M4.1

<400> 14
 toggcatcga atcggtacac t 21

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de aminoácidos de CDR2 da cadeia leve de anticorpos M4 e M4.1

<400> 15

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Trp
1 5

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de nucleótidos que codificam CDR3 da cadeia leve de anticorpos M4 e M4.1

<400> 16

cagcaatata ccaactatcc catgtacacg

30

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de aminoácidos de CDR3 da cadeia leve de anticorpos M4 e M4.1

<400> 17

Gln Gln Tyr Trp Asn Tyr Pro Met Tyr Trp
1 5 10

<210> 18

<211> 294

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de nucleótidos que codificam domínio variável da cadeia leve de anticorpos M4 e M4.1

<400> 18

garatccaga tgaaccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60

atcacctgta gagccagcca gaatgtgggt actgctgtag cctggctaca gcagacccca 120

ggtaaggctc caaagctgct gatctactcg gcatcgaatc ggtacactgg tgtgccaaagc 180

agattcagcg gtagcggtag cggtaaccgac tacaccttca ccacagcag cctccagcca 240

gaggacatcg ccacctacta ctgccagcaa tataccaact atcccatgta cagc 294

<210> 19

<211> 98

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de aminoácidos de domínio variável da cadeia leve de anticorpos M4 e M4.1

<400> 19

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

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

Val Ala Trp Leu Gln Gln Tre Pro Gln Lis Ala Pro Lis Leu Leu Ile
35 40 45

Tir Ser Ala Ser Asn Arg Tir Tre Gln Val Pro Ser Arg Fen Ser Gln
50 55 60

Ser Gln Ser Gln Tre Asp Tir Tre Fen Tre Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Tre Tir Tir Cys Gln Gln Tir Tre Asn Tir Pro Met
85 90 95

Tir Tre

<210> 20

<211> 473

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de aminoácidos da cadeia leve de anticorpo M4 mais sequência líder

<400> 20

Met Gln Trp Ser Cys Ile Ile Leu Fen Leu Val Ala Tre Ala Tre Gln
1 5 10 15

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

Pro Ser Gln Tre Leu Ser Leu Tre Cys Tre Ala Ser Gln Tir Tre Fen
35 40 45

Tre Asp Tir Val Ile His Trp Val Lis Gln Pro Pro Gln Arg Gln Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gln Tir Ile Asn Pro Tir Asp Asp Asp Tre Tre Tir Asn

65		70		75		80									
Gln	Lis	Fen	Lis	Gli	Arg	Val	Tre	Met	Leu	Val	Asp	Tre	Ser	Ser	Asn
				85					90					95	
Tre	Ala	Tir	Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Tre	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tir	Tir	Cis	Ala	Arg	Arg	Gli	Asn	Ser	Tir	Asp	Gli	Tir	Fen	Asp	Tir
		115					120					125			
Ser	Met	Asp	Tir	Trp	Gli	Ser	Gli	Thr	Pro	Val	Tre	Val	Ser	Ser	Ala
	130					135					140				
Ser	Tre	Lis	Gli	Pro	Ser	Val	Fen	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lis	Ser
145					150				155						160
Tre	Ser	Gli	Gli	Tre	Ala	Ala	Leu	Gli	Cis	Leu	Val	Lis	Asp	Tir	Fen
				165					170					175	
Pro	Glu	Pro	Val	Tre	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gli	Ala	Leu	Tre	Ser	Gli
		180						185					190		
Val	His	Tre	Fen	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gli	Leu	Tyr	Ser	Leu
	195						200					205			
Ser	Ser	Val	Val	Tre	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gli	Tre	Gln	Tre	Tir
	210					215					220				
Ile	Cis	Asn	Val	Asn	His	Lis	Pro	Ser	Asn	Tre	Lis	Val	Asp	Lis	Lis
225					230				235						240
Val	Glu	Pro	Lis	Ser	Cis	Asp	Lis	Tre	His	Tre	Cis	Pro	Pro	Cis	Pro
				245				250						255	
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gli	Gli	Pro	Ser	Val	Fen	Leu	Fen	Pro	Pro	Lis
			260					265					270		
Pro	Lis	Asp	Tre	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Tre	Pro	Glu	Val	Tre	Cis	Val
		275					280					285			
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lis	Fen	Asn	Trp	Tir
	290					295					300				
Val	Asp	Gli	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lis	Tre	Lis	Pro	Arg	Glu	Glu
305					310					315					320

Gln Tir Asn Ser Tre Tir Arg Val Val Ser Val Leu Tre Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gln Lis Glu Tir Lis Cys Lis Val Ser Asn Lis
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lis Tre Ile Ser Lis Ala Lis Gln Gln
355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tir Tre Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
370 375 380

Tre Lis Asn Gln Val Ser Leu Tre Cys Leu Val Lis Gln Fen Tir Pro
385 390 395 400

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

Tir Lis Tre Tre Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gln Ser Fen Fen Leu
420 425 430

Tir Ser Lis Leu Tre Val Asp Lis Ser Arg Trp Gln Gln Gln Asn Val
435 440 445

Fen Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tir Tre Gln
450 455 460

Lis Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gln Lis
465 470

<210> 21
<211> 1365
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência de nucleótidos que codificam a cadeia pesada do anticorpo M4
sem sequência líder

<400> 21
caggtccaac tgcaggagag cgggccaggt cttgtgagac ctageccagac cctgagcctg 60
acctgcaccg cgtctgggcta cacccttcaact gactatgtta tacactgggt gaacacagcca 120
cctggacgag gtcttgagtg gattggatat atteatcctt atgatgatga tactacctac 180
aaccagaagt tcaagggcag agtgacaatg ctggtagaca ccagctccaa cacagcctac 240
ctgagactca gcagcgtgac agccgaggac accgcggtct attattgtgc aagaaggggg 300

aattoctatg atggttactt tgactactct atggactact ggggatccgg gaccccggtc 360
accgtctcct cagcctccac caagggccca tccgtcttcc ccctggcacc ctctccaag 420
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgccctggta aggactactt cccogaaccg 480
gtgacgggtg cgtggaactc agggccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggta ccgtgccctc cagcagcttg 600
ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccas ggtggacaag 660
aaagttgagc ccaaattctt tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa 720
ctcctggggg gaccgtcagt ctctctctc ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgatc 780
tcccggaacc ctgaggtcac atgctgggtg gtggacgtga gccacgaaga cctgaggtc 840
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaa gccgcgggag 900
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 960
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag cctcccagc ccccatcgag 1020
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1080
tcccgggatg agctgaccaa gaaccagtc agcctgacct gcctggctaa aggttctat 1140
cccagcgaca tcccggtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1200
acgcctcccg tctggactc cagcggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 1260
aagagcaggt ggcagcagg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1320
aaccactaca cgcagaagag cctctcctg tctccggga aatga 1365

<210> 22
<211> 454
<212> FRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo M4 sem
sequência líder

<400> 22

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

Tyr Leu Ser Leu Tyr Cys Tyr Ala Ser Gln Tyr Tyr Phe Tyr Asp Tyr
20 25 30

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

Gli Tir Ile Asn Pro Tir Asp Asp Asp Tre Tre Tir Asn Gln Lis Fen
 50 55 60

Lis Gli Arg Val Tre Met Leu Val Asp Tre Ser Ser Asn Tre Ala Tir
 65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Tre Ala Glu Asp Tre Ala Val Tir Tir Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Gli Asn Ser Tir Asp Gli Tir Fen Asp Tir Ser Met Asp
 100 105 110

Tir Trp Gli Ser Gli Tre Pro Val Tre Val Ser Ser Ala Ser Tre Lis
 115 120 125

Gli Pro Ser Val Fen Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lis Ser Tre Ser Gli
 130 135 140

Gli Tre Ala Ala Leu Gli Cys Leu Val Lis Asp Tir Fen Pro Glu Pro
 145 150 155 160

Val Tre Val Ser Trp Asn Ser Gli Ala Leu Tre Ser Gli Val His Tre
 165 170 175

Fen Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gli Leu Tir Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190

Val Tre Val Pro Ser Ser Ser Leu Gli Tre Gln Tre Tir Ile Cys Asn
 195 200 205

Val Asn His Lis Pro Ser Asn Tre Lis Val Asp Lis Lis Val Glu Pro
 210 215 220

Lis Ser Cys Asp Lis Tre His Tre Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240

Leu Leu Gli Gli Pro Ser Val Fen Leu Fen Pro Pro Lis Pro Lis Asp
 245 250 255

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

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lis Fen Asn Trp Tir Val Asp Gli
 275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lis Tre Lis Pro Arg Glu Glu Gln Tir Asn

290 295 300
 Ser Tre Tir Arg Val Val Ser Val Leu Tre Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gln Lis Glu Tir Lis Cys Lis Val Ser Asn Lis Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lis Tre Ile Ser Lis Ala Lis Gln Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tir Tre Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Tre Lis Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Tre Cys Leu Val Lis Gln Fen Tir Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gln Gln Pro Glu Asn Asn Tir Lis Tre
 385 390 395 400
 Tre Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gln Ser Fen Fen Leu Tir Ser Lis
 405 410 415
 Leu Tre Val Asp Lis Ser Arg Trp Gln Gln Gln Asn Val Fen Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tir Tre Gln Lis Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gln Lis
 450

<210> 23
 <211> 1422
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleótidos que codificam a cadeia pesada do anticorpo
 M4.1 com sequência líder

<400> 23
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag 60
 gtccaactgc aggagagcgg tccaggtctt gtgagaccta gccagaccct gacccctgacc 120
 tgcaccgcgt ctggctacac cttcactgac tatgttatac actgggtgaa acagccacct 180
 ggacgaggtc ttgagtggat tggatatatt aatccttatg atgatgatac tacctacaac 240

cagaagtcca agggcagagt gacaatgctg gtagacacca gctccaaccac agcctacctg 300
agactcagca gcgtgacagc cgaggacacc gcgggtctatt attgtgcaag aagggggaat 360
tctatgatg gttactttga ctactctatg gactactggg gatccgggac cccggtcacc 420
gtctcctcag cctccaccsa gggcccatcg gtcttccccc tggpacccte ctccaagagc 480
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtoaagg actacttccc cgaaccggtg 540
acgggtgtcgt ggaactcagg cgccttgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 600
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 660
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 720
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 780
ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacacct catgatctcc 840
cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 900
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctccaccg tctgcacca ggactggtg 1020
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1080
accatctcca aagccaaagg gcagcccccga gaaccacagg tgtacacct gcccccaccc 1140
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc 1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1260
cctcccgctg tggactccga cggcttcttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1320
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaa 1380
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cccgggaaat ga 1422

