

(11) Número de Publicação: **PT 2137217 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C07K 16/28** (2014.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2008.04.04**

(30) Prioridade(s): **2007.04.05 US 910362 P**  
**2007.10.15 US 980026 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.12.30**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.03.05**  
**056/2014**

(73) Titular(es):

**MORPHOTEK, INC.**  
**210 WELSH POOL ROAD EXTON, PA 19341 US**

(72) Inventor(es):

<b>NICHOLAS C. NICOLAIDES</b>	US
<b>PHILIP M. SASS</b>	US
<b>YUHONG ZHOU</b>	US
<b>BRIAN E. TOMKOWICZ</b>	US
<b>LUIGI GRASSO</b>	US

(74) Mandatário:

**FILIPE 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 interacção 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 angiogénesse 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 angiogénesse 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 angiogéneses, 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抗igénios 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 exameção 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 (Dolznig 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抗ígenos 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抗原 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 antisenso, 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抗原 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  $1 \times 10^{-7}$  M, com maior preferência inferior a cerca de  $1 \times 10^{-8}$  M, ainda mais preferivelmente menos do que cerca de  $1 \times 10^{-9}$  M, e mais preferencialmente ainda menos do que cerca de  $1 \times 10^{-10}$  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 antigénio 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 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. Em algumas formas de realização os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio 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 angiogénesse 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抗原 podem estar envolvidos na inibição da angiogénesse ou neovascularização *in vitro* e *in vivo*. Em alguns aspectos um anticorpo ou fragmentos de ligação ao抗原 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 angiogénesse 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 polipeptídos, 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 químéricos, 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抗原s: *Staphylococcus enterotoxina B* (SEB), ovalbumina (OVA), globulina gama de bovino (BGG), antígeno 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 dissulfito 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 supriu 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,

aboliu 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  $\beta$  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. Polyclonal 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 DETALHADA 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 contém, 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 trilitadas 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 replicão, 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 antisenso 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 "transfetada" 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 exibe 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 endosialina 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抗原, 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 angiogénesis 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 contêm 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抗igénio 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抗igénio 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 angiogénesis. 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 angiogénesis. Por conseguinte, o invento apresenta anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos para inibir a interacção de endosialina com ligandos da endosialina.

Num aspecto, a invenção caracteriza anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno 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 antisenso e abordagens baseadas em ribozimas (ver Jain, *Pharmacogenomics* (2004) 5:239-42, para um 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 um dos 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 díplex 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 duplex 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 *sirRNAs*, como descrito acima, desencadeiam a degradação de *mRNAs* para os quais estão orientados, reduzindo assim a taxa de síntese de proteína. Para além dos *sirRNAs* que actuam através da via clássica certos *sirRNAs* 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 duplex *siRNA/molde*, e em particular podem tolerar desemparelhamentos dentro da região central do duplex. De facto há evidências de que algumas inadequações podem ser desejáveis ou necessárias como *strRNAs* 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 sob 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 endosialina 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 antiseno 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 antisenso nas células.

Ácidos nucleicos antisenso 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 duplex. 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 antisenso 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 antisenso ou de ácidos nucleicos de péptidos que compreendem as sequências complementares, aquelas do *mRNA* que codificam a proteína endosialina. A tecnologia antisenso 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" (1<sup>a</sup> Edição) Marcel Dekker e referências ali citadas.

Oligonucleótidos antisenso podem ser sintetizados com uma sequência de bases que é complementar a uma porção de qualquer molécula de RNA transcrita na célula. Oligonucleótidos antisenso 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 antisenso 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 *sirRNA*, 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. Ensaios clínicos 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 <sup>38</sup>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 neoplasicamente 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 doxiciclina, 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 antisenso de comprimento total podem ser utilizadas para esta finalidade. Alternativamente podem ser utilizados oligonucleótidos antisenso marcados para regiões específicas do mRNA que são críticas para a tradução. Moléculas antisenso podem ser providenciadas *in situ* por células de transformação com uma construção de DNA que, aquando da transcrição, produz as sequências de RNA antisenso. Tais construções podem ser concebidas para produzir produtos antiseno de comprimento total ou sequências parciais. Este efeito de silenciamento de genes pode ser aumentado por sobre-produção transgénica tanto de RNA senso como antiseno 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 antígeno 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抗原 dos mesmos são usados para obstruir a interacção da endosialina expressa com ligandos da endosialina. Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao抗原 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抗原 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抗原 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抗原 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 biespecíficos, diacorpos e moléculas de cadeia simples, bem como as moléculas Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fabc e Fv, anticorpos de cadeia simples (Sc), cadeias leves de anticorpos individuais, cadeias pesadas de anticorpos individuais, fusões químicas entre cadeias de anticorpos e outras moléculas, monômeros ou dímeros de cadeia pesada, monômeros 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 químicos. Os anticorpos químicos e os métodos para produzi-los são bem conhecidos e estabelecidos na área. Por exemplo, um antícorpo químico pode compreender um domínio de ligação ao antigénio de um morganho com *Fc* humano, ou outro domínio estrutural.

Em algumas metodologias, os anticorpos são anticorpos humanizados. Os anticorpos humanizados podem ser imunoglobulinas químicas, 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 (antícorpo 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 (antícorpo dador) tal como o morganho, 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 antícorpo receptor nem nas sequências de CDR ou nas estruturais importadas. Estas modificações são feitas para refinar mais e optimizar o desempenho do antícorpo. Em geral, o antícorpo 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 interacções 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抗原 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抗原 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抗原 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 colecção 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 existe 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抗原 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抗原 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抗原 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抗原 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抗原 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抗igénio que competem com os anticorpos M4 e M4.1 para a ligação à endosialina. O invento contempla ainda anticorpos ou fragmentos de ligação ao抗igénio 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抗igénio alvo, tal como a endosialina ou um ligando da endosialina, que inclui uma constante de dissociação ( $K_D$ ) menor que  $1 \times 10^{-2}$  M, ou que  $1 \times 10^{-3}$  M, inferior a  $1 \times 10^{-4}$  M ou  $1 \times 10^{-5}$  M e ainda menor do que  $1 \times 10^{-6}$  M. Em outras metodologias o  $K_D$  é inferior a  $1 \times 10^{-7}$  M. O  $K_D$  pode ainda ser inferior a  $1 \times 10^{-8}$  M ou a  $1 \times 10^{-9}$  M, menos do que  $1 \times 10^{-10}$  M ou  $1 \times 10^{-11}$  M, menos de  $1 \times 10^{-12}$  M,  $1 \times 10^{-13}$  M,  $1 \times 10^{-14}$  M e ainda inferior a  $1 \times 10^{-15}$  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 subtípo 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  $\alpha$  (alfa) e outra  $\beta$  (beta). Há aproximadamente 18  $\alpha$  e 8  $\beta$  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 juxtaposto 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  $\alpha$  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 metaloproteinases 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 angiogénesis, 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: colagenase, estromalisina, gelatinase, e as MMPs do tipo membranar (MT-MMPs). MMPs do tipo colagenase 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 (colagenase intersticial); MMP-8 (colagenase de neutrófilos); MMP-13 (colagenase 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 (enamelinase); 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 angiogéneses, 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抗原 podem ser usados para inibir a angiogénesis. Os métodos podem ser levados a cabo *in vivo*. Um anticorpo ou um fragmento de ligação ao抗原 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 angiogénesis 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 angiogénesis 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  $1 \times 10^{-7}$  M, com maior preferência inferior a cerca de  $1 \times 10^{-8}$  M, menos do que  $1 \times 10^{-9}$  M e de preferência inferior a cerca de  $1 \times 10^{-10}$  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抗ígeno, 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  $1 \times 10^{-7}$  M, com maior preferência inferior a cerca de  $1 \times 10^{-8}$  M, menos do que  $1 \times 10^{-9}$  M e de preferência inferior a cerca  $1 \times 10^{-10}$  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 comprehende uma cadeia pesada que comprehende CDR1, CDR2 e CDR3 da SEQ ID NO: 28, 30 e 32, respectivamente, e uma cadeia leve que comprehende 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 enbebidos 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. Segundo 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-β1-integrina como controlo. Tal como esperado mais de 90% das células coraram positivo para α-β1-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 genómico *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<sub>b</sub> Fc $\gamma$  monomérico de murina e ligado ao vector derivado de pEF6-EK-Mm-IgG2<sub>b</sub>-Fc $\gamma$ -ND que contém uma região de reconhecimento da enteroquinase (DDDD) seguido por um domínio modificado de murina IgG2<sub>b</sub> Fc $\gamma$  (articulação (*hinge*) através CH<sub>3</sub>). Para prevenir a dimerização os quatro resíduos de cisteína responsáveis pelas pontes de dissulfíto entre cadeias pesadas foram alterados para serina. O monomérico resultante, proteína de fusão segregada consiste no domínio extracelular de TEM1 completo e murina IgG2<sub>b</sub> Fc $\gamma$ . 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-Fcγ 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 µm (*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 ft<sup>2</sup> 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 µm (*Nalgene*). TEM1-Fcγ 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 iônica 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抗igénio 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抗igénio 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.* (Temecula, 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 encontram 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 empregue 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 *EASYCYTE* (*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 ebólition 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 ebulação 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 controlo 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

controlo 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 supriu 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 $\beta$ -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 CO<sub>2</sub> 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<sup>7</sup> 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 × 10<sup>5</sup> 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 bloquou-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). Polyclonal 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  
Tomkowicz, Brian  
Grasso, Luigi  
Nicolaides, Nicholas  
Sass, Philip M.

«120» MÉTODOS PARA INIBIR A LIGAÇÃO DA ENDOSIALINA A LIGANDOS

<130> MDR-0721

<150> US 60/510,362  
<151> 2007-04-05

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

<160> 33

<170> PatentIn version 3.0

```

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

```

<400> 1	gtcaagagca gggcaggcc agagccgggc cagtgggggg gcgtcgcat gctgtgtggc	60
ctgtctgtgg cctgggtggc ccgcgtgccc gcactggcc agtccccctg gacgcctggag	120	
cctcgagccg cgtggggccc cagcagctgc taacgcgtct ttcccccgggg cgccacatcc	180	
ctggaaacctt ggcgggcgtg ccgcgaattt gggggcaacc tggccacacc gggggacccca	240	
ggggggggcc agcgigtggc cagccctggtg ggggttcgggc cggccaaacgg gctgtgtatgg	300	
atggggttgc agcggcaggc taggcattgc cagccgcage gcacactgcgg gggcttcata	360	
tggaccacgg gagaccagga caccgccttc accaactggg cccagccggc tacggssggc	420	
cactgcocca cccagcgctg tgcaagccctt gaggccagcg gagaggatcg ctggctcgaa	480	
ggctcgctca cactggctgt cgatggctac ctatgcacgt ttggttttga gggtgtccgtc	540	
cctgtccctgc cgcttgcagggt gggtcaggcc ggtccccgtg tcacccaccac acccttccac	600	
ctggtttcca gcgagttcga atggctgccc tttggcttcgg tggcagctgt gcagtgccaa	660	
gtggcaggcg gagcttcctct gtgtgtggcgg aacacgcatt caggtggcgt gggctggcc	720	
cacactggcc cgctgtggcc agggactggc tgtggccctg acaatggggg ttggcggacat	780	
gagtgtgtgg sagaggtggc cggtgctgtg tccgtccggcgt gcactgtggg cttcggtcta	840	
gcsgcagatg ggcacagttg tgaagacccc tggcggccagg ccccccgtgtga gcagragtgt	900	
aaaaacgtggc gccccacssgg cttagcttc cacttcgtcc ttggcttcgg gcccgtctaa	960	