<210> 24

<211> 473

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo M4.1 com
sequência líder

<400> 24

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

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

Pro Ser Gln Trp Leu Ser Leu Trp Cys Trp Ala Ser Gln Trp Trp Phe

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

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lis Fen Asn Trp Tir
 290 295 300

Val Asp Glu Val Glu Val His Asn Ala Lis Tre Lis Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320

Gln Tir Asn Ser Tre Tir Arg Val Val Ser Val Leu Tre Val Leu His
 325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Glu Lis Glu Tir Lis Cys Lis Val Ser Asn Lis
 340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lis Tre Ile Ser Lis Ala Lis Glu Gln
 355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tir Tre Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 370 375 380

Tre Lis Asn Gln Val Ser Leu Tre Cys Leu Val Lis Glu Fen Tir Pro
 385 390 395 400

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

Tir Lis Tre Tre Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Glu Fen Fen Fen Leu
 420 425 430

Tir Ser Lis Leu Tre Val Asp Lis Ser Arg Trp Gln Gln Glu Asn Val
 435 440 445

Fen Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tir Tre Gln
 450 455 460

Lis Ser Leu Ser Leu Ser Pro Glu Lis
 465 470

<210> 25

<211> 1365

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de nucleótidos que codificam a cadeia pesada do anticorpo M4.1
 sem sequência líder

<400> 25

caggtccaac tgcaggagag cgggtccaggt cttgtgagac ctgaccagac cctgagcctg

60

```

acctgcaccg cgtctggeta caccttcact gactatgtta tacactgggt gaacacagcca 120
cctggacgag gtcttgagtg gattggatat attaatcctt atgatgatga tactacctac 180
aaccagaagt tcaagggcag agtgacaatg ctggtagaca ccagctccaa cacagcctac 240
ctgagactca gcagcgtgac agccgaggac accgcggtct attattgtgc aagaaggggg 300
aattcctatg atggttactt tgactactct atggactact ggggatccgg gaccccggtc 360
accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc ccttggcacc ctctccaaag 420
agcacctctg ggggcacagc ggccttgggc tgcttggtca aggactactt ccccgaaaccg 480
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccttg accagcggcg tgcacacctt ccgggctgtc 540
ctacagtect caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccttc cagcagcttg 600
ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagcccc gcaacaccaa ggtggacaag 660
aaagttagag ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa 720
ctcttggggg gaccgtcagt ctctctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgac 780
tccccgaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccttgaggtc 840
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 900
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctcca ccgtcttgc ccaggactgg 960
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1020
aaaaccatct ccaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1080
tccccggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtaaa aggtctctat 1140
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacca ctacaagacc 1200
acgcctcccg tgctggactc cgacggcttc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 1260
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1320
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccccgga aatga 1365

```

<210> 26
 <211> 454
 <212> FRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo M4.1 sem
 sequência líder

<400> 26

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

Tre Leu Ser Leu Tre Cys Tre Ala Ser Gln Tir Tre Fen Tre Asp Tir
 20 25 30

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

Gln Tir Ile Asn Pro Tir Asp Asp Asp Tre Tre Tir Asn Gln Lis Fen
 50 55 60

Lis Gln Arg Val Tre Met Leu Val Asp Tre Ser Ser Asn Tre Ala Tir
 65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Tre Ala Glu Asp Tre Ala Val Tir Tir Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Gln Asn Ser Tir Asp Gln Tir Phe Asp Tir Ser Met Asp
 100 105 110

Tir Trp Gln Ser Gln Tre Pro Val Tre Val Ser Ser Ala Ser Tre Lis
 115 120 125

Gln Pro Ser Val Fen Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lis Ser Tre Ser Gln
 130 135 140

Gln Tre Ala Ala Leu Gln Cys Leu Val Lis Asp Tir Fen Pro Glu Pro
 145 150 155 160

Val Tre Val Ser Trp Asn Ser Gln Ala Leu Tre Ser Gln Val His Tre
 165 170 175

Fen Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gln Leu Tir Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190

Val Tre Val Pro Ser Ser Ser Leu Gln Tre Gln Tre Tir Ile Cys Asn
 195 200 205

Val Asn His Lis Pro Ser Asn Tre Lis Val Asp Lis Lis Val Glu Pro
 210 215 220

Lis Ser Cys Asp Lis Tre His Cys Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240

Leu Leu Gln Gln Pro Ser Val Fen Leu Fen Pro Pro Lis Pro Lis Asp
 245 250 255

Tre Leu Met Ile Ser Arg Tre Pro Glu Val Tre Cys Val Val Val Asp

ggctacacct tcactgacta tgttatacac

30

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência de aminoácidos de CDR1 da cadeia pesada de anticorpos M4 e M4.1

<400> 28

Gly Tyr Trp Phe Trp Asp Tyr Val Ile His
1 5 10

<210> 29
<211> 51
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência de nucleótidos que codifica CDR2 da cadeia pesada de anticorpos M4 e M4.1

<400> 29
tatattaatc cttatgatga tgatactacc tacaaccaga agttcaaggg c 51

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência de aminoácidos de CDR2 da cadeia pesada de anticorpos M4 e M4.1

<400> 30

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asp Asp Asp Trp Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 31
<211> 51
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência de nucleótidos que codificam CDR3 da cadeia pesada de anticorpos M4 e M4.1

<400> 31
gcaagaaggg ggaattccta tgatgggtac ttgactact ctatggacta c 51

<210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de aminoácidos da cadeia pesada CDR3 de anticorpos M4 e M4.1

<400> 32

Ala Arg Arg Gln Asn Ser Tyr Asp Gln Tyr Phe Asp Tyr Ser Met Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 33
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleótidos que codificam domínio variável da cadeia pesada de anticorpos M4 e M4.1

<400> 33
 cagggtcccaac tgcaggagag cgggccaggt cttgtgagac ctaccagac cctgagcctg 60
 acctgcaccg cgtctggcta caccctcact gactatgtta tacactgggt gaacacagcca 120
 cctggaacgag gtcttgagtg gattggatat attaatcctt atgatgatga tactacctac 180
 aaccagaagt tcaagggcag agtgacaatg ctggtagaca ccagctccaa cacagcctac 240
 ctgagactca gcagcgtgac agccgaggac accgcggtct attattgtgc aagaaggggg 300
 aattcctatg atggttactt tgactactct atggactac 339

<210> 34
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de aminoácidos de domínio variável da cadeia pesada de anticorpos M4 e M4.1

<400> 34

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

Tre Leu Ser Leu Tre Cys Tre Ala Ser Gln Tyr Tre Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gln Thr Ile Asn Pro Thr Asp Asp Asp Tre Tre Thr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gln Arg Val Tre Met Leu Val Asp Tre Ser Ser Asn Tre Ala Thr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gln Asn Ser Thr Asp Gln Thr Phe Asp Thr Ser Met Asp
100 105 110

Thr

<210> 35
<211> 2477
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

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

Leu Gln Tre Ala Val Pro Ser Tre Gln Ala Ser Lys Ser Lys Arg Gln
20 25 30

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

Lys Pro Gln Cys Thr Asp Asn Gln Lys His Thr Gln Ile Asn Gln Gln
50 55 60

Trp Glu Arg Tre Thr Leu Gln Asn Ala Leu Val Cys Tre Cys Thr Gln
65 70 75 80

Gln Ser Arg Gln Phe Asn Cys Glu Ser Lys Pro Glu Ala Glu Glu Tre
85 90 95

Cys Phe Asp Lys Thr Tre Gln Asn Tre Thr Arg Val Gln Asp Tre Thr
100 105 110

Glu Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cys Tre Cys Ile Gln Ala

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

Arg Trp Fen Tir Ser Cys Thr Thr Glu Gln Arg Gln Asp Gln His Leu
 370 375 380

Trp Cys Ser Tre Tre Ser Asn Tir Glu Gln Asp Gln Lis Tir Ser Fen
 385 390 395 400

Cys Tre Asp His Tre Val Leu Val Gln Tre Arg Gln Gln Asn Ser Asn
 405 410 415

Gln Ala Leu Cys His Fen Pro Fen Leu Tir Asn Asn His Asn Tir Tre
 420 425 430

Asp Cys Tre Ser Glu Gln Arg Arg Asp Asn Met Lis Trp Cys Gln Tre
 435 440 445

Tre Gln Asn Tir Asp Ala Asp Gln Lis Fen Gln Fen Cys Pro Met Ala
 450 455 460

Ala His Glu Glu Ile Cys Tre Tre Asn Glu Gln Val Met Tir Arg Ile
 465 470 475 480

Gln Asp Gln Trp Asp Lis Gln His Asp Met Gln His Met Met Arg Cys
 485 490 495

Tre Cys Val Gln Asn Gln Arg Gln Glu Trp Tre Cys Ile Ala Tir Ser
 500 505 510

Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile Tre Tir Asn Val Asn
 515 520 525

Asp Tre Fen His Lis Arg His Glu Glu Gln His Met Leu Asn Cys Tre
 530 535 540

Cys Fen Gln Gln Gln Arg Gln Arg Trp Lis Cys Asp Pro Val Asp Gln
 545 550 555 560

Cys Gln Asp Ser Glu Tre Gln Tre Fen Tir Gln Ile Gln Asp Ser Trp
 565 570 575

Glu Lis Tir Val His Gln Val Arg Tir Gln Cys Tir Cys Tir Gln Arg
 580 585 590

Gln Ile Gln Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln Tre Tir Pro Ser Ser
 595 600 605

Ser Gln Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro Asn
 610 615 620
 Ser His Pro Ile Gln Trp Asn Ala Pro Gln Pro Ser His Ile Ser Lys
 625 630 635 640
 Thr Ile Leu Arg Trp Arg Pro Lys Asn Ser Val Gln Arg Trp Lys Glu
 645 650 655
 Ala Thr Ile Pro Gln His Leu Asn Ser Thr Thr Ile Lys Gln Leu Lys
 660 665 670
 Pro Gln Val Val Thr Glu Gln Gln Leu Ile Ser Ile Gln Gln Thr Gln
 675 680 685
 His Gln Glu Val Thr Arg Phe Asp Phe Thr Thr Thr Ser Thr Ser Thr
 690 695 700
 Pro Val Thr Ser Asn Thr Val Thr Gln Glu Thr Thr Pro Phe Ser Pro
 705 710 715 720
 Leu Val Ala Thr Ser Glu Ser Val Thr Glu Ile Thr Ala Ser Ser Phe
 725 730 735
 Val Val Ser Trp Val Ser Ala Ser Asp Thr Val Ser Gln Phe Arg Val
 740 745 750
 Glu Thr Glu Leu Ser Glu Glu Gln Asp Glu Pro Gln Thr Leu Asp Leu
 755 760 765
 Pro Ser Thr Ala Thr Ser Val Asn Ile Pro Asp Leu Leu Pro Gln Arg
 770 775 780
 Lys Thr Ile Val Asn Val Thr Gln Ile Ser Glu Asp Gln Glu Gln Ser
 785 790 795 800
 Leu Ile Leu Ser Thr Ser Gln Thr Thr Ala Pro Asp Ala Pro Pro Asp
 805 810 815
 Pro Thr Val Asp Gln Val Asp Asp Thr Ser Ile Val Val Arg Trp Ser
 820 825 830
 Arg Pro Gln Ala Pro Ile Thr Gln Thr Arg Ile Val Thr Ser Pro Ser
 835 840 845

Val Glu Glu Ser Ser Tre Glu Leu Asn Leu Pro Glu Tre Ala Asn Ser
850 855 860
Val Tre Leu Ser Asp Leu Gln Pro Glu Val Gln Tir Asn Ile Tre Ile
865 870 875 880
Tir Ala Val Glu Glu Asn Gln Glu Ser Tre Pro Val Val Ile Gln Gln
885 890 895
Glu Tre Tre Glu Tre Pro Arg Ser Asp Tre Val Pro Ser Pro Arg Asp
900 905 910
Leu Gln Fen Val Glu Val Tre Asp Val Lis Val Tre Ile Met Trp Tre
915 920 925
Pro Pro Glu Ser Ala Val Tre Glu Tir Arg Val Asp Val Ile Pro Val
930 935 940
Asn Leu Pro Glu Glu His Glu Gln Arg Leu Pro Ile Ser Arg Asn Tre
945 950 955 960
Fen Ala Glu Val Tre Glu Leu Ser Pro Glu Val Tre Tir Tir Fen Lis
965 970 975
Val Fen Ala Val Ser His Glu Arg Glu Ser Lis Pro Leu Tre Ala Gln
980 985 990
Gln Tre Tre Lis Leu Asp Ala Pro Tre Asn Leu Gln Fen Val Asn Glu
995 1000 1005
Tre Asp Ser Tre Val Leu Val Arg Trp Tre Pro Pro Arg Ala Gln
1010 1015 1020
Ile Tre Glu Tir Arg Leu Tre Val Glu Leu Tre Arg Arg Glu Gln
1025 1030 1035
Pro Arg Gln Tir Asn Val Glu Pro Ser Val Ser Lis Tir Pro Leu
1040 1045 1050
Arg Asn Leu Gln Pro Ala Ser Glu Tir Tre Val Ser Leu Val Ala
1055 1060 1065
Ile Lis Glu Asn Gln Glu Ser Pro Lis Ala Tre Glu Val Fen Tre
1070 1075 1080
Tre Leu Gln Pro Glu Ser Ser Ile Pro Pro Tir Asn Tre Glu Val

1085		1090		1095
Tre Glu Tre Tre Ile Val	Ile Tre Trp Tre Pro	Ala Pro Arg Ile		
1100	1105	1110		
Gli Fen Lis Leu Gli Val Arg	Pro Ser Gln Gli	Gli Glu Ala Pro		
1115	1120	1125		
Arg Glu Val Tre Ser Asp Ser	Gli Ser Ile Val Val	Ser Gli Leu		
1130	1135	1140		
Tre Pro Gli Val Glu Tir Val	Tir Tre Ile Gln Val	Leu Arg Asp		
1145	1150	1155		
Gli Gln Glu Arg Asp Ala Pro	Ile Val Asn Lis Val	Val Tre Pro		
1160	1165	1170		
Leu Ser Pro Pro Tre Asn Leu	His Leu Glu Ala Asn	Pro Asp Tre		
1175	1180	1185		
Gli Val Leu Tre Val Ser Trp	Glu Arg Ser Tre Tre	Pro Asp Ile		
1190	1195	1200		
Tre Gli Tir Arg Ile Tre Tre	Tre Pro Tre Asn Gli	Gln Gln Gli		
1205	1210	1215		
Asn Ser Leu Glu Glu Val Val	His Ala Asp Gln Ser	Ser Cys Thr		
1220	1225	1230		
Fen Asp Asn Leu Ser Pro Gli	Leu Glu Tir Asn Val	Ser Val Tir		
1235	1240	1245		
Tre Val Lis Asp Asp Lis Glu	Ser Val Pro Ile Ser	Asp Tre Ile		
1250	1255	1260		
Ile Pro Glu Val Pro Gln Leu	Tre Asp Leu Ser Fen	Val Asp Ile		
1265	1270	1275		
Tre Asp Ser Ser Ile Gli Leu	Arg Trp Tre Pro Leu	Asn Ser Ser		
1280	1285	1290		
Tre Ile Ile Gli Tir Arg Ile	Tre Val Val Ala Ala	Gli Glu Gli		
1295	1300	1305		
Ile Pro Ile Fen Glu Asp Fen	Val Asp Ser Ser Val	Gli Tir Tir		
1310	1315	1320		

Tre	Val	Tre	Gli	Leu	Glu	Pro	Gli	Ile	Asp	Tir	Asp	Ile	Ser	Val
1325						1330					1335			
Ile	Tre	Leu	Ile	Asn	Gli	Gli	Glu	Ser	Ala	Pro	Tre	Tre	Leu	Tre
1340						1345					1350			
Gln	Gln	Tre	Ala	Val	Pro	Pro	Pro	Tre	Asp	Leu	Arg	Phe	Tre	Asn
1355						1360					1365			
Ile	Gli	Pro	Asp	Tre	Met	Arg	Val	Tre	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
1370						1375					1380			
Ile	Asp	Leu	Tre	Asn	Phe	Leu	Val	Arg	Tir	Ser	Pro	Val	Lis	Asn
1385						1390					1395			
Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu	Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala
1400						1405					1410			
Val	Val	Leu	Tre	Asn	Leu	Leu	Pro	Gli	Tre	Glu	Tir	Val	Val	Ser
1415						1420					1425			
Val	Ser	Ser	Val	Tir	Glu	Gln	His	Glu	Ser	Tre	Pro	Leu	Arg	Gli
1430						1435					1440			
Arg	Gln	Lis	Tre	Gli	Leu	Asp	Ser	Pro	Tre	Gli	Ile	Asp	Phe	Ser
1445						1450					1455			
Asp	Ile	Tre	Ala	Asn	Ser	Phe	Tre	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg
1460						1465					1470			
Ala	Tre	Ile	Tre	Gli	Tyr	Arg	Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe
1475						1480					1485			
Ser	Gli	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser
1490						1495					1500			
Ile	Tre	Leu	Tre	Asn	Leu	Tre	Pro	Gli	Tre	Glu	Tir	Val	Val	Ser
1505						1510					1515			
Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gli	Arg	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gli
1520						1525					1530			
Gln	Gln	Ser	Tre	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val
1535						1540					1545			

Ala	Ala	Tre	Pro	Tre	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala
1550						1555					1560			
Val	Tre	Val	Arg	Tir	Tir	Arg	Ile	Tre	Tir	Gli	Glu	Tre	Gli	Gli
1565						1570					1575			
Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Pen	Tre	Val	Pro	Gli	Ser	Lis	Ser	Tre
1580						1585					1590			
Ala	Tre	Ile	Ser	Gli	Leu	Lis	Pro	Gli	Val	Asp	Tir	Tre	Ile	Tre
1595						1600					1605			
Val	Tir	Ala	Val	Tre	Gli	Arg	Gli	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lis
1610						1615					1620			
Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tir	Arg	Tre	Glu	Ile	Asp	Lis	Pro	Ser	Gln
1625						1630					1635			
Met	Gln	Val	Tre	Asp	Val	Gln	Asp	Asn	Ser	Ile	Ser	Val	Lis	Trp
1640						1645					1650			
Leu	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Val	Tre	Gli	Tir	Arg	Val	Tre	Tre	Tre
1655						1660					1665			
Pro	Lis	Asn	Gli	Pro	Gli	Pro	Tre	Lis	Tre	Lis	Thr	Ala	Gli	Pro
1670						1675					1680			
Asp	Gln	Tre	Glu	Met	Tre	Ile	Glu	Gli	Leu	Gln	Pro	Tre	Val	Glu
1685						1690					1695			
Tir	Val	Val	Ser	Val	Tir	Ala	Gln	Asn	Pro	Ser	Gli	Glu	Ser	Gln
1700						1705					1710			
Pro	Leu	Val	Gln	Tre	Ala	Val	Tre	Asn	Ile	Asp	Arg	Pro	Lis	Gli
1715						1720					1725			
Leu	Ala	Pen	Tre	Asp	Val	Asp	Val	Asp	Ser	Ile	Lis	Ile	Ala	Trp
1730						1735					1740			
Glu	Ser	Pro	Gln	Gli	Gln	Val	Ser	Arg	Tir	Arg	Val	Tre	Tir	Ser
1745						1750					1755			
Ser	Pro	Glu	Asp	Gli	Ile	His	Glu	Leu	Pen	Pro	Ala	Pro	Asp	Gli
1760						1765					1770			

Glu	Glu	Asp	Tre	Ala	Glu	Leu	Gln	Gli	Leu	Arg	Pro	Gli	Ser	Glu
1775						1780					1785			
Tir	Tre	Val	Ser	Val	Val	Ala	Leu	His	Asp	Asp	Met	Glu	Ser	Gln
1790						1795					1800			
Pro	Leu	Ile	Gli	Tre	Gln	Ser	Tre	Ala	Ile	Pro	Ala	Pro	Tre	Asp
1805						1810					1815			
Leu	Lis	Phe	Tre	Gln	Val	Tre	Pro	Tre	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Trp
1820						1825					1830			
Tre	Pro	Pro	Asn	Val	Gln	Leu	Tre	Gli	Tir	Arg	Val	Arg	Val	Tre
1835						1840					1845			
Pro	Lis	Glu	Lis	Tre	Gli	Pro	Met	Lis	Glu	Ile	Asn	Leu	Ala	Pro
1850						1855					1860			
Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Ser	Gli	Leu	Met	Val	Ala	Tre	Lis
1865						1870					1875			
Tir	Glu	Val	Ser	Val	Tir	Ala	Leu	Lis	Asp	Tre	Leu	Tre	Ser	Arg
1880						1885					1890			
Pro	Ala	Gln	Gli	Val	Val	Tre	Tre	Leu	Glu	Asn	Val	Ser	Pro	Pro
1895						1900					1905			
Arg	Arg	Ala	Arg	Val	Tre	Asp	Ala	Tre	Glu	Tre	Tre	Ile	Tre	Ile
1910						1915					1920			
Ser	Trp	Arg	Tre	Lis	Tre	Glu	Tre	Ile	Tre	Gli	Phe	Gln	Val	Asp
1925						1930					1935			
Ala	Val	Pro	Ala	Asn	Gli	Gln	Tre	Pro	Ile	Gln	Arg	Tre	Ile	Lis
1940						1945					1950			
Pro	Asp	Val	Arg	Ser	Tir	Tre	Ile	Tre	Gli	Leu	Gln	Pro	Gli	Tre
1955						1960					1965			
Asp	Tir	Lis	Ile	Tir	Leu	Tir	Tre	Leu	Asn	Asp	Asn	Ala	Arg	Ser
1970						1975					1980			
Ser	Pro	Val	Val	Ile	Asp	Ala	Ser	Tre	Ala	Ile	Asp	Ala	Pro	Ser
1985						1990					1995			
Asn	Leu	Arg	Phe	Leu	Ala	Tre	Tre	Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser

2000	2005	2010
Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg 2015	Ile Tre Gln Tir 2020	Ile Ile Lis Tir 2025
Glu Lis Pro Gln Ser Pro Pro 2030	Arg Glu Val Val 2035	Pro Arg Pro Arg 2040
Pro Gln Val Tre Glu Ala Tre 2045	Ile Tre Gln Leu Glu 2050	Pro Gln Tre 2055
Glu Tir Tre Ile Tir Val Ile 2060	Ala Leu Lis Asn Asn 2065	Gln Lis Ser 2070
Gln Pro Leu Ile Gln Arg Lis 2075	Lis Tre Asp Glu Leu 2080	Pro Gln Leu 2085
Val Tre Leu Pro His Pro Asn 2090	Leu His Gln Pro Glu 2095	Ile Leu Asp 2100
Val Pro Ser Tre Val Gln Lis 2105	Tre Pro Fen Val Tre 2110	His Pro Gln 2115
Tir Asp Tre Gln Asn Gln Ile 2120	Gln Leu Pro Gln Tre 2125	Ser Gln Gln 2130
Gln Pro Ser Val Gln Gln Gln 2135	Met Ile Fen Glu Glu 2140	His Gln Fen 2145
Arg Arg Tre Tre Pro Pro Tre 2150	Tre Ala Tre Pro Ile 2155	Arg His Arg 2160
Pro Arg Pro Tir Pro Pro Asn 2165	Val Gln Glu Glu Ile 2170	Gln Ile Gln 2175
His Ile Pro Arg Glu Asp Val 2180	Asp Tir His Leu Tir 2185	Pro His Gln 2190
Pro Gln Leu Asn Pro Asn Ala 2195	Ser Tre Gln Gln Glu 2200	Ala Leu Ser 2205
Gln Tre Tre Ile Ser Trp Ala 2210	Pro Fen Gln Asp Tre 2215	Ser Glu Tir 2220
Ile Ile Ser Cys His Pro Val 2225	Gln Tre Asp Glu Glu 2230	Pro Leu Gln 2235

Fen Arg	Val Pro	Glu Tre	Ser	Tre Ser	Ala Tre	Leu Tre	Glu Leu
2240			2245			2250	
Tre Arg	Glu Ala	Tre Tir	Asn	Ile Ile	Val Glu	Ala Leu	Lis Asp
2255			2260			2265	
Gln Gln	Arg His	Lis Val	Arg	Glu Glu	Val Val	Tre Val	Glu Asn
2270			2275			2280	
Ser Val	Asn Glu	Glu Leu	Asn	Gln Pro	Tre Asp	Asp Ser	Cis Phe
2285			2290			2295	
Asp Pro	Tir Tre	Val Ser	His	Tir Ala	Val Glu	Asp Glu	Trp Glu
2300			2305			2310	
Arg Met	Ser Glu	Ser Glu	Fen	Lis Leu	Leu Cis	Gln Cis	Leu Glu
2315			2320			2325	
Fen Glu	Ser Glu	His Fen	Arg	Cis Asp	Ser Ser	Arg Trp	Cis His
2330			2335			2340	
Asp Asn	Glu Val	Asn Tir	Lis	Ile Glu	Glu Lis	Trp Asp	Arg Gln
2345			2350			2355	
Glu Glu	Asn Glu	Gln Met	Met	Ser Cis	Tre Cis	Leu Glu	Asn Glu
2360			2365			2370	
Lis Glu	Glu Fen	Lis Cis	Asp	Pro His	Glu Ala	Tre Cis	Tir Asp
2375			2380			2385	
Asp Glu	Lis Tre	Tir His	Val	Glu Glu	Gln Trp	Gln Lis	Glu Tir
2390			2395			2400	
Leu Glu	Ala Ile	Cis Ser	Cis	Tre Cis	Fen Glu	Glu Gln	Arg Glu
2405			2410			2415	
Trp Arg	Cis Asp	Asn Cis	Arg	Arg Pro	Glu Glu	Glu Pro	Ser Pro
2420			2425			2430	
Glu Glu	Tre Tre	Glu Gln	Ser	Tir Asn	Gln Tir	Ser Gln	Arg Tir
2435			2440			2445	
His Gln	Arg Tre	Asn Tre	Asn	Val Asn	Cis Pro	Ile Glu	Cis Fen
2450			2455			2460	

Met Pro Leu Asp Val Gln Ala Asp Arg Glu Asp Ser Arg Glu
2465 2470 2475

Lisboa, 7 de Março de 2014.

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio que se ligue especificamente à endosialina e que iniba a interacção da endosialina expressa na superfície de uma célula com colagénio ou fibronectina, para uso na inibição de neovascularização ou angiogénese no neoplasma de um sujeito.

2. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio para uso de acordo com a reivindicação 1, em que o referido anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio não se liga à endosialina de murina.

3. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o valor da afinidade de ligação do dito anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio para a endosialina é menor que 1×10^{-7} M.

4. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio é um anticorpo quimérico ou fragmento de ligação ao antigénio quimérico, ou é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antigénio humanizado.

5. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreende uma cadeia pesada incluindo CDR1 da SEQ ID NO: 28, CR2 da SEQ ID NO: 30 e CDR3 da SEQ ID

NO: 32 e uma cadeia leve incluindo CDR1 da SEQ ID NO: 13, CDR2 da SEQ ID NO: 15 e CDR3 da SEQ ID NO: 17.

6. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio para uso de acordo com a reivindicação 5, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreende uma cadeia pesada incluindo um domínio variável da SEQ ID NO: 34 e uma cadeia leve incluindo um domínio variável da SEQ ID NO: 19.

7. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio para uso de acordo com a reivindicação 6, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio compreende uma cadeia pesada incluindo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22 ou 26 e uma cadeia leve incluindo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11.

8. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo é produzido por células que têm o número de acesso ATCC: PTA-7554 ou o número de acesso ATCC: PTA-9017.

9. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida célula é uma célula de mamífero.

10. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida célula é uma célula neoplásica.

Lisboa, 7 de Março de 2014.

MÉTODOS PARA INIBIR A LIGAÇÃO DA ENDOSIALINA A LIGANDOS

RESUMO

A invenção proporciona métodos para inibir a interacção da endosialina com ligandos da endosialina. A inibição é efectuada bloqueando a interacção da endosialina expressa na superfície de uma célula com os ligandos tais como fibronectina e colagénio com um anticorpo anti-endosialina.