gatgtatccac	accgttgtgt	ggcacacggat	gagtgccaga	ttgtctggtgt	gtgccagcag	1020
atgtgtgtca	actatgttgg	tggcttttag	tgttaactgca	gcgagggtca	c gagatttag	1030
gcagatgtta	tca gctgttag	ccctgcagga	gccatgggtg	cccaggcttc	ccaggatetc	1140
agagatgagt	tgctggatga	tggagaagaa	ggggaggatg	a a gaggagcc	ctgggaggac	1260
tttcatggca	cctggacaga	ggasacagggg	atcctatggc	tggcacctac	acatccac	1260
gsctttggcc	tgcctatag	gc cccatcc	ccacaggatg	gagacccca	gagattgcac	1320
ctggagccca	cctggccacc	cccacttagt	gc cccca ggg	gc cccatcc	ctctcagt	1380
gtgtctgcca	cacggcccat	ggtgtatctt	gc cactcgac	ccacactacc	ttctgcccc	1440
aagacctctg	ttat ttc agc	tacacgccc	ccctttagcc	ctgtccccc	acatgcatt	1500
gc cccctgcca	cacccccc	tgtgtatctt	gagcaccaga	tccccc	aaaggccaa	1560
tatccagacc	tgccttttgg	ccacca gct	gggataaccc	cgccca	ccagccgg	1620
tcttccgt	accagcccc	cattatctca	accaactatc	cccaatgttt	ccctccccc	1680
caggccctt	tgtctccaga	tcccccacact	atcaattatt	tgcctccat	cccccactc	1740
cttgcattcg	gggtatccaa	ttctaaagcc	catcaacacc	tttgcctcc	agatgcctca	1800
ggtacccaga	cccaggcccc	ccatgtttt	gttcagcttc	tccaggcccc	tcttccatcc	1860
aaactccagg	tttgcattcg	tgcattcc	gtgcctgtt	ccaaaccagg	ccatgttc	1920
catttttc	ccatcccccc	tca gaggccc	actaaccaga	ccatgttc	ccatgttc	1980
catccatt	ccagagcccc	tctatgtcc	gggaaaggag	ttccca	gttcatgt	2040
ccacagtc	ccatgttc	ctccatcc	gtccatcc	ccatgttc	gttcatgt	2100
gcaggccaaa	gc cccatgg	tgcctgttgg	ctgtgttgg	ccatgttgg	gc cccatgt	2160
gtttttttgg	tgggtgtgt	tgcctgggc	attgtgtact	gcactcgat	tggctccac	2220
gcaccccaaca	ggggatcc	ggactgttat	cgctgggtca	cacatgttgg	gaacaaagg	2280
tcaacagaac	ccatgc	ccatgc	cttacagggg	tacagaccc	tgcattcc	2340
gtgtgttgg	gtgcagatgc	cccttttgg	gataggaa	aggacttgc	tttggacaca	2400
tggctgagac	cacaccaagg	acttatgggg	gttgc	ccatgttgg	gggttctgtt	2460
tttggccca	gcatccatgg	caaaggacac	ccatgttgg	ccatgttgg	gggttgggt	2520
gttggatct	tctccat	atgggggtgc	ccatgttgg	aaaa	aaaa	2580
aaaa	aaaa	aaaa	aaaa	aaaa	aaaa	2640
aaaa	aaaa	aaaa	aaaa	aaaa	aaaa	2660

<210> 2  
<211> 765

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Cys Tre Leu Ala Val Asp Gly Tir Leu Cys Gln Phe Gly  
145 150 155 160

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

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

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

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

Gin Tre Gli Pro Leu Cis Pro Gli Tre Gli Cis Gli Pro Asp Asn Gli  
 225 230 235 240

Gli Cis Glu His Glu Cis Val Glu Gli Val Asp Gli Ala Val Ser Cis  
 245 250 255

Arg Cis Ser Glu Gli Phe Arg Leu Ala Ala Asp Gli His Ser Cis Glu  
 260 265 270

Asp Pro Cis Ala Gin Ala Pro Cis Glu Gln Gln Cis Glu Pro Gli Gli  
 275 280 285

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

Asp Asp Pro His Arg Cis Val Asp Ile Asp Glu Cis Gln Ile Ala Gli  
 305 310 315 320

Val Cis Gln Gln Met Cis Val Asn Tyr Val Gli Gli Phe Glu Cis Tyr  
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

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

His Tyr Ser Val Ile Ser Ala Tyr Arg Pro Pro Leu Ser Pro Val His

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

Cys Glu Ser His Ala Pro Asn Lys Arg Ile Thr Asp Cys Thr Arg Itp  
725 730 735

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

Glu Ser Leu Thr Glu Val Glu Thr Cys Arg Thr Ser Val  
755 760 765

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

<400> 3  
agtccgggggg cactgcgtatg ctgttgcggcc tggggcgcc gcagggccca 60  
cactggggca ggacacctgg gctgtgtggc cccgtgcgc ctggggccca agcagctgt 120  
acgtctcttt ccacacggcgc cgcacatcc tggaggccctg gggggccctgtc tgccggatgg 180  
ggggcgcaccc gggccactctt cggaccccccgg aggaggccca ggtgtgtggac agccgtgggg 240  
gtggggccca agccagggcg ctgttgcgg tggggctgca gggggggcc cggccatgcc 300  
agctgcggcg ccacatgcgc ggcttccatgt ggaccacagg ggaccaggac acggccatcc 360  
ccaaactgggc ccagccagcc tctggggcc ecgtccccggc ccagcgctgt gtggccctgg 420  
aggcaagtgg cgagccacccgc tggctggagg gctcggtgcac gctggctgtc gagggctacc 480  
tgtggccatgtt tggcttcggg gggccctgca cggcgctgca agatgggggg gcccaggcccg 540  
gccccggcggt gatatccscg ccattccacc tggctccac agatgttgag tggatggccct 600  
tcggcgctgtt ggcccgctgtt cagtgccagg ctggcagggggg agccctctgt ctctgcgtga 660  
agcagccctgtt gggagggtgtt ggttggccac gggctggggcc ccgtgtccgtt gggccctgggt 720  
gcagccctgtt caacggggggc tggcaacacy aatgtgtggg ggaggtggat ggtcacgtgt 780  
ccatggcgctt cactgaggggc ttccggctgg cagcagacgg gcgccgtgtc gaggaccctt 840  
gtggccaggc tccgtgcgg gggcgatgtt agcccggtgg gcccacaaggc tcccgctggcc 900  
actgtcgccctt gggtttccgg ccagccggagg atgtccggca ccgtgtgtt gacacaggat 960  
agtggcccgat tggccgggtgtt tggccggcaga tgggtgtccaa ctacgttgggt ggcttccgtt 1020  
gttattgttag cgagggacat gagctggagg ctgtggcat cagctgcaggc cctgcagggg 1080  
ccatgggtgc ccaggcttcc caggacatgg gagatggatgtt gctggatgac gggggaggatg 1140  
agggaaatgtt agacgaggcc tggaaaggcccttcaacgggtgg ctggacggag atggatggga 1200  
tcctgtggat ggagccatacc cagccggcttccat ttttgccat ggccatataaa ccggatcc 1260

cagaggacag	agagccacag	ataccctacc	cgagccccac	ctggccaccc	cggctcagtg	1320
cccccaagg	t cccctaccac	tcctcagtgc	tctccgtcac	ccggccctgtg	gtggctcttg	1380
ccacgcaccc	cacactgcct	tctgcccacc	agccctctgt	gatccctgcc	acacacccag	1440
cittgtcccg	tgaccaccag	atccccgtga	tcgcagccaa	ctatccagat	ctggccitctg	1500
cctaccsacc	cggtattctc	tctgtctctc	attcagcaca	gcctctgtcc	cccaagcccc	1560
ctatgatctc	aaccaasat	ccggagctct	tccctgcaca	ccatgtcccc	atgtttccag	1620
acacccgggt	cgctggcacc	cagaccacca	ctcatttgcct	tggaatccca	ccaaacccatg	1680
ccoctctgg	caccacccctc	ggtgcaccgc	tacccctctc	agccccagat	gccttgcac	1740
tcagaaccca	ggccacccag	cttccattt	tcccaactgc	ccagccctct	ctgaccacca	1800
cctccggc	ccatgtgtct	cttgcaccatc	aaatctctgt	gcctgtgtcc	acccaggcorg	1860
cagccctccc	ccacctctcg	ccctctcags	gcuccactaa	ccagacctca	cccatcagcc	1920
ctacscatcc	ccattccaaa	gcuccccaaa	tcccaaggaa	agatggcccc	atgtcccaagt	1980
tggccctgtg	gttgtccctca	ccagtcocca	cagcagcccc	aaacagccctg	ggggaggctg	2040
gtcttgcga	gcacagccag	aggatgacc	ggtagctgt	ggggcactc	ctgggtgcac	2100
cgtagtgc	tttgggtggc	ctgtttgcac	tggcatctgt	gtactgcacc	cgctgtggcc	2160
cccatgcacc	caacaaagcgc	atcaactgact	gtatctcg	ggtcatccat	gttggagcga	2220
agagcccaac	aeaacccatg	ccccccagg	gcagccctac	aggggtgcag	acctgcagaa	2280
ccagcgtgtg	atggggtgca	gacccccc	atggatgt	gggcgcgtgg	cacatggccg	2340
gggctgcacc	agggacccat	gggggctgcc	cagctggaca	gatggcttcc	tgtccccccag	2400
gcggagccag	ggtctctctc	caaccactag	acttggctct	caggaactct	gtttcttgcc	2460
ccagcgtcg	tgaccaagga	tacaccaaag	cccttaagac	ctcagggggc	gggtgttggg	2520
gtcttctcca	ataaaatgggg	tgtcaacctt	ccccaagges	aaaaaaa	aaaaaa	2576

<210> 4

<211> 757

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Leu Leu Arg Leu Leu Ala Trp Ala Ala Ala Glu Pro Tyr Leu  
1 5 10 15

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

Ser Cis Tir Ala Leu Fen Pro Arg Arg Arg Tyr Fen Leu Glu Ala Trp  
                  35                        40                        45

Arg Ala Cis Arg Glu Leu Gln Gln Asp Leu Ala Thr Pro Arg Tyr Pro  
                  50                        55                        60

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

Arg Leu Leu Trp Ile Gln Leu Gln Arg Gln Ala Arg Gln Cis Gln Leu  
                  85                        90                        95

Gln Arg Pro Leu Arg Gln Fen Tyr Trp Tyr Tyr Gln Asp Gln Asp Tyr  
                  100                       105                       110

Ala Fen Tyr Asn Trp Ala Gln Pro Ala Ser Gln Gln Pro Cis Pro Ala  
                  115                       120                       125

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

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

Glu Gln Ala Cis Pro Ala Leu Gln Asp Glu Ala Gln Gln Ala Gln Pro  
                  165                       170                       175

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

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

Ala Ser Leu Leu Cis Val Lis Gln Pro Glu Gln Gln Val Gln Trp Ser  
                  210                       215                       220

Arg Ala Gln Pro Leu Cis Leu Gln Tyr Gln Cis Ser Pro Asp Asn Gln  
                  225                       230                       235                       240

Gln Cis Glu His Glu Cis Val Glu Glu Val Asp Gln His Val Ser Cis  
                  245                       250                       255

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

Asp Pro Cis Ala Gln Ala Pro Cis Glu Gln Gln Cis Glu Pro Gln Gln

275                    280                    285

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

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

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

Cys Ser Glu Glu 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 Glu Asp Glu Leu  
355                    360                    365

Leu Asp Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Ala Trp Lis Ala  
370                    375                    380

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

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

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

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

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

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

Gln Ile Pro Val Ile Ala Ala Asn Thr Pro Asp Leu Pro Ser Ala Thr  
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 Thr Lis Thr Pro Glu Leu Phe Pro Ala His  
515                    520                    525

Gln Ser Pro Met Phe Pro Asp Thr Arg Val Ala Glu Thr Gln Thr Thr  
530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Glu Ile Val Thr Cys Thr Arg Cys Glu Pro His Ala Pro Asn Lis  
705 710 715 720

Arg Ile Thr Asp Cys Thr Arg Trp Val Ile His Ala Glu Ser Lis Ser  
725 730 735

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

Cys Arg Thr Ser Val  
755

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

<400> 5							
atgtgtgtgc	gcctgtgtct	ggcctggcg	gcccgggtgc	cggca	ctggggcccc	60	
tggacgc	ccgg	agcttaga	gc	ccatgg	ccacgt	gttccccgg	120
ccggccac	ct	tcctggaggc	ttggcggtcg	tgccgc	taat	tggggggc	180
ccggaggacc	ccggaggaggc	ccgacgtgt	gacagc	ttggcg	acc	ccggccac	240
gggtgtat	ggattgggtt	gc	agcggc	gtcg	gcc	gcggccact	300
ccccgttca	tatggacc	gggagacc	gacac	gtt	ggcc	ccgg	360
gtcgccgg	gacc	ctggccc	ggcc	ccgg	ccgg	ccgg	420
ccgtggctcg	aggc	tcgt	cacact	gtcgat	ac	ctgt	480
gagggtgc	gt	ctggc	tt	ggcc	ccat	ttt	540
acacccttca	sc	ctgg	tttc	cagt	gagg	ttt	600
gtgc	agg	ctggc	ag	gg	acgt	ttt	660
gttggctgt	cc	ca	ctgt	cc	ggact	gttgc	720
ggttgc	aa	gttgc	gg	gg	gttgc	tttgc	780
ggcttc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	840
gagc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	900
gtgtgc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	960
catg	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1020
ttcc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1080
ttcc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1140
ccct	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1200
acac	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1260
ctga	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1320
cact	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1380
cact	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1440
ccsc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1500
atca	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1560
cacc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1620

ttccctcccc	agcaggcccc	tatgtctcca	gacacccaca	cstatcactaa	tttgccctca	1680
atccccatctc	accttgcacc	tggggatacc	acttcccaag	ccggtcacca	tcctttgttc	1740
cccgatgttc	caggatccag	accggcgggt	cccagggttt	ctgtctcago	tctccagccc	1800
tctctgcta	ccaaactccag	gtcttctgta	cataaaaaaa	ctgtccctac	tgcacccagg	1860
ccccccggct	tcccttctcc	cctggccccc	cagagccccc	tttaccagac	ctcatctatc	1920
agccctacac	actccatttc	cagagccccc	cagggtccca	gggaaggaggc	tcccaagtcc	1980
aaatcagtgc	ccaggctgca	ctcagtggcc	cccacagcag	ctccaaacagc	cctggcagag	2040
ttgggtcttg	caggccaaag	ccaggagat	gaccgatggc	tgctggtggc	actcttggta	2100
ccaaacgtgt	tcttcttgg	ggtcctgtc	gcattggca	ttgtgtactg	cactcgctgt	2160
ggctccata	cccccacaa	gcgttatca	gactgtatc	gctgggtcac	gcgtgtgg	2220
aacaagagct	ccacagaacc	catggccccc	agatggacag	agaaggttct	gttcccttga	2280
cccaagccatc	atggccaaagg	ccacactgaa	ggactccagg	acccaaagggg	gtgggtgtcg	2340
ggatcttctc	caatccatgg	cgtgccaaacc	tcacccaaag	tcgtgtatcc	ccgtgt	2397