1/17

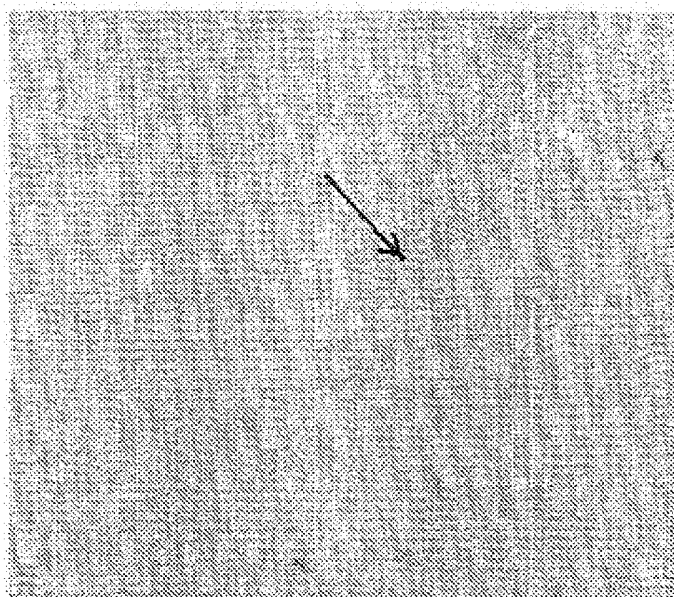


FIG. 1A

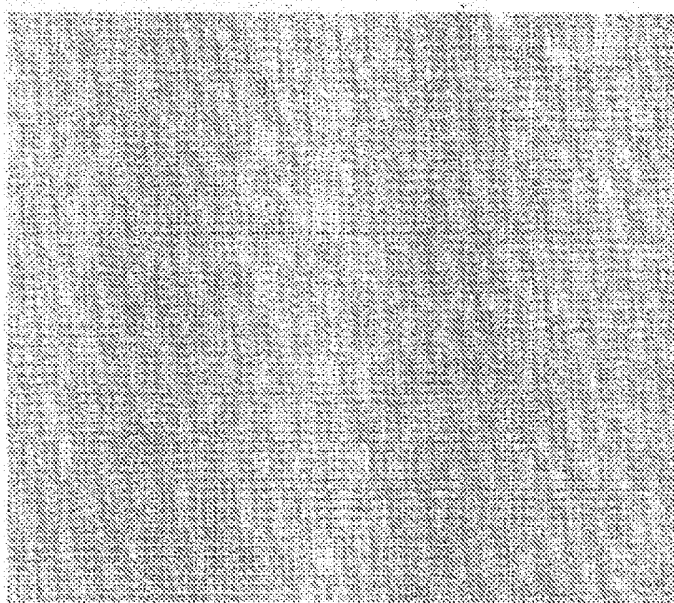


FIG. 1B

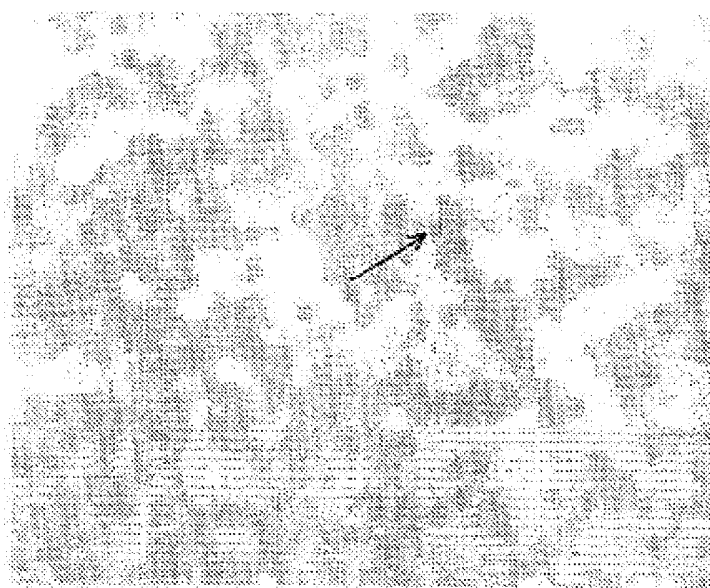


FIG. 2A

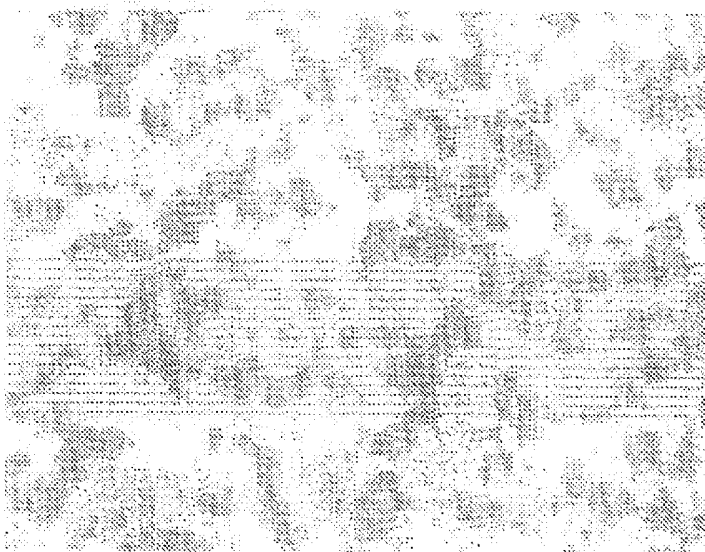


FIG. 2B

3/17

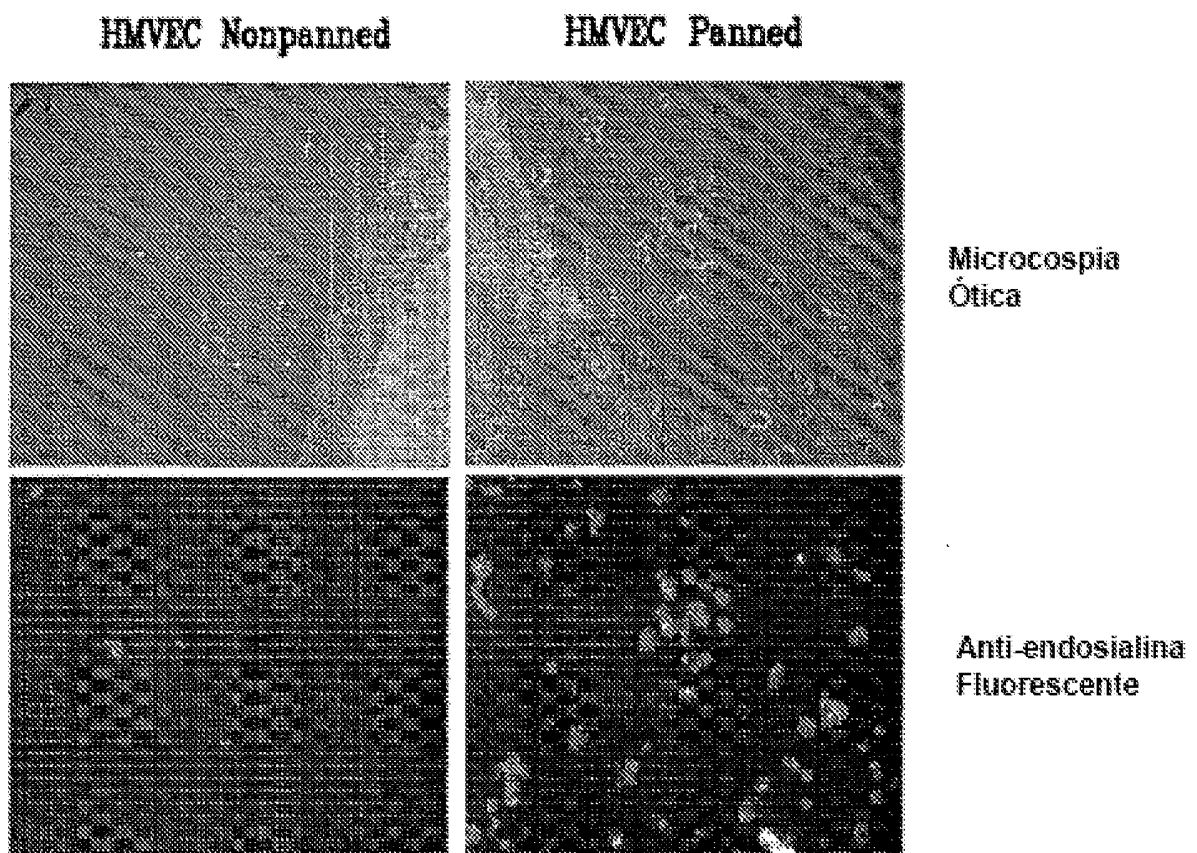


FIG. 3

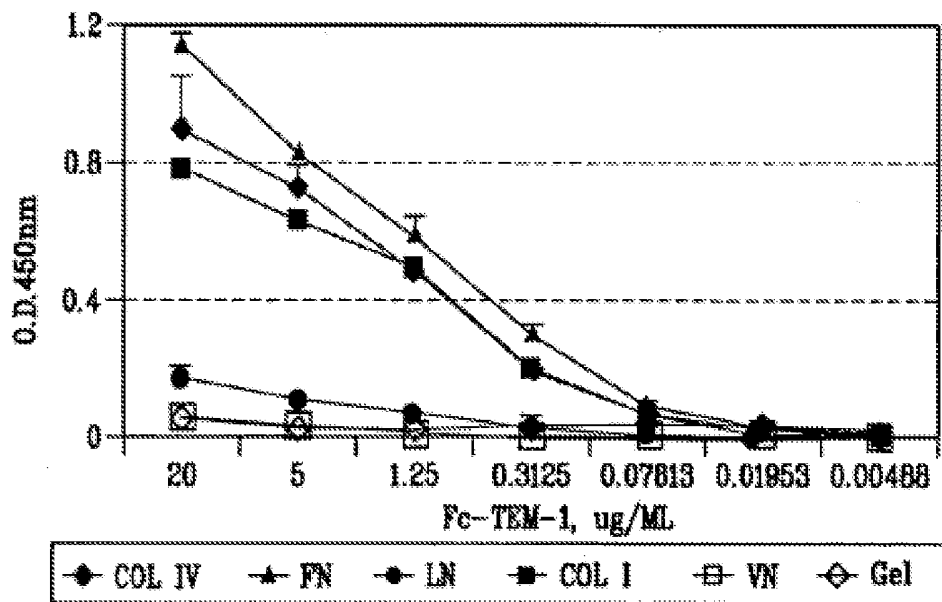


FIG. 4A

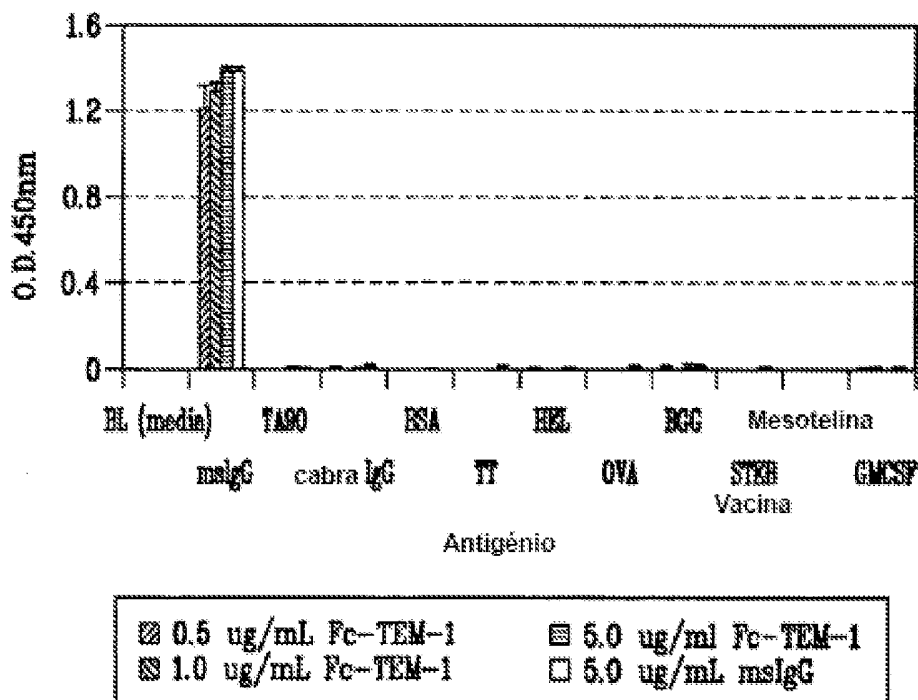