<210> 6

<211> 798

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 6

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

Glu	Gln	Ala	Pro	Trp	Tre	Pro	Glu	Pro	Arg	Ala	Ala	Cis	Glu	Pro	Ser
							20					25			30

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

Arg	Ser	Cis	Arg	Glu	Leu	Glu	Gln	Gln	Aen	Leu	Ala	Tre	Pro	Arg	Tre	Pro
						50				55				60		

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

Glu	Gln	Leu	Leu	Trp	Ile	Glu	Leu	Gln	Arg	Gln	Ala	Arg	Gln	Cis	Gln	Pro
						85				90					95	

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

Ala Fen Tre Asn Trp Ala Gln Pro Ala Tre Glu GLI Pro Cis Pro Ala  
 115 120 125  
  
 Cis Arg Cis Ala Ala Leu Glu Ala Ser GLI Glu His Arg Trp Leu Glu  
 130 135 140  
  
 GLI Ser Cis Tre Leu Ala Val Asp GLI Tyr Leu Cis Gln Fen GLI Fen  
 145 150 155 160  
  
 Glu GLI Ala Cis Pro Ala Leu Pro Leu Glu Val GLI Gln Ala GLI Pro  
 165 170 175  
  
 Ala Ile Tir 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 Cis Gln Ala GLI Arg GLI  
 195 200 205  
  
 Tre Ser Leu Leu Cis Val Lis Gln Pro Ser GLI GLI Val GLI Trp Ser  
 210 215 220  
  
 Gln Tre GLI Pro Leu Cis Pro GLI Tre GLI Cis GLI Pro Asp Asn GLI  
 225 230 235 240  
  
 GLI Cis Glu His Glu Cis Val Glu Glu Leu Asp GLI GLI Met Ser Cis  
 245 250 255  
  
 Arg Cis Ser Glu GLI Fen Arg Leu Ala Ala Asp GLI His Ser Cis Glu  
 260 265 270  
  
 Asp Pro Cis Ala Gln Ala Pro Cis Glu Gln Gln Cis Glu Pro GLI GLI  
 275 280 285  
  
 Pro Gln GLI Tir Ser Cis His Cis Arg Leu GLI Fen Arg Pro Ala Glu  
 290 295 300  
  
 Asp Glu Pro His Arg Cis Val Asp Tre Asp Glu Cis Gln Ile Ala GLI  
 305 310 315 320  
  
 Val Cis Gln Gln Met Cis Val Asn Tir Val GLI GLI Fen Glu Cis Tir  
 325 330 335  
  
 Cis Arg Gln GLI His Glu Leu Glu Ala Asp GLI Ile Ser Cis 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 Pro Trp Glu Asp  
 370 375 380  
  
 Phe Asp Gln Thr Trp Tre Glu Glu Gln Gln Tre Leu Trp Met Ala Pro  
 385 390 395 400  
  
 Tre His Pro Pro Asp Phe Gln Leu Pro Tir Arg Pro Asn Phe Pro Gln  
 405 410 415  
  
 Asp Gln Glu Pro Gln Arg Leu His Leu Glu Pro Tre Trp Pro Pro Pro  
 420 425 430  
  
 Leu Ser Ala Pro Arg Gln Pro Tir His Ser Ser Val Val Ser Ala Tre  
 435 440 445  
  
 Arg Pro Met Val Ile Ser Ala Tre Arg Pro Tre Gln Pro Ser Ala Arg  
 450 455 460  
  
 Lis Tre Ser Val Ile Ser Ala Tre His Leu Pro Leu Asn Pro Val His  
 465 470 475 480  
  
 Pro Pro Ala Leu Ala Pro Tre Tre Pro Pro Ala Val Leu Pro Glu His  
 485 490 495  
  
 Gln Ile Pro Lis Ile Lis Ala Ser Tir Pro Asp Leu Pro Phe Gln His  
 500 505 510  
  
 Lis Pro Gln Ile Tre Ser Ala Tre His Pro Ala Gln Pro Pro Pro His  
 515 520 525  
  
 Gln Pro Pro Ile Ile Ser Tre Lis Tir Pro Gln Val Phe Pro Pro Gln  
 530 535 540  
  
 Gln Ala Pro Met Ser Pro Asp Tre His Tre Ile Tre Asn Leu Pro Leu  
 545 550 555 560  
  
 Ile Pro Ser His Leu Asp Pro Gln Asp Tre Tre Ser Gln Ala Gln His  
 565 570 575  
  
 His Pro Leu Leu Pro Asp Val Pro Gln Ile Arg Tre Gln Ala Pro Gln  
 580 585 590  
  
 Val Ser Val Ser Ala Leu Gln Pro Ser Leu Pro Tre Asn Ser Arg Ser

595	600	605
Ser Val His Glu Pro Pro Val Pro Tre Ala Asn Gln Pro Pro Ala Phe		
610	615	620
Pro Ser Pro Leu Pro Pro Gln Ser Pro Ile Asn Gln Tre Ser Ser Ile		
625	630	635
Ser Pro Tre His Ser 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 Cys Leu Ala Cys Gln Ser Gln		
675	680	685
Arg Asp Asp Arg Trp Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Pro Tre Cis Val		
690	695	700
Phe Leu Val Val Leu Leu Ala Leu Gly Ile Val Tyr Cys Tre Arg Cys		
705	710	715
Gly Ser His Tre Pro Asn Lis Arg Ile Tre Asp Cys Tir Arg Trp Val		
725	730	735
Tre His Ala Gly Asn Lis Ser Ser Tre Glu Pro Met Pro Pro Arg Trp		
740	745	750
Tre Glu Lis Val Leu Phe Leu Glu Pro Ser Ile His Gly Lis Gly His		
755	760	765
Tre Glu Gly Leu Gln Asp Leu Lis Gly Trp Val Leu Gly Ser Ser Pro		
770	775	780
Ile Asn Gly 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	ccttttttg	gtagcaacag	ctacaggtgt	ccactccgac	60
atccagatga	ccpagagccc	aaggcgcctg	agcgccagcg	tgggtgacag	agtgaccatc	120
ccctgttagag	ccagccagaa	tgtgggtact	gctgtggct	ggctacagca	gaccggcagg	180
aggctccaa	agctgtgt	ctactcgcc	tgcatacggt	acactgggt	gccaaggcaga	240
ttcagcggt	gccccgggg	taccgactac	actttcacca	tccggccct	ccagccagag	300
gacatcgcca	cctactactg	ccagcaat	accaactatc	ccatgtacac	tttccggccaa	360
gggaccaagg	tgcaaatcaa	acgaaacttg	gctgcaccat	ctgtttcat	tttcccgccaa	420
tctgtatgac	agttgtaa	tggaaactg	tctgttgtgt	gcctgtgas	taacttttat	480
cccaaggagg	ccaaagtaca	gtggaaagg	gatascggcc	tccaaatcggg	taactccca	540
gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacataca	gcctcagcag	cacccgtacg	600
ctgagcaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgct	gcgaaatgcsc	ccatcaggc	660
ctgagatcgc	cggtcacaa	gagtttcaac	gggggagagt	gttac		720

<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	ccttttttg	gtagcaacag	ctacaggtgt	ccactccgac	60
gtcccaactgc	aggagagccgg	tccagggttt	gtggacatc	gccagaccct	gaggctgacc	120
tgcacccgcgt	ctggctacac	tttcactgac	tatgttatac	actgggtgas	acagccacct	180
ggacgagg	ttagtggat	tggatataatt	aatccatata	atgtatgtac	tacctacaa	240
cagaagtca	ggggcagagt	gacaatgctg	gttagcacca	gctccaaacac	agccctacctg	300
agactcagca	gggtgacaga	cgaggacacc	goggtctatt	attgtgcag	aaggggaaat	360
tcctatgt	tttactttga	ctactctatg	gactactgg	gatccggac	cccggtcacc	420
gtctcctcag	cctccaccaa	gggccccatcg	gtcttcccc	tggcacccctc	ctccasggac	480
acccctgggg	gcacagccgc	cctgggtgc	ctggtcagg	actactcc	cgaaccggtg	540
acggtgtcgt	ggacttcagg	cgcctgacc	agcggcggtc	acaccttcc	ggctgttcta	600
cagtcctcag	gactctactc	cctcagragc	gtggtgaccg	tgcctccag	cagcttgggc	660
acccagacct	acatctgaa	cgtgatcac	aegcccaagca	acacccasgg	ggccaaagaaa	720
gtttagccca	atcttgcgt	caaaactcac	acatgcccc	cgtgcccc	acctgaaactc	780

ctggggggac cgtcagtatt	ccttttcccc	ccaaaaccca	aggecacccct	catgtatcc	840	
cggacccctg	aggcacatg	cgtgggtgtg	gacgtgagcc	acgaagaccc	tgaggtcaag	900
ttcaacttgt	acgtggacgg	cgtggaggtg	cataatgcct	agacaaagcc	gccccggggg	960
cagtacaaaa	gcacgttaccg	tgtggtcagc	gttcttcccg	tcttgcacca	ggactggctg	1020
aatggcaagg	agtacaagtg	caaggtctcc	aaaaaagccc	tcccaagcccc	catcgagaaa	1080
accatctcca	aagccaaagg	gcagccccga	gaaccacagg	tgtacacccct	gcccccatcc	1140
cgggatgagc	tgacccasaa	ccaggtcago	ctgacctgcc	tggtcaaagg	cttctatccc	1200
sgogacatcg	cgtggactg	ggagagcaat	gggcagccgg	agaacaaacta	caagacccacg	1260
cctccctgtc	tggactccga	cggctcttc	tttctctaca	gcaagctcac	cgtggacaaag	1320
agcaggtggc	agcaggggaa	cgtttctca	tgctccgtga	tgcstgagcc	tctgcacaaac	1380
cactacacgc	sgaagagcc	ctccctgtct	cccgaaat	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 GII Trp Ser Cis Ile Ile Leu Fen Leu Val Ala Tre Ala Tre GII			
1	5	10	15

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

Ser Val GII Asp Arg Val Tre Ile Tre Cis Arg Ala Ser Gln Asn Val		
35	40	45

GII Tre Ala Val Ala Trp Leu Gln Gln Tre Pro GII Lis Ala Pro Lis		
50	55	60

Leu Leu Ile Tir Ser Ala Ser Asn Arg Tir Tre GII Val Pro Ser Arg			
65	70	75	80

Fen Ser GII Ser GII Ser GII Tre Asp Tir Tre Fen Tre Ile Ser Ser		
85	90	95

Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Tre Tir Tir Cis Gln Gln Tir Tre Asn		
100	105	110

Tir Pro Met Tir Ile Fen Gln Gln 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 Gln Tre Ala Ser Val Val Cis 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

Gln 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 Cis Glu Val Tre His Gln Gln Leu Ser Ser Pro  
210 215 220

Val Tre Lis Ser Fen Asn Arg Gln Glu Cis  
225 230

<210> 10

<211> 648

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

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

<400> 10

gacatccaga tgaccccagag cccaaaggcaga ctgagcgccca gctgtgggtga cagagtgcacc 60

atcacctgtta gagccagccca gaatgtgggt actgtgttag cctggctaca gcagacccca 120

ggtaaggctc caaatgtgtt gatctactcg gcatcgaatc ggtaacctgg tttggccaaagc 180

agattcagcg gtatcggttag cggtaaccgac tacaccttca ccattcagcag cttccagccca 240

gaggacatcg ccacctacta ctggccggcaa tataccact atccccatgtt cacgttcggc 300

caaggccatca aggtgcacat cttacgaaact gtggctgcac catctgttt catcttcccg 360

ccatctgtt agcagttgaa atctggaaact gctctgttg tgtgcctgtt gaaataacttc 420

tatccccatcg agggccaaatg acagtggaaag gtggataacy cccctccaaatc ggtaactcc 480

caggagatgt tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagccctcg cggcccccgt 540

acgctgagca aaggcagacta cgagaaacacaa aaagtctacg cctggcgagt cacccatcag 600  
ggcctgagct cgcccgtaac aaagagtttc aacaggggag agtgtttaa 648