FIG. 4B

5/17

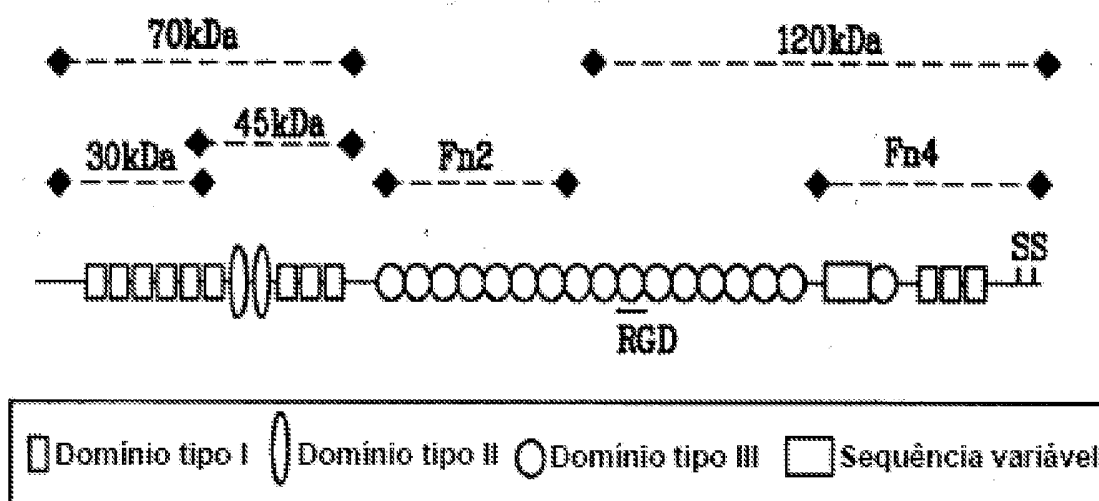


FIG. 5

6/17

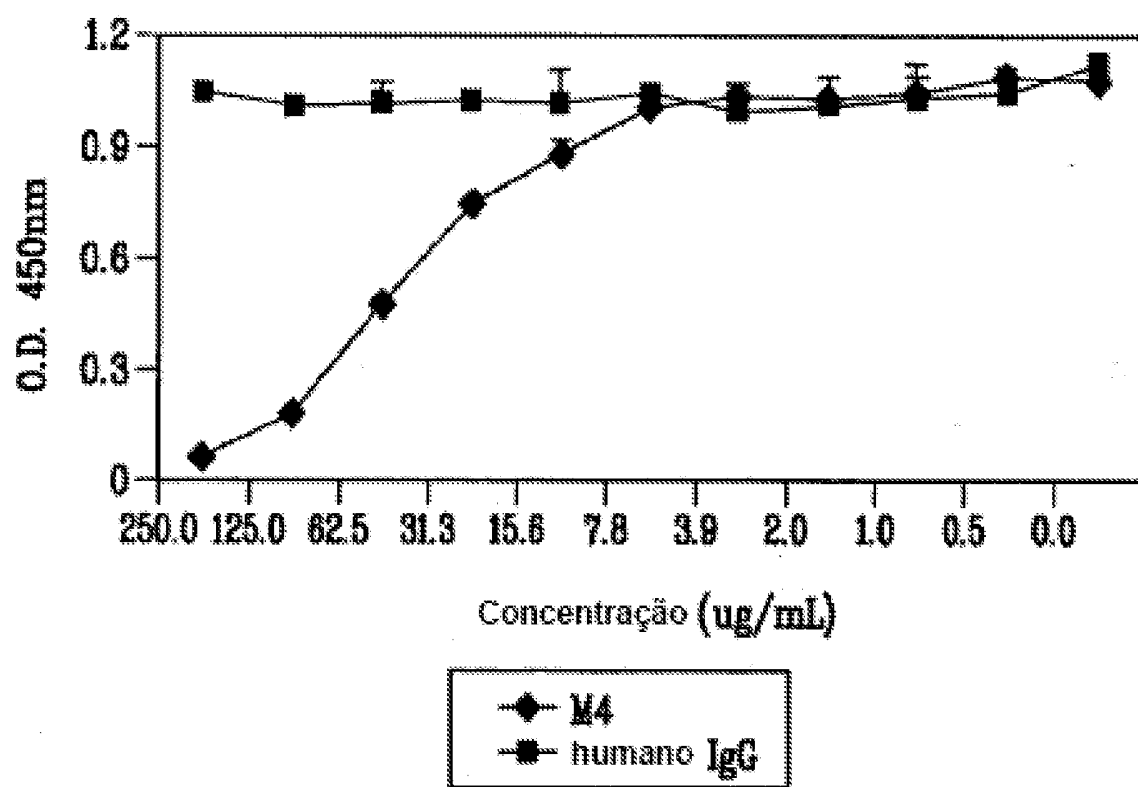


FIG. 6

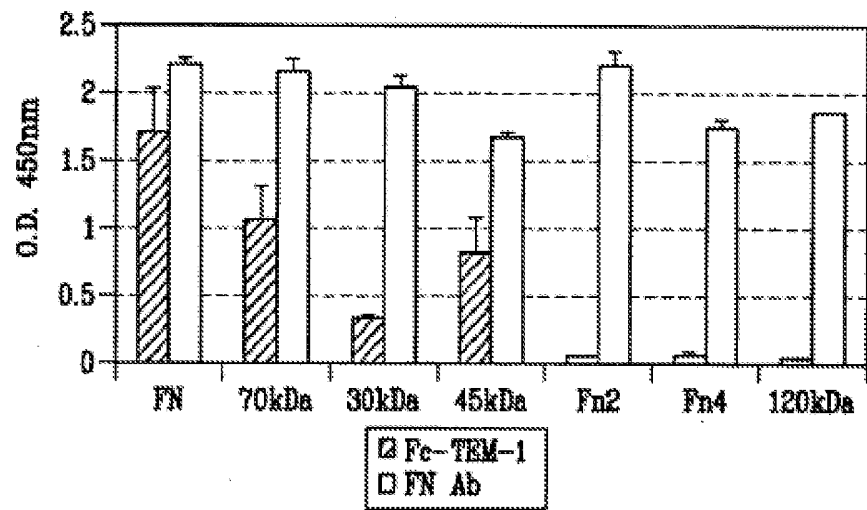


FIG. 7A

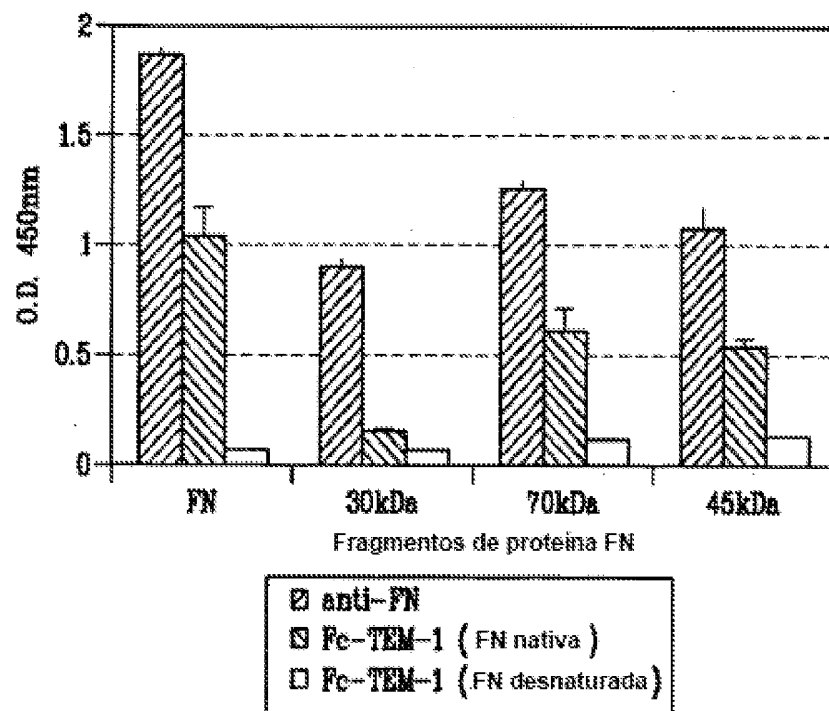


FIG. 7B

8/17

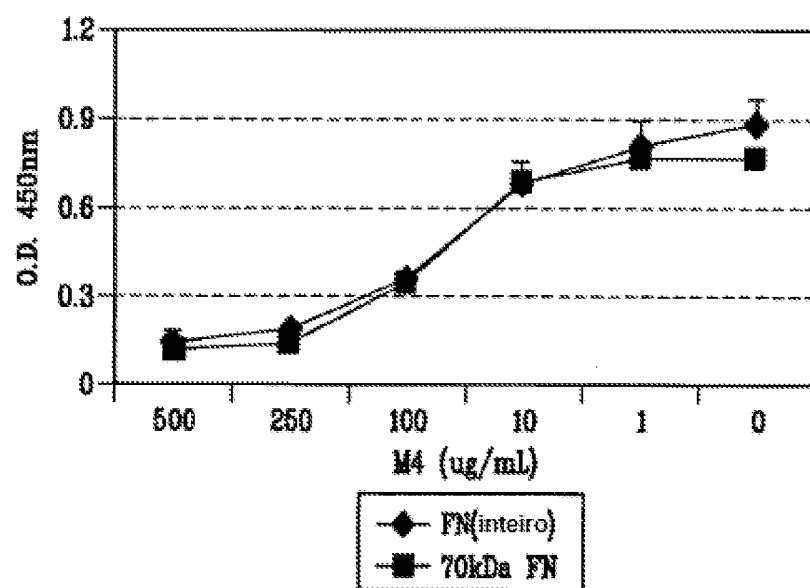


FIG. 7C

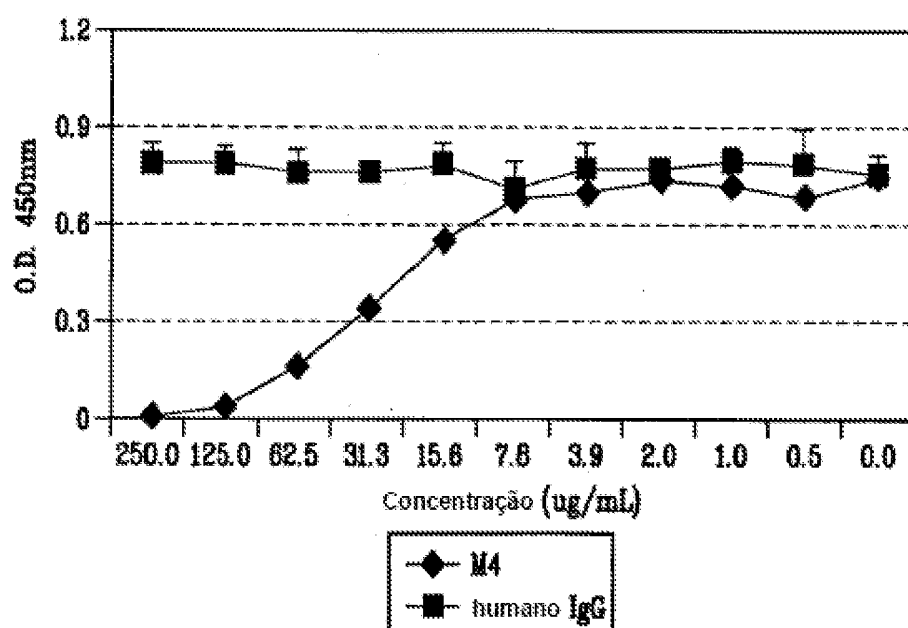


FIG. 7D