<210> 11  
<211> 215  
<212> PRT  
<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 Glu  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tir Tre Fen Glu Gln Glu 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

Glu Tre Ala Ser Val Val Cis 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 Glu Asn Ser  
145 150 155 160

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

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

180

185

190

Tir Ala Cis Glu Val Tre His Gln Gln Leu Ser Ser Pro Val Tre Lis  
185 200 205

Ser Fen Asn Arg Gli Glu Cis  
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 agaatgtggg tactgtctgtt gccc

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 Gli 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

tccggcatcga atccggtaacac 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 Tir Tre  
 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 30  
csgcaatata ccaactatcc catgtacacg

<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 Tir Tre Asn Tir Pro Met Tir Tre  
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 60  
gacatccaga tgacccagag cccssgcgc ctgagcgcca ccgtgggtga cagagtgacc  
atcacctgtt gagccagccaa gaatgtgggt actgtgttag cctggctaca gcsagacccca  
ggtaaggctc casagctgtt gatctactcg gcatcgaaatc ggtacactgg tgtggccaaagc  
agattcagcg gttagcggttag cggtaaccgac tacacccttca ccatacggcag cctccagccca  
gaggacatcg ccacctacta ctgccagcaa tataccasct atccccatgtt cacg  
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 Glu  
1 5 10 15

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

Val Ala Trp Leu Gln Gln Tre Pro Glu Lys Ala Pro Lys Leu Ile Ile  
35 40 45

Tir Ser Ala Ser Asn Arg Tir Tre Glu Val Pro Ser Arg Lys Ser Glu  
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Tre Tir Tir Cis 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 Glu Trp Ser Cis Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Tre Ala Tre Glu  
1 5 10 15

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

Pro Ser Gln Tre Leu Ser Leu Tre Cis Tre Ala Ser Glu Tir Tre Phe  
35 40 45

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

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

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

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

Cln Asp Trp Leu Asn Glu Lis Glu Thr Lis Cis Lis Val Ser Asn Lis  
 340 345 350

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

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

Thr Lis Asn Gln Val Ser Leu Thr Cis Leu Val Lis Glu Ser Thr Pro  
 385 390 395 400

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

Thr Lis Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Glu Ser Ser Leu  
 420 425 430

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

Ser Ser Cis Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Thr Thr Gln  
 450 455 460

Lis Ser Leu Ser Leu Ser Pro Glu Lis  
 465 470

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

23

2023-2024

<223> seq

sem sequencia líder

24000 > 23

scct gcscc

Digitized by srujanika@gmail.com

ctgagactca gcaagcggtggat agtccggggat accccccc attttttt cccgggggg

sattcctatg	atggttactt	tgactactct	atggactact	ggggatccgg	gaccccggtc	360
accgtctct	cagcctccac	caaggccca	tccgttttc	ccctggcacc	cicctccaa	420
sgcacctctg	ggggcacagc	ggccctgggc	tgcctggta	aggactactt	ccccogaaccg	480
gtgacggtgt	cgtggaactc	aggagccctg	accagcggcg	tgcacacac	cccggctgtc	540
ctacagtct	caggactcta	ctccctcaga	agcgtggtga	ccgtgccctc	cagcagcttg	600
ggcacccaga	cctacatctg	caacgtgaa	cacaagccca	gcaacaccas	ggtggacaag	660
aaagttggc	ccaaatcttg	tgacssasct	cacacatgcc	cacogtggcc	agcacctgaa	720
ctccctgggg	gaccgtcagt	cttccttcc	ccccaaaaac	ccaaggacac	cctctgtatc	780
ccccggaccc	ctggggcac	atgggtggc	gtggacgtga	gccacgaaga	ccctgggggtc	840
aaattcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	gtgcataatg	ccaaagacaaa	gcccggggag	900
gagcagtaca	acagcacgta	cctgtgtggc	sgcgtccctc	ccgtcttgca	ccaggactgg	960
ctgaatggca	aggagttacsa	gtgcaaggtc	tccacaaag	ccctccca	cccccacgag	1020
aaaaaccatct	ccaaagccaa	ggggcagccc	cgagaaaccac	sggtgtacac	cctggccccc	1080
tccccggatg	sgctgsccaa	gaaccaggc	sgcctgacct	gcctggta	aggottctat	1140
cccaagcaca	tcgcccgtgga	gtggggagagc	aatgggcagc	cgagaaacaa	ctacaagacc	1200
acgcctcccg	tgctggactc	cgcggcgtcc	ttcttcctct	acagcaagct	cacogtggac	1260
aaagcggat	ggcagcaggg	gaacgtctc	tcatgtccg	tgatgtatga	ggctctgcac	1320
accactaca	cgcagaagag	cctctccctg	tctccccggaa	aatga		1365

<210> 22  
 <211> 454  
 <212> PRT  
 <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

Tre Leu Ser Leu Tre Cis Tre Ala Ser Gln Tyr Trp Fen Tre Asp Tyr  
 20 25 30

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

GII Tir Ile Asn Pro Tir Asp Asp Asp Tre Tre Tir Asn Gln Lis Fen  
 50 55 60  
  
 Lis GII 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 Gln Asp Tre Ala Val Tir Tir Cis  
 85 90 95  
  
 Ala Arg Arg GII Asn Ser Tir Asp GII Tir Fen Asp Tir Ser Met Asp  
 100 105 110  
  
 Tir Trp GII Ser GII Tre Pro Val Tre Val Ser Ser Ala Ser Tre Lis  
 115 120 125  
  
 GII Pro Ser Val Fen Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lis Ser Tre Ser GII  
 130 135 140  
  
 GII Tre Ala Ala Leu GII Cis Leu Val Lis Asp Tir Fen Pro Glu Pro  
 145 150 155 160  
  
 Val Tre Val Ser Trp Asn Ser GII Ala Leu Tre Ser GII Val His Tre  
 165 170 175  
  
 Fen Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser GII Leu Tir Ser Leu Ser Ser Val  
 180 185 190  
  
 Val Tre Val Pro Ser Ser Ser Leu GII Tre Gln Tre Tir Ile Cis 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 Cis Asp Lis Tre His Tre Cis Pro Pro Cis Pro Ala Pro Glu  
 225 230 235 240  
  
 Leu Leu GII GII 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 Cis Val Val Val Asp  
 260 265 270  
  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lis Fen Asn Trp Tir Val Asp GII  
 275 280 285  
  
 Val Glu Val His Asn Ala Lis Tre Lis Pro Arg Glu Glu Gln Tir Asn

290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Ile Val Leu His Gln Asp Trp		
305	310	315
Leu Asn Glu Lis Glu Tyr Lis Cys Lis Val Ser Asn Lis Ala Leu Pro		
325	330	335
Ala Pro Ile Glu Lis Thr Ile Ser Lis Ala Lis Glu Gln Pro Arg Glu		
340	345	350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lis Asn		
355	360	365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lis Glu Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
370	375	380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Glu Gln Pro Glu Asn Asn Thr Lis Thr		
385	390	395
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Glu Ser Phe Phe Leu Thr Ser Lis		
405	410	415
Leu Thr Val Asp Lis Ser Arg Trp Gln Gln Glu Asn Val Phe Ser Cys		
420	425	430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Thr Thr Gln Lis Ser Leu		
435	440	445
Ser Leu Ser Pro Glu 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		
atggcgatggc gtgttatcat ctcttttttg gtagcaacag ctacgggtgt ccactccagg 60		
gtccaaactgc aggagagcgg tccagggttt gtgagaccta gccagacccct gagctgacc 120		
tgcacccgggt ctggctacac cttcaatgac tatgttataac actgggtgaa acggccacct 180		
ggacgaggtc ttgagtggat tggatatatg aatcctttagt atgatgatac tacctacaac 240		

cagaaggcca	agggcagagt	gacaaatgtg	gttagacacca	gttccaaacac	aggctacctg	300
agactcaagca	gcgtgacacgc	cgaggacacc	gcgggtctatt	attgtgcaag	aagggggaat	360
tccatgtatg	gttactttga	ctactctatg	gactactggg	gatccgggac	cccggtcacc	420
gttacttcag	cotccacccsa	ggggccatcg	gtttttcccc	tggcacccctc	ctccaaagac	480
acctctgggg	gcacsgcgcc	cctgggtgc	ctggtaagg	actacttccc	cgaaccggtg	540
acggtgttgt	ggaactcagg	cgccctgacc	agcggcggtc	acacccccc	gggtgttcta	600
cagtccctcg	gactctactc	cctcagcago	gtggtgaccg	tggccctccag	cagcttggcc	660
acccagaccc	acatctgcca	cgtgaatcac	aaagcccaagca	acaccaaggt	ggacaagaaa	720
gttgagccca	aatcttgtga	aaaaactcac	acatgccccac	cgtgccccgc	scctgaactc	780
ctggggggac	cgtcagtott	cctttcccc	ccaaaacccca	aggacacccct	catgatctcc	840
cggacccctg	aggcacatcg	cgtgggggtg	gacgtgagcc	acgaaagccc	tgggggtcaag	900
ttccaaacttgt	acgtggacgg	cgtgggggtg	cataatgcca	agacaaagcc	gccccggagag	960
cagtccsaca	gcacgtaccc	tgtggtcage	gtccctcaccc	tcctgcacca	ggactggctg	1020
aatggcaagg	actacaatgt	caaggtctcc	aaaaaagccc	tcccaagcccc	catcgagaaa	1080
accatctcca	aagccaaagg	gcagccccga	gaaccacagg	tgtacaccc	gccccatcc	1140
cgggatgagc	tgaccaagaa	ccaggtcagc	ctgacccgtcc	tggtcasagg	cttctatccc	1200
agcgcacatcg	ccgtggagtg	ggagagcaat	ggggcagccgg	agaacaacta	caagaccacag	1260
cctccatgtgc	tggactccga	cggttttttc	ttccctctaca	gcaagctcac	cgtggacaag	1320
agcagggtggc	agcagggggaa	cgatcttctc	tgcctccgtga	tgcattgaggg	tctgcacaac	1380
cactacacgc	agaagagccct	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	Cis	Ile	Ile	Leu	Fen	Leu	Val	Ala	Tre	Ala	Tre	Gln
1															15

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

Pro Ser Gln Tre Leu Ser Leu Tre Cis Tre Ala Ser Gln Tir Tre Fen

35	40	45
Tre Asp Tir Val Ile His Trp Val Lis Gln Pro Pro ·Gli Arg ·Gli Leu 50	55	60
Glu Trp Ile ·Gli Tir Ile Asn Pro Tir Asp Asp Asp Tre Tre Tir Asn 65	70	75
Gln Lis Fen Lis ·Gli Arg Val Tre Met Leu Val Asp Tre Ser Ser Aen 85	90	95
Tre Ala Tir Leu Arg Leu Ser Ser Val Tre Ala Glu Asp Tre Ala Val 100	105	110
Tir Tir Cis Ala Arg Arg ·Gli Aen Ser Tir Asp ·Gli Tir Fen Asp Tir 115	120	125
Ser Met Asp Tir Trp ·Gli Ser ·Gli Tre 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
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 Aen Ser ·Gli Ala Leu Tre Ser ·Gli 180	185	190
Val His Tre Fen Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser ·Gli Leu Tir 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 Aen Val Aen His Lis Pro Ser Aen Tre Lis Val Asp Lis Lis 225	230	235
Val Glo Pro Lis Ser Cis Asp Lis Tre His Thr 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 Gli Lis Glu Tir Lis Cis Lis Val Ser Asn Lis  
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lis Tre Ile Ser Lis Ala Lis Gli 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 Cis Leu Val Lis Gli Fen Tir Pro  
385 390 395 400

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

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

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

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

Lis Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gli 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

caggtccaaac tgcaggagag cggtcggatgt cttgtgagac ctagccagac cctgagccgtg 60

acctgcacccg	cgtctggcta	cacccttcaact	gactatgtta	tacactgggt	gaaacagccs	120
cctggacgag	gtctttagtg	gatggatata	attaatccctt	atgatgtgta	tactacccac	180
saccagaagt	tcaagggcag	sgtgacaatg	ctggtagaca	ccagctccaa	cacagccatc	240
ctgagactca	gcagcgtgac	sgcccgaggac	accgcggtct	attattgtgc	sagaaggggg	300
aattccatg	atggttactt	tgactactt	atggactact	ggggatccgg	gaccccggtc	360
accgtctct	cagectccac	caagggccca	tggttttcc	ccctggcaccc	ctccctccaaag	420
agcacctctg	ggggcacagc	ggccctggc	tgcgtggta	aggactactt	ccccgaaccg	480
gtgacggtgt	cgttggactc	aggcgccctg	accagcggcg	tgcacacott	cccggtgtc	540
ctacagtctt	caggactcta	ctccctcago	agcgtggta	ccgtgccttc	cagcagcttg	600
ggcacccaga	cctacatctg	caacgtgaat	cacacgccc	gcaacacccaa	ggtggacaag	660
aaagttgagc	ccaaatctt	tgacaaaact	cacacatgcc	caccgtgcctt	agcacctgaa	720
ctccctgggg	gacogtcagt	cttccttttc	ccccaaaaac	ccaaggacac	cttcatgttc	780
tcggaccc	ctgaggtcac	atgcgtggtg	gtggacgtga	gccacgaaga	ccctgsggtc	840
aahttcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	gtgcataatg	ccaaagacaaa	gcccggggag	900
gagcagtaca	acagcacgta	ccgtgtgtc	agcgttctca	ccgttctgca	ccaggactgg	960
ctgeatggca	aggagtacaa	gtgcacggtc	tccaaacsaa	ccctcccaag	cccatcgag	1020
aaacccatet	ccaaagccaa	agggcagccc	cgagaaccac	agggttacac	ctgccccca	1080
tcccggtatg	agctgaccaa	qaaccaggtc	agcctgacct	gcctggtaaa	aggcttctat	1140
cczagcaca	tgcgttgaa	gtggagagc	aatggcagc	cgggagaacaa	ctacaagacc	1200
acgcctcccg	tgcgtggactc	cgacggcttc	ttcttcatct	acagcaagct	caccgtggac	1260
aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgttttc	tcatgtccg	tgtatgcata	ggctctgcac	1320
aaccactaca	cgcagaagag	cctctccctg	tctcccgga	aatgta		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	Ieu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ieu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
1					5					10					15

Tre Leu Ser Leu Tre Cis Tre Ala Ser Glu Tir Tre Phe Tre Asp Tir  
 20 25 30

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

Glu Tir Ile Asn Pro Tir Asp Asp Asp Tre Tre Asn Gln Lis Phe  
 50 55 60

Lis Glu 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 Cis  
 85 90 95

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

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

Glu Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lis Ser Tre Ser Glu  
 130 135 140

Glu Tre Ala Ala Leu Glu Cis Leu Val Lis Asp Tir Phe Pro Glu Pro  
 145 150 155 160

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

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Glu Leu Tir Ser Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

Val Tre Val Pro Ser Ser Ser Leu Glu Tre Glu Tre Tir Ile Cis 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 Cis Asp Lis Tre His Cis Cis Pro Pro Cis Pro Ala Pro Glu  
 225 230 235 240

Leu Leu Glu Glu Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lis Pro Lis Asp  
 245 250 255

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

260

265

270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lis Fen Asn Trp Tir Val Asp Glu  
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 Glu Lis Glu Tir Lis Cis Lis Val Ser Asn Lis Ala Leu Pro  
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lis Tre Ile Ser Lis Ala Lis Glu 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 Cis Leu Val Lis Glu Fen Tir Pro Ser Asp Ile  
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Glu Gln Pro Glu Asn Asn Tir Lis Tre  
385 390 395 400

Tre Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Glu Fen Fen Fen Leu Tir Ser Lis  
405 410 415

Leu Tre Val Asp Lis Ser Arg Trp Gln Gln Glu Asn Val Fen Ser Cis  
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 Glu Lis  
450

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de nucleótidos que codificam CDR1 da cadeia pesada de anticorpos  
M4 e M4.1

<400> 27

ggcttccacct 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

Glu Tir Tre Phe Thr Asp Tyr Val Ile His  
1 5 10

<210> 29

<211> 51

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

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

<400> 29

tatatttatac cttatgtatga tgatactacc tacaaaccsga agttcaagggg 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

Tir Ile Asn Pro Tyr Asp Asp Asp Tyr Tyr Asn Gln Lys Ser Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 31

<211> 51

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

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

<400> 31

gcacaaagggg ccaattccta tcatggttac ttgtactact 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	Gly	Asn	Ser	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Asn	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

cagggtccsac	tgcaggagaa	cggtccaggt	tttgtgagac	ctagccagac	cctgaggcctg	60
acctgcaccc	cgtctggcta	cacccact	gactatgtta	tacactgggt	gaaacagcca	120
cctggaccc	gtcttggatg	gattggatat	atiaatccctt	atgtatgtga	tactacccac	180
aaccggaa	tcaaggccag	agtgcataatg	ctggtagaca	ccagctccaa	cacagccatc	240
ctgagactca	gcaggcgtgac	agccgaggac	cccgccgtat	attattgtgc	aagaaggggg	300
sattccat	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	Ieu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ieu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
1					5					10					15

Tre Ieu Ser Leu Tre Cys Tre Ala Ser Gly Tyr Tre Ieu 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 Tir Ile Asn Pro Tir Asp Asp Asp Tre Tre Tir Asn Gln Lys Fen  
50 55 60

Lys 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 Cis  
85 90 95

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

Tir

<210> 35

<211> 2477

<212> PR1

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Leu Arg Gln Pro Gln Pro Gln Leu Leu Leu Ala Val Gln Cis  
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 Cis Tir Asp Asn Gln Lys His Tir Gln Ile Asn Gln Gln  
50 55 60

Trp Gln Arg Tre Tir Leu Gln Asn Ala Leu Val Cis Tre Cis Tir Gln  
65 70 75 80

Gln Ser Arg Gln Fen Asn Cis Glu Ser Lys Pro Gln Ala Glu Glu Tre  
85 90 95

Cis Fen Asp Lys Tir Tre Gln Asn Tre Tir Arg Val Gln Asp Tre Tir  
100 105 110

Gln Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cis Tre Cis Ile Gln Ala

118	120	128
Glu Arg Glu Arg Ile Ser Cys Tre Ile Ala Asn Arg Cys His Glu Glu		
130	135	140
Glu Gln Ser Thr Lys Ile Glu Asp Tre Trp Arg Arg Pro His Glu Tre		
145	150	155
Glu Glu Thr Met Leu Glu Cys Val Cys Leu Glu Asn Glu Lys Glu Glu		
165	170	175
Trp Tre Cys Lys Pro Ile Ala Glu Lys Cys Phe Asp His Ala Ala Glu		
180	185	190
Tre Ser Thr Val Val Glu Glu Tre Trp Glu Lys Pro Thr Gln Glu Trp		
195	200	205
Met Met Val Asp Cys Tre Cys Leu Glu Glu Glu Ser Glu Arg Ile Tre		
210	215	220
Cys Tre Ser Arg Asn Arg Cys Asn Asp Gln Asp Tre Arg Tre Ser Thr		
225	230	235
Arg Ile Glu Asp Tre Trp Ser Lys Lys Asp Asn Arg Glu Asn Leu Leu		
245	250	255
Gln Cys Ile Cys Tre Glu Asn Glu Arg Glu Glu Trp Lys Cys Glu Arg		
260	265	270
His Tre Ser Val Gln Tre Tre Ser Ser Glu Ser Glu Pro Phe Tre Asp		
275	280	285
Val Arg Ala Ala Val Thr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro Pro		
290	295	300
Thr Glu His Cys Val Thr Asp Ser Glu Val Val Thr Ser Val Glu Met		
305	310	315
320		
Gln Trp Leu Lys Tre Gln Glu Asn Lys Gln Met Leu Cys Tre Cys Leu		
325	330	335
Glu Asn Glu Val Ser Cys Gln Glu Tre Ala Val Tre Gln Tre Thr Glu		
340	345	350
Glu Asn Ser Asn Glu Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr Thr Asn Glu		
355	360	365

Arg Tre Fen Tir Ser Cis Thr Thr Glu Glu Glu Arg Gln Asp Glu His Leu  
370 375 380

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

Cis Tre Asp His Tre Val Leu Val Glu Tre Arg Glu Glu Asn Ser Asn  
405 410 415

Glu Ala Leu Cis His Fen Pro Fen Leu Tir Asn Asn His Asn Tir Tre  
420 425 430

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

Tre Glu Asn Tir Asp Ala Asp Glu Lis Fen Glu Fen Cis Pro Met Ala  
450 455 460

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

Glu Asp Glu Trp Asp Lis Glu His Asp Met Glu His Met Met Arg Cis  
485 490 495

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

Glu Leu Arg Asp Glu Cis Ile Val Asp Asp Ile Tre Tir Asn Val Asn  
515 520 525

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

Cis Fen Glu Glu Glu Arg Glu Arg Trp Lis Cis Asp Pro Val Asp Glu  
545 550 555 560

Cis Glu Asp Ser Glu Tre Glu Tre Fen Tir Glu Ile Glu Asp Ser Trp  
565 570 575

Glu Lis Tir Val His Glu Val Arg Tir Glu Cis Tir Cis Tir Glu Arg  
580 585 590

Glu Ile Glu Glu Trp His Cis Glu Pro Leu Glu 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 Lis  
625 630 635 640

Tir Ile Leu Arg Trp Arg Pro Lis Asn Ser Val Gln Arg Trp Lis Glu  
645 650 655

Ala Thr Ile Pro Gln His Leu Asn Ser Thr Thr Ile Lis Gln Leu Lis  
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 Gln 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 Gln 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

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

1085                    1090                    1095  
Tre Glu Tre Tre Ile Val Ile Tre Trp Tre Pro Ala Pro Arg Ile  
1100                    1105                    1110  
  
Gln Fen Lis Leu Gln Val Arg Pro Ser Gln Gln Gln Glu Ala Pro  
1115                    1120                    1125  
  
Arg Glu Val Tre Ser Asp Ser Gln Ser Ile Val Val Ser Gln Leu  
1130                    1135                    1140  
  
Tre Pro Gln Val Glu Tir Val Tir Tre Ile Gln Val Leu Arg Asp  
1145                    1150                    1155  
  
Gln 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  
  
Gln Val Leu Tre Val Ser Irg Glu Arg Ser Tre Tre Pro Asp Ile  
1190                    1195                    1200  
  
Tre Gln Tir Arg Ile Tre Tre Tre Pro Tre Asn Gln Gln Gln Gln  
1205                    1210                    1215  
  
Asn Ser Leu Glu Glu Val Val His Ala Asp Gln Ser Ser Cis Thr  
1220                    1225                    1230  
  
Fen Asp Asn Leu Ser Pro Gln 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 Gln Leu Arg Trp Tre Pro Leu Asn Ser Ser  
1280                    1285                    1290  
  
Tre Ile Ile Gln Tir Arg Ile Tre Val Val Ala Ala Gln Glu Gln  
1295                    1300                    1305  
  
Ile Pro Ile Fen Glu Asp Fen Val Asp Ser Ser Val Gln Tir Tir  
1310                    1315                    1320

Tre Val	Tre Gln	Leu Glu Pro	Gln Ile Asp	Tir Asp	Ile Ser Val
1325		1330		1335	
Ile Tre	Leu Ile Asn	Gln Gln	Glu Ser Ala Pro	Tre Tre Leu Tre	
1340		1345		1350	
Gln Gln	Tre Ala Val Pro Pro	Pro Tre Asp	Leu Arg	Fen Tre Asn	
1355		1360		1365	
Ile Gln	Pro Asp Tre Met Arg	Val Tre Trp Ala Pro	Pro Pro Ser		
1370		1375		1380	
Ile Asp	Leu Tre Asn Fen Leu	Val Arg Tir Ser	Pro Val Lis Asn		
1385		1390		1395	
Glu Glu	Asp Val Ala Gln Leu	Ser Ile Ser Pro Ser	Asp Asp Ala		
1400		1405		1410	
Val Val	Leu Tre Asn Leu Leu	Pro Gln Tre Glu Tir	Val Val Ser		
1415		1420		1425	
Val Ser	Ser Val Tir Gln Gln	His Glu Ser Tre Pro	Leu Arg Gln		
1430		1435		1440	
Arg Gln	Lis Tre Gln Leu Asp	Ser Pro Tre Gln Ile	Asp Fen Ser		
1445		1450		1455	
Asp Ile	Tre Ala Asn Ser Fen	Tre Val His Trp Ile	Ala Pro Arg		
1460		1465		1470	
Ala Tre	Ile Tre Gln Tyr Arg	Ile Arg His His Pro	Glu His Fen		
1475		1480		1485	
Ser Gln	Arg Pro Arg Glu Asp	Arg Val Pro His Ser	Arg Asn Ser		
1490		1495		1500	
Ile Tre	Leu Tre Asn Leu Tre	Pro Gln Tre Glu	Tir Val Val Ser		
1505		1510		1515	
Ile Val	Ala Leu Asn Gln Arg	Glu Glu Ser Pro Leu	Leu Ile Gln		
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 Glu Glu Tre Glu Glu  
 1565 1570 1575

Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Tre Val Pro Glu Ser Lis Ser Tre  
 1580 1585 1590

Ala Tre Ile Ser Glu Leu Lis Pro Glu Val Asp Tir Tre Ile Tre  
 1595 1600 1605

Val Tir Ala Val Tre Glu Arg Glu 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 Glu Tir Arg Val Tre Tre Tre  
 1655 1660 1665