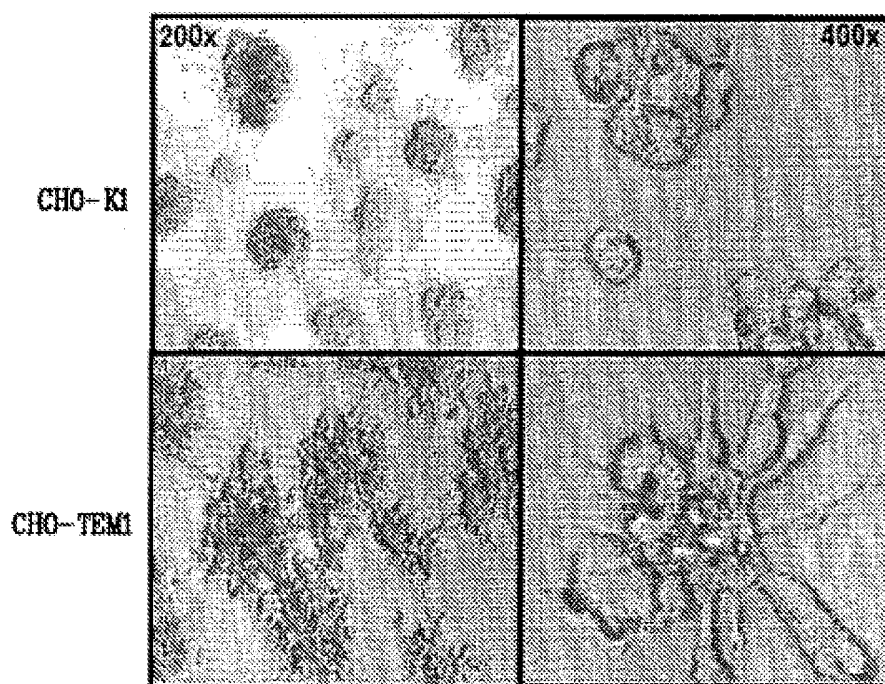
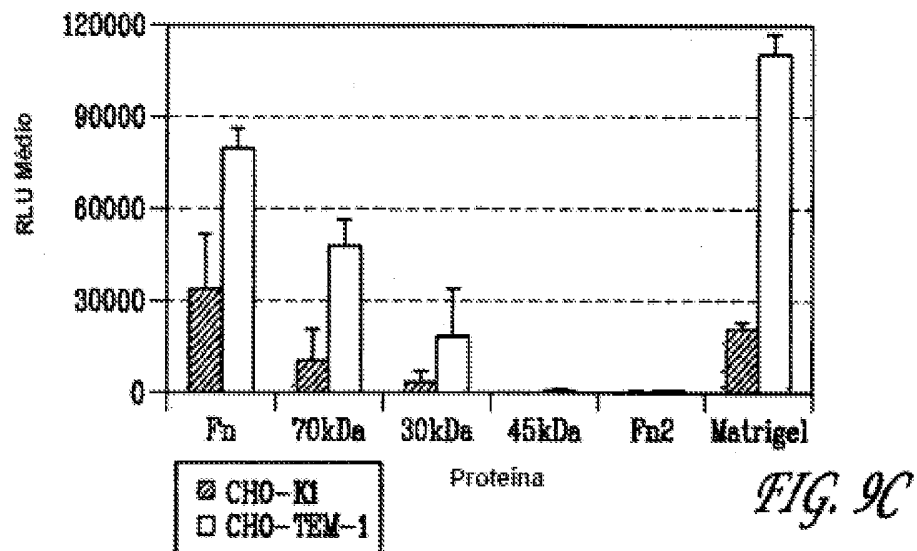
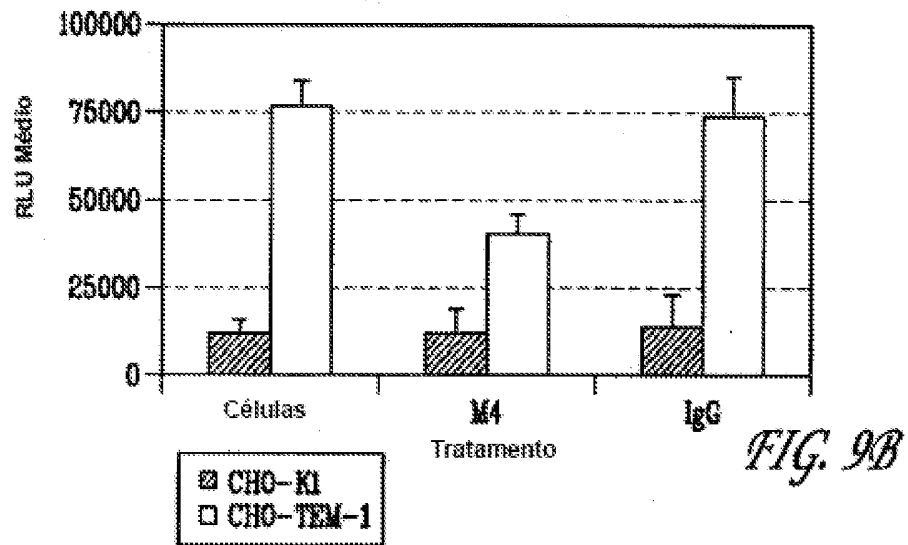
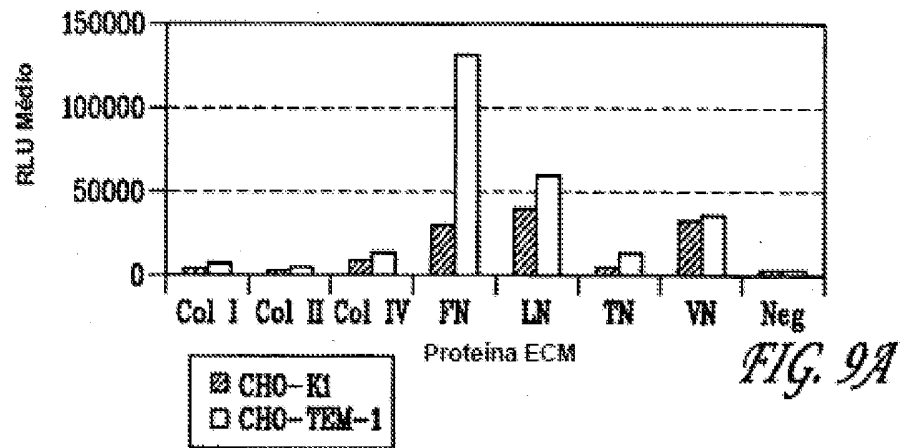


FIG. 8

10/17



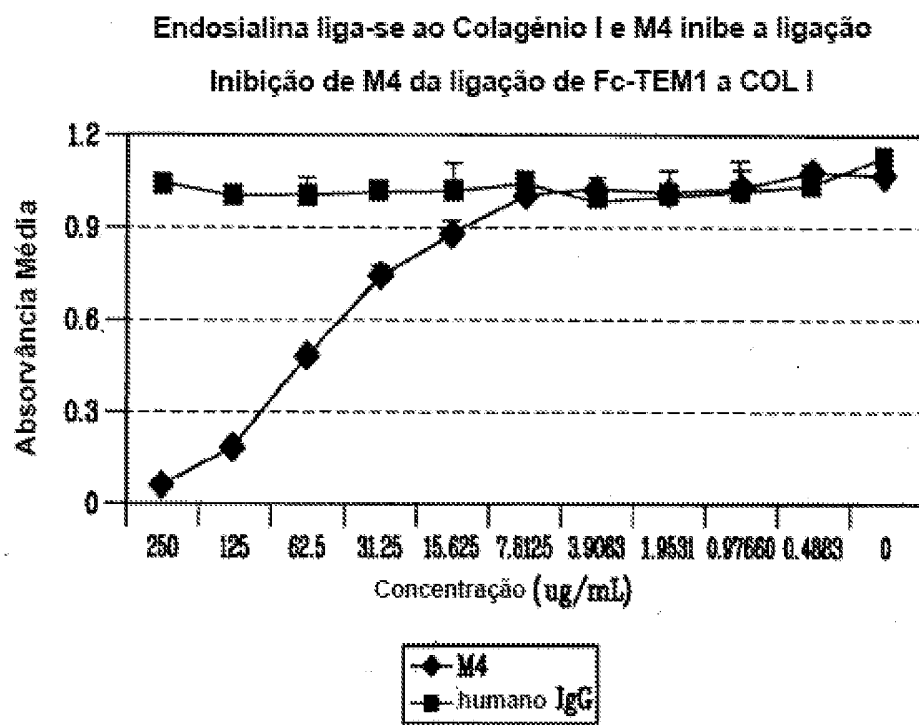


FIG. 10

12/17

Endosialina aumenta a adesão celular ao colagênio
Adesão de CHO-K1 e CHO-TEM1 a placa revestido com COL I