Pro Lis Asn Glu Pro Glu Pro Tre Lis Tre Lis Thr Ala Glu Pro  
 1670 1675 1680

Asp Gln Tre Glu Met Tre Ile Glu Glu Leu Gln Pro Tre Val Glu  
 1685 1690 1695

Tir Val Val Ser Val Tir Ala Gln Asn Pro Ser Glu Glu Ser Gln  
 1700 1705 1710

Pro Leu Val Gln Tre Ala Val Tre Asn Ile Asp Arg Pro Lis Glu  
 1715 1720 1725

Leu Ala Phe Tre Asp Val Asp Val Asp Ser Ile Lis Ile Ala Trp  
 1730 1735 1740

Glu Ser Pro Gln Glu Gln Val Ser Arg Tir Arg Val Tre Tir Ser  
 1745 1750 1755

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

Glu Glu Asp Tre Ala Glu Leu Gln Gln Leu Arg Pro Gln 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 Gln 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 Gln Tir Arg Val Arg Val Tre  
 1835 1840 1845  
  
 Pro Lis Glu Lis Tre Gln Pro Met Lis Glu Ile Asn Leu Ala Pro  
 1850 1855 1860  
  
 Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gln 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 Gln 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 Gln Phe Gln Val Asp  
 1925 1930 1935  
  
 Ala Val Pro Ala Asn Gln Gln Tre Pro Ile Gln Arg Tre Ile Lis  
 1940 1945 1950  
  
 Pro Asp Val Arg Ser Tir Tre Ile Tre Gln Leu Gln Pro Gln 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 Ile Thr Glu	Tyr Ile Ile Lys Tyr	
2015	2020	2025
Glu Lys Pro Glu Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg		
2030	2035	2040
Pro Glu Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Glu Leu Glu Pro Glu Thr		
2045	2050	2055
Glu Tyr Thr Ile Thr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser		
2060	2065	2070
Gln Pro Leu Ile Glu Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu		
2075	2080	2085
Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Glu Pro Glu Ile Leu Asp		
2090	2095	2100
Val Pro Ser Thr Val Gln Lys Thr Pro Fen Val Thr His Pro Glu		
2105	2110	2115
Tyr Asp Thr Glu Asn Glu Ile Gln Leu Pro Glu Thr Ser Glu Gln		
2120	2125	2130
Gln Pro Ser Val Glu Gln Gln Met Ile Fen Glu Glu His Glu Fen		
2135	2140	2145
Arg Arg Thr Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Pro Ile Arg His Arg		
2150	2155	2160
Pro Arg Pro Thr Pro Pro Asn Val Glu Glu Ile Gln Ile Glu		
2165	2170	2175
His Ile Pro Arg Glu Asp Val Asp Thr His Leu Thr Pro His Glu		
2180	2185	2190
Pro Glu Leu Asn Pro Asn Ala Ser Thr Glu Gln Glu Ala Leu Ser		
2195	2200	2205
Gln Thr Thr Ile Ser Thr Ala Pro Fen Gln Asp Thr Ser Glu Thr		
2210	2215	2220
Ile Ile Ser Cys His Pro Val Glu Thr Asp Glu Glu Pro Leu Gln		
2225	2230	2235

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

Met Pro Ieu Asp Val Gln Ala Asp Arg Glu Asp Ser Arg Glu  
2468 2470 2475

Lisboa, 7 de Março de 2014.

## REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao抗原 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 angiogénesis no neoplasma de um sujeito.
2. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao抗原 para uso de acordo com a reivindicação 1, em que o referido anticorpo ou fragmento de ligação ao抗原 não se liga à endosialina de murina.
3. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao抗原 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抗原 para a endosialina é menor que  $1 \times 10^{-7}$  M.
4. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao抗原 para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido anticorpo ou fragmento de ligação ao抗原 é um anticorpo quimérico ou fragmento de ligação ao抗原 quimérico, ou é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao抗原 humanizado.
5. Um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao抗原 para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido anticorpo ou fragmento de ligação ao抗原 comprehende 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抗原 para uso de acordo com a reivindicação 5, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao抗原 comprehende 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抗原 para uso de acordo com a reivindicação 6, em que o anticorpo ou fragmento de ligação ao抗原 comprehende 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抗原 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抗原 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抗原 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

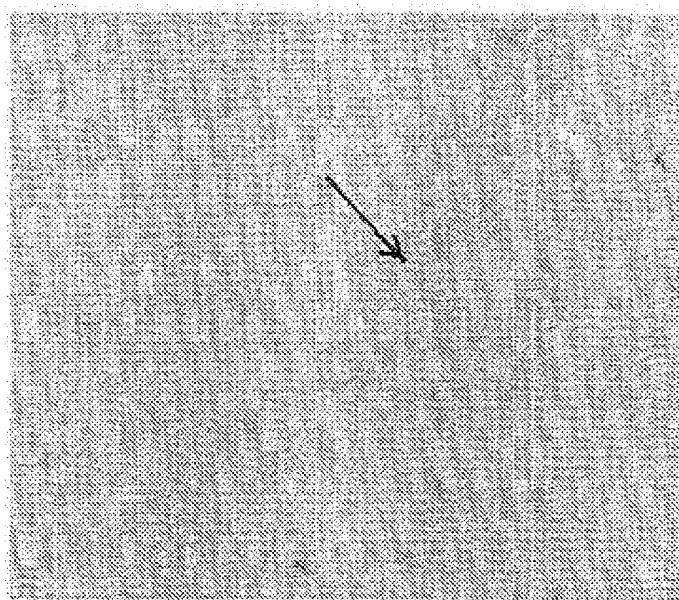


FIG. 1A

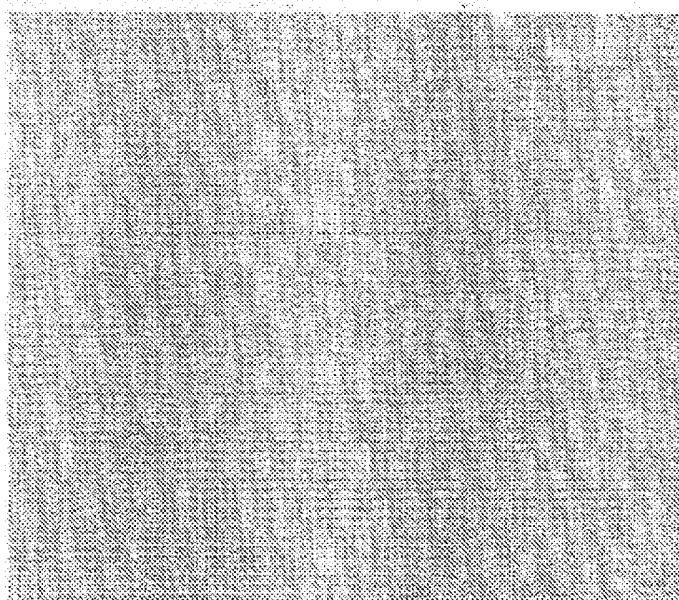


FIG. 1B

2/17

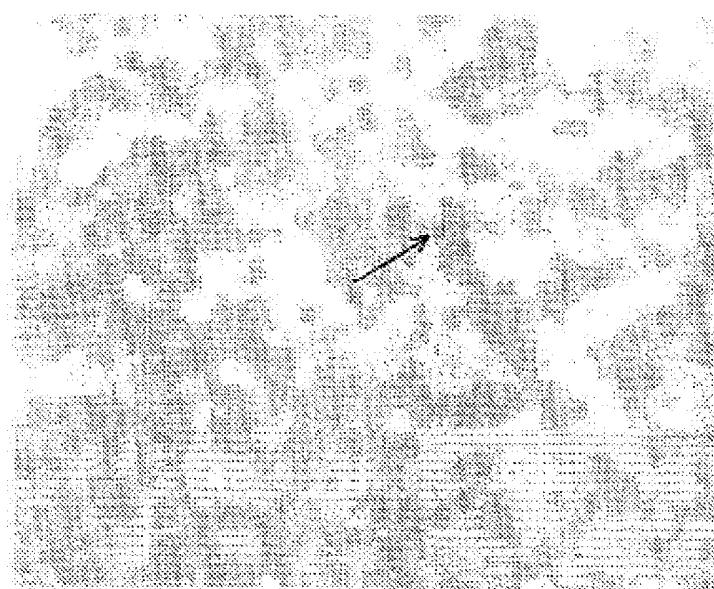


FIG. 2A

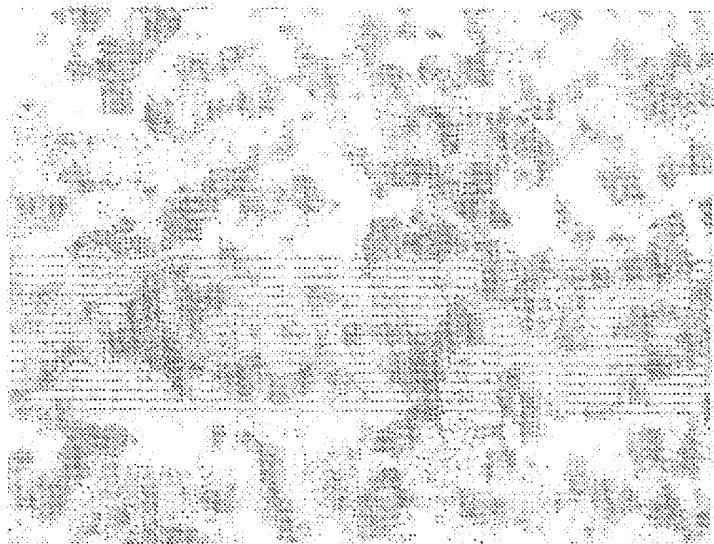
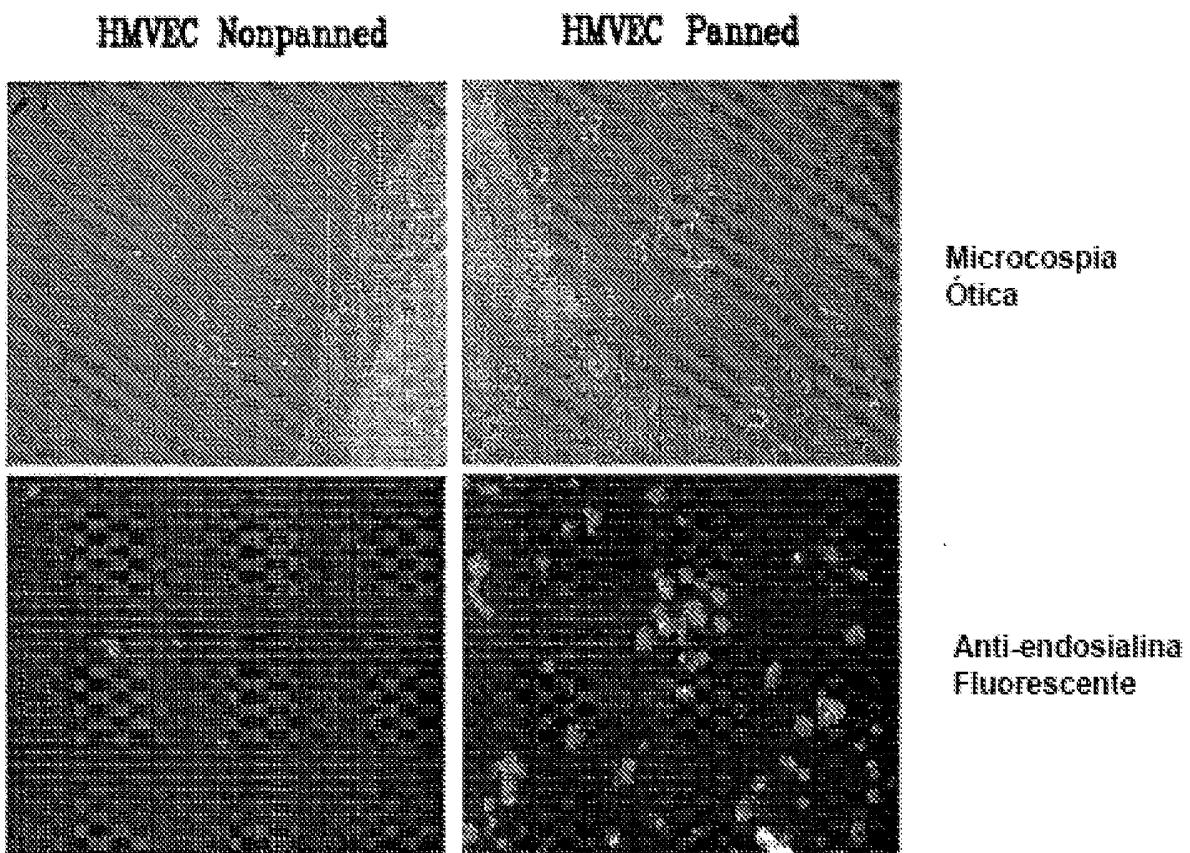


FIG. 2B

3/17



*FIG. 3*

4/17

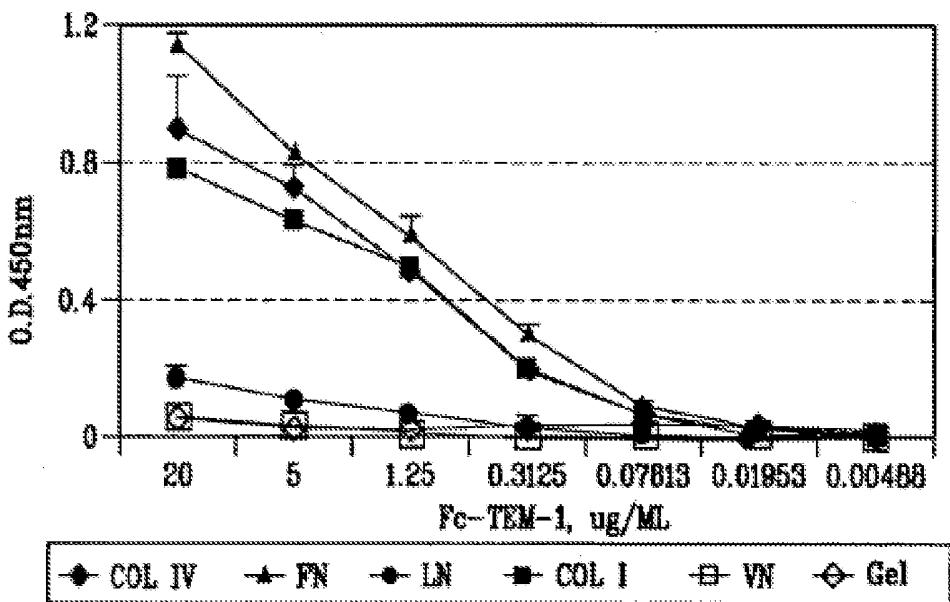


FIG. 4A

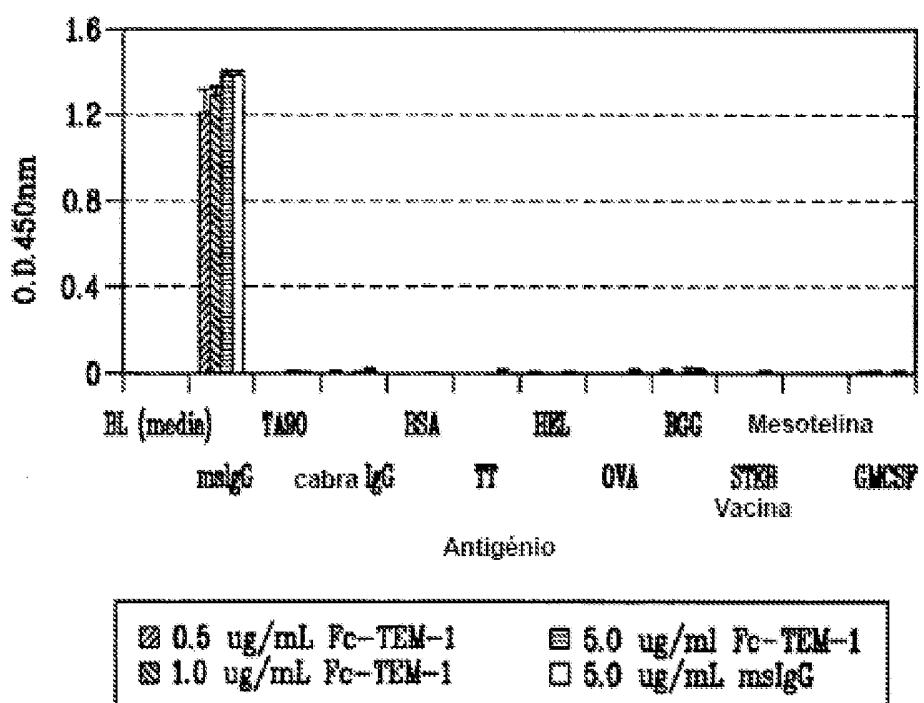
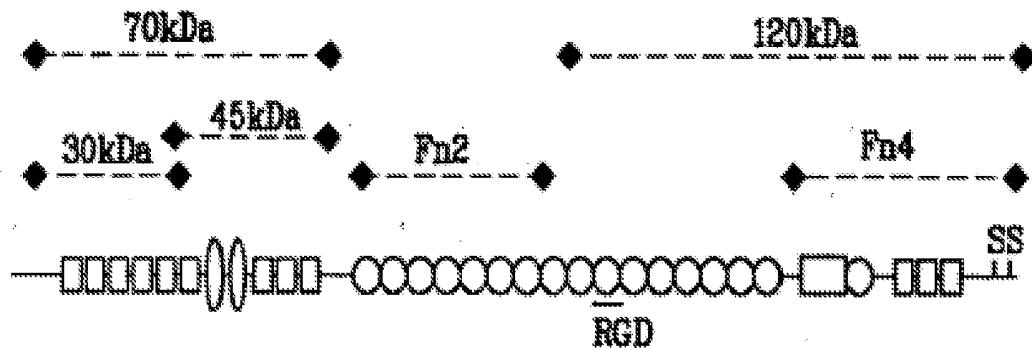