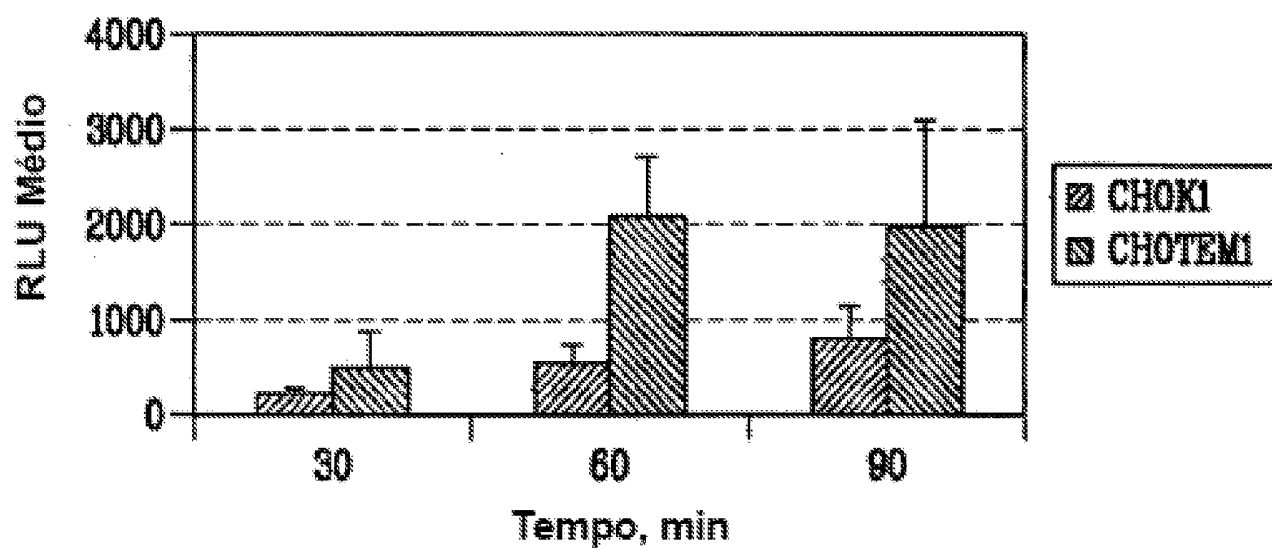
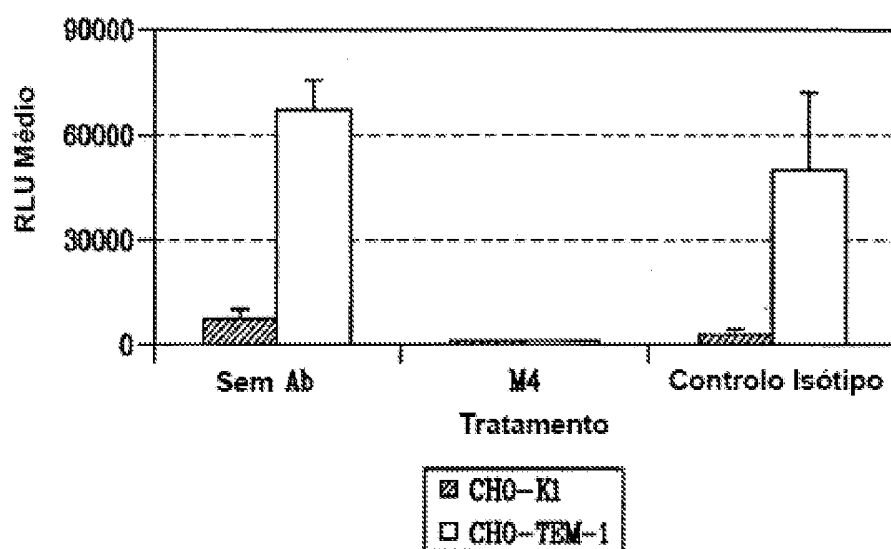
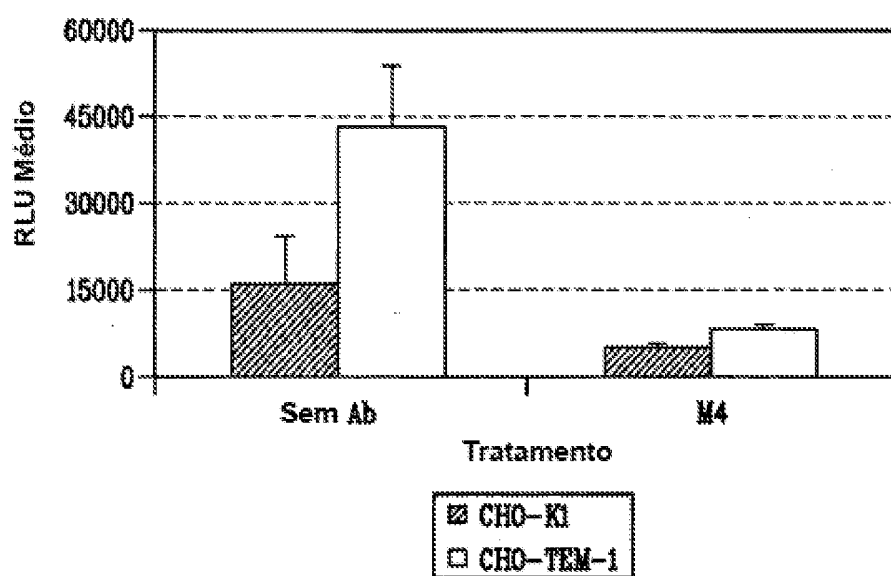


FIG. 11

*FIG. 12A**FIG. 12B*

14/17

CHO-
CHO-K1 TEM-1 MMP-2/9

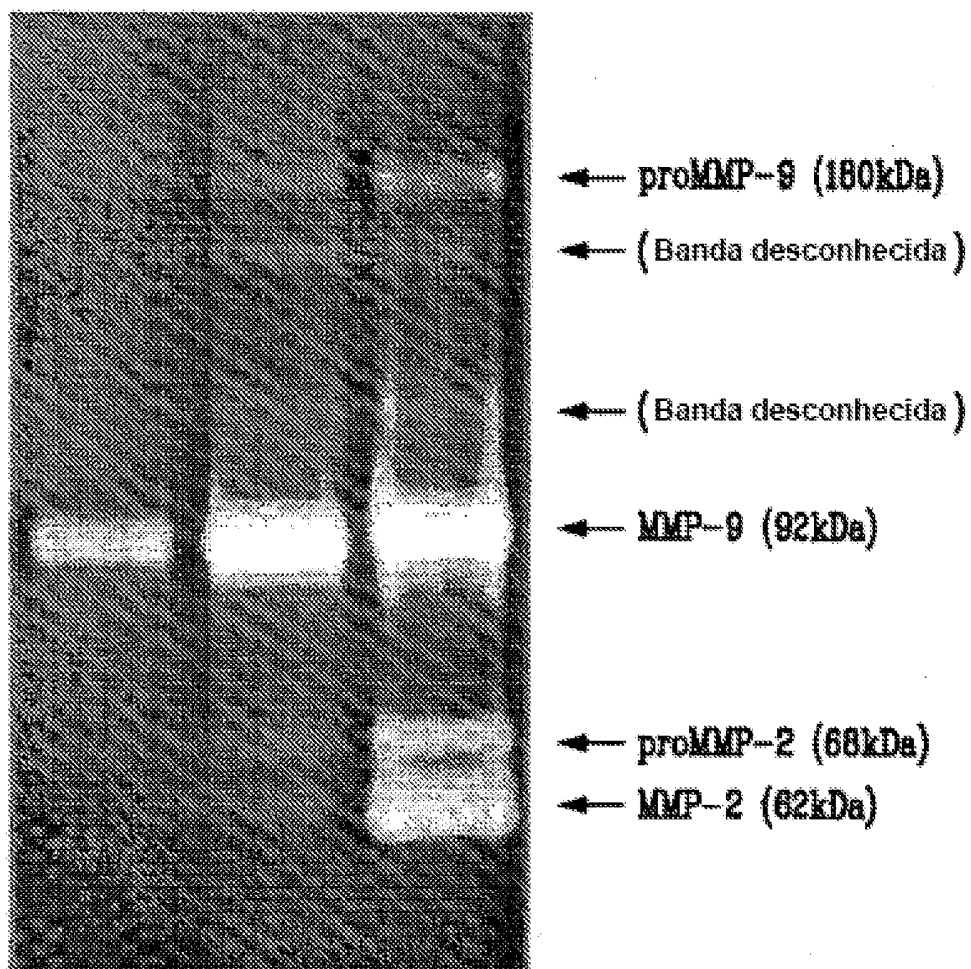


FIG. 13

Expressão total da integrina $\beta 1$ em células 293T
e 293T/TEM1 +/- M4

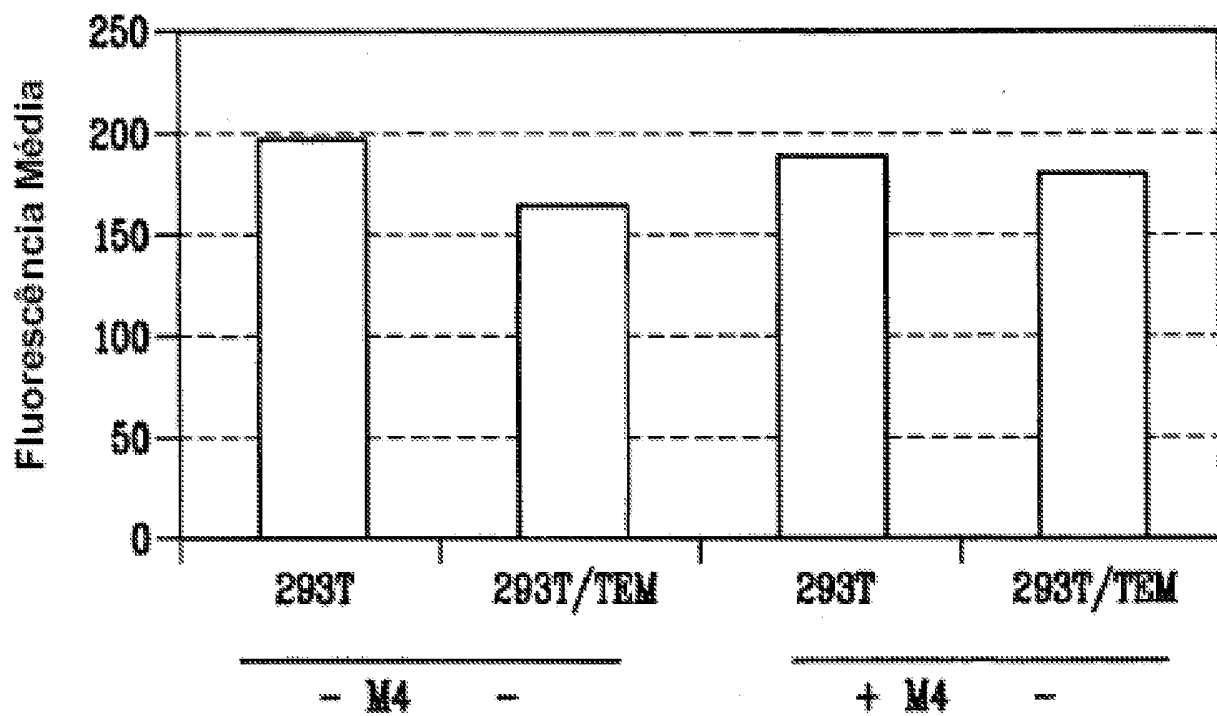


FIG. 14A

Expressão da Integrina $\beta 1$ activa em células 293T e 293T/TEM1 +/- M4

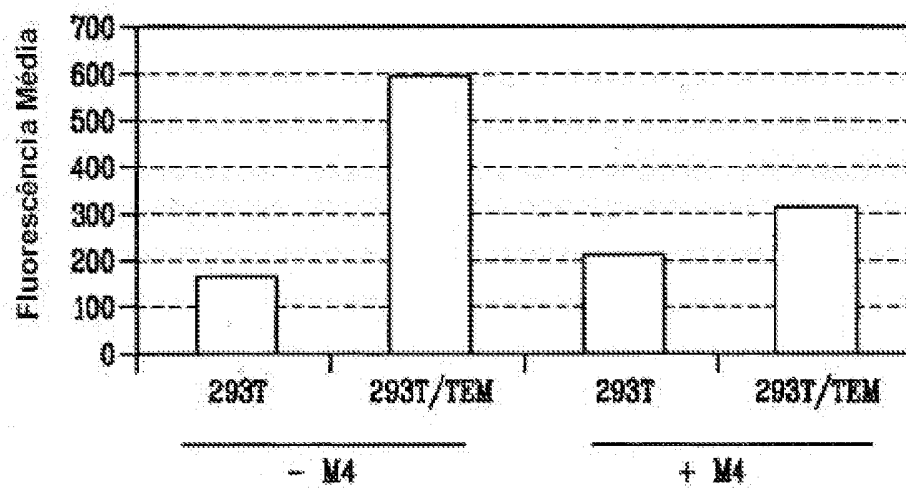


FIG. 14B