FIG. 4B

5/17



Domínio tipo I     Domínio tipo II     Domínio tipo III     Sequência variável

FIG. 5

6/17

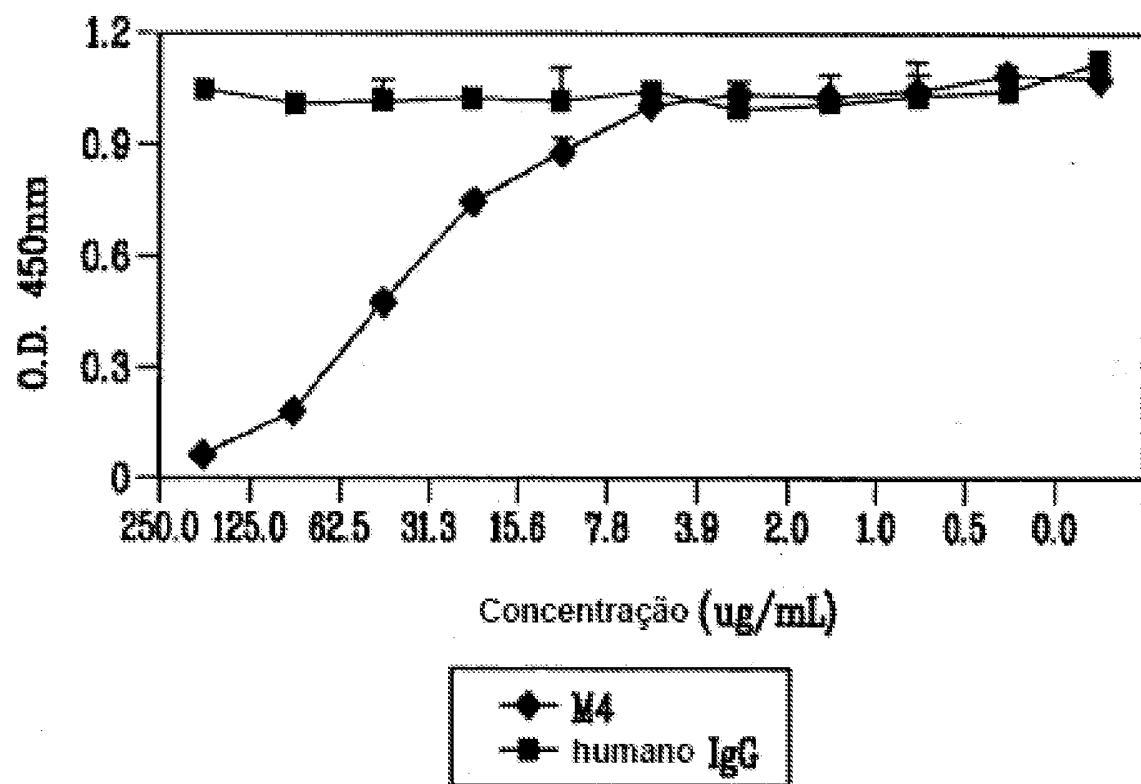


FIG. 6

7/17

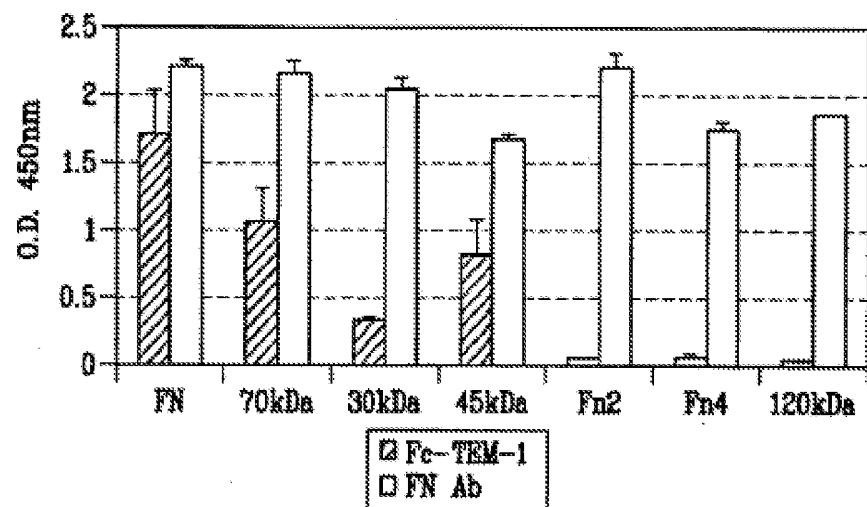


FIG. 7A

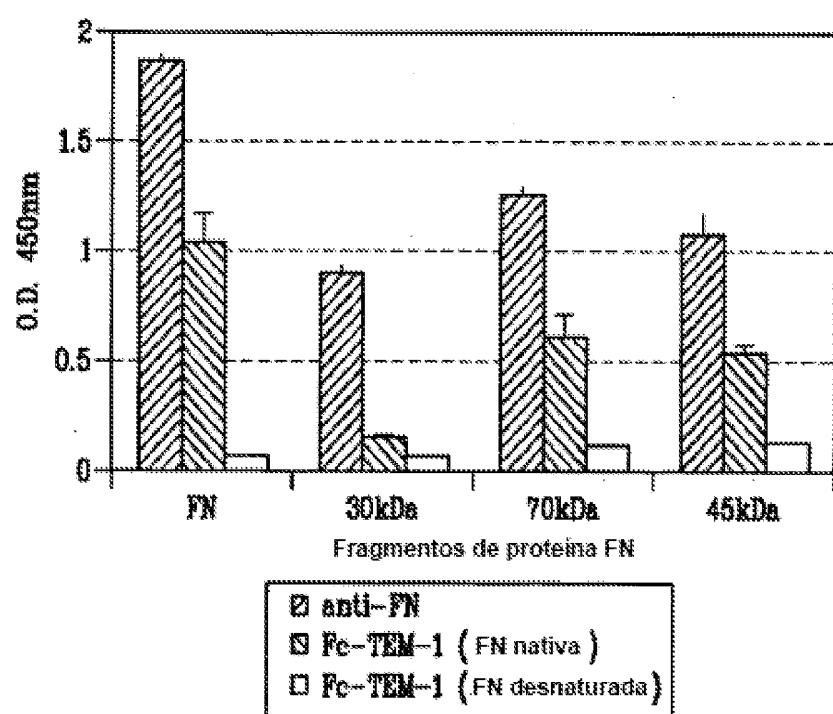


FIG. 7B

8/17

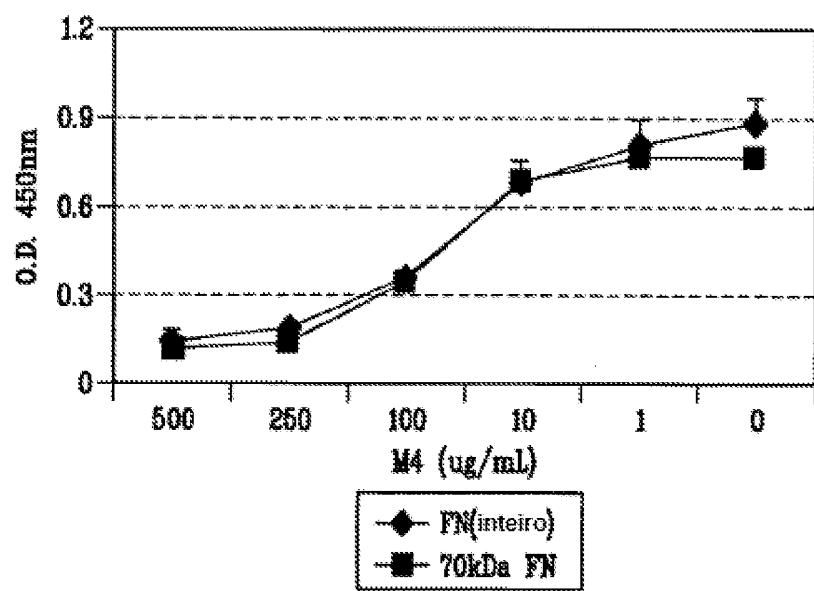


FIG. 7C

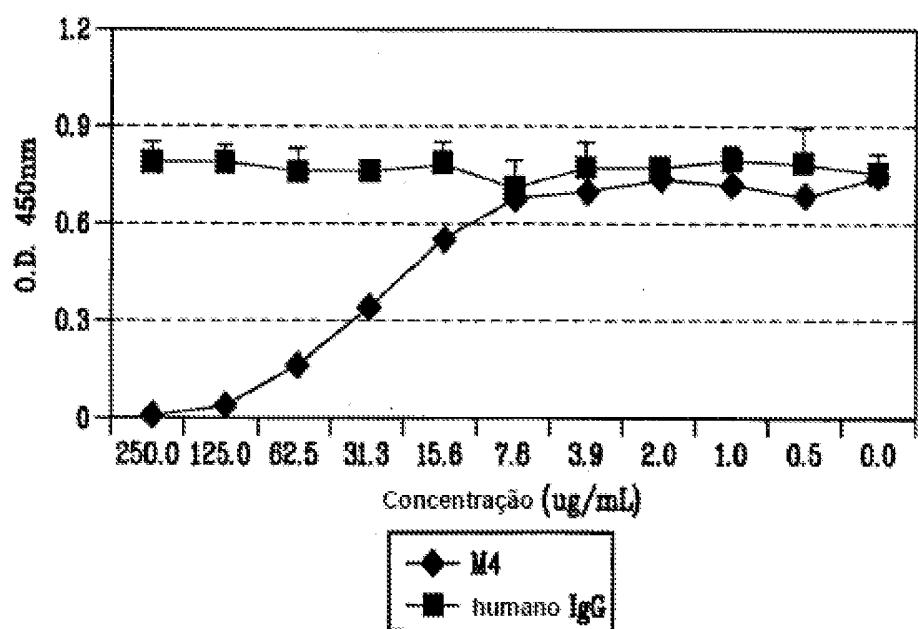
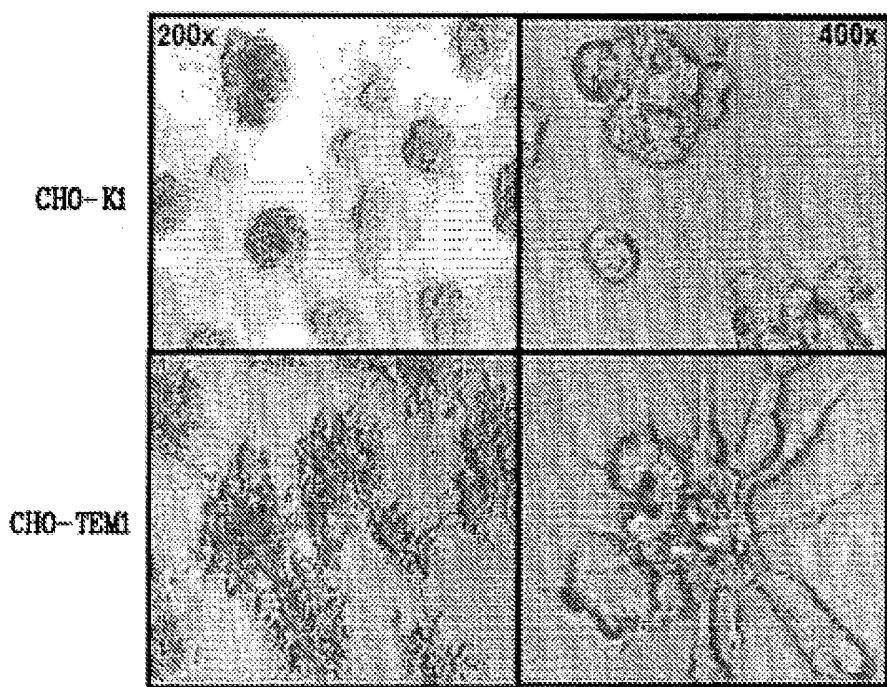


FIG. 7D

9/17



*FIG. 8*

10/17

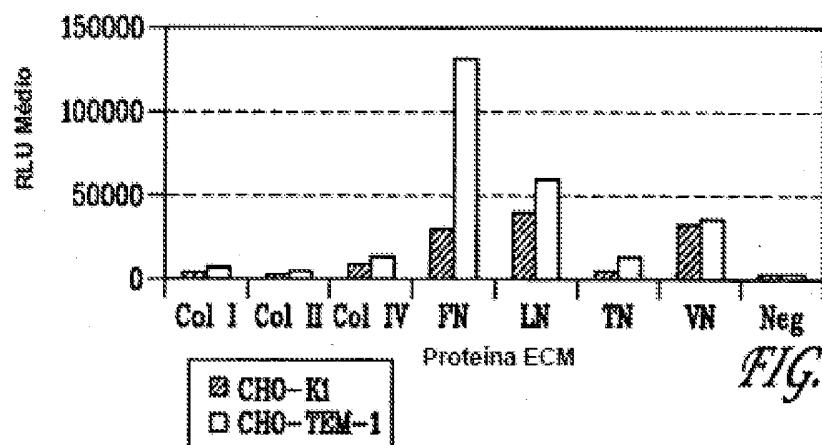


FIG. 9A

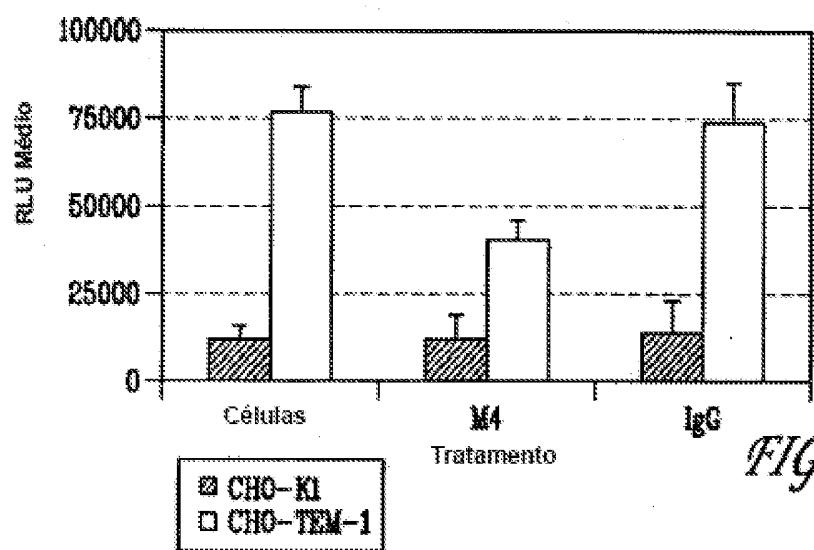


FIG. 9B

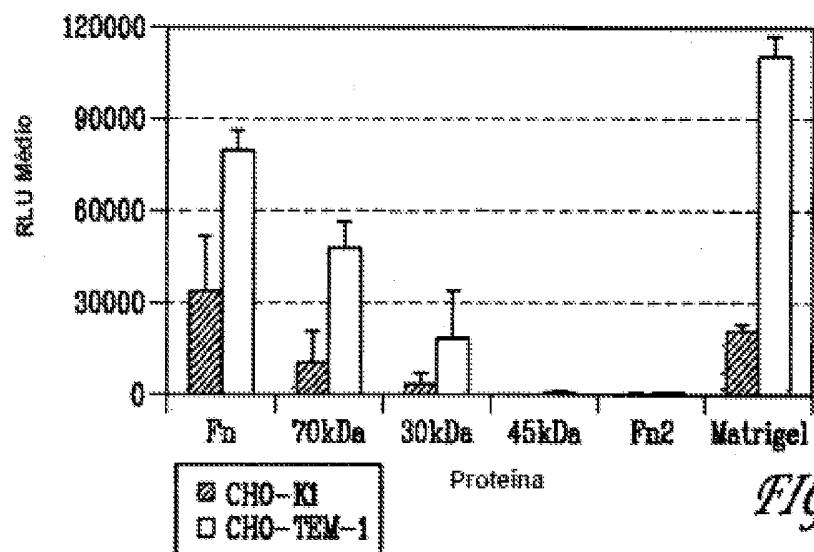
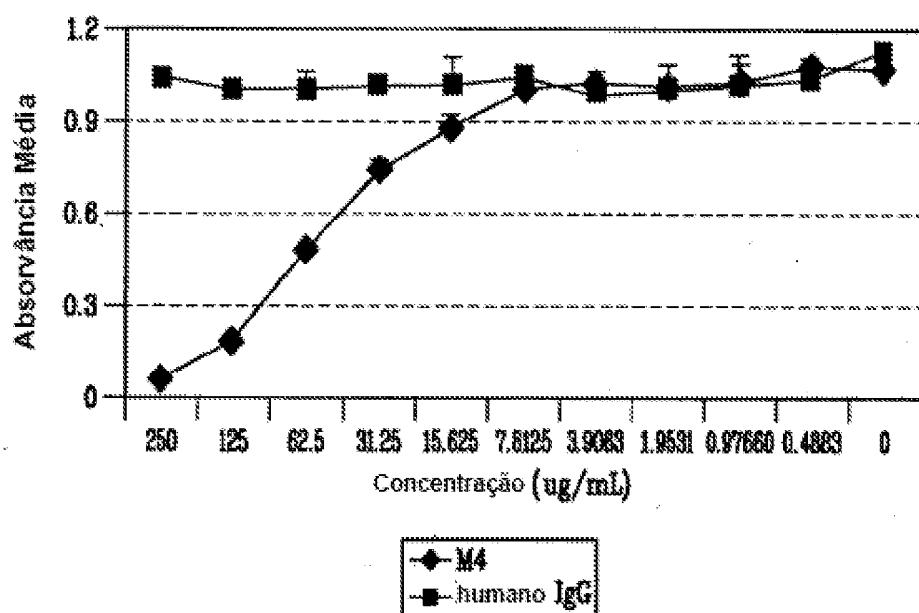


FIG. 9C

11/17

**Endosialina liga-se ao Colagénio I e M4 inibe a ligação**

**Inibição de M4 da ligação de Fc-TEM1 a COL I**

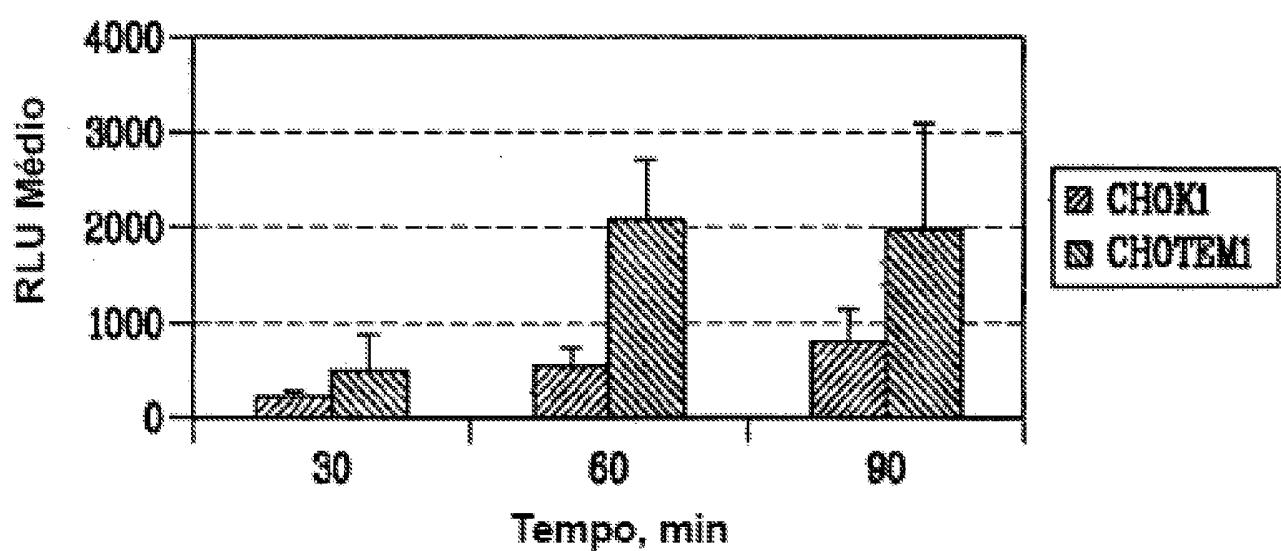


*FIG. 10*

12/17

**Endosialina aumenta a adesão celular ao colagénio**

**Adesão de CHO-K1 e CHO-TEM1 a placa revestido com COL I**



**FIG. 11**

13/17

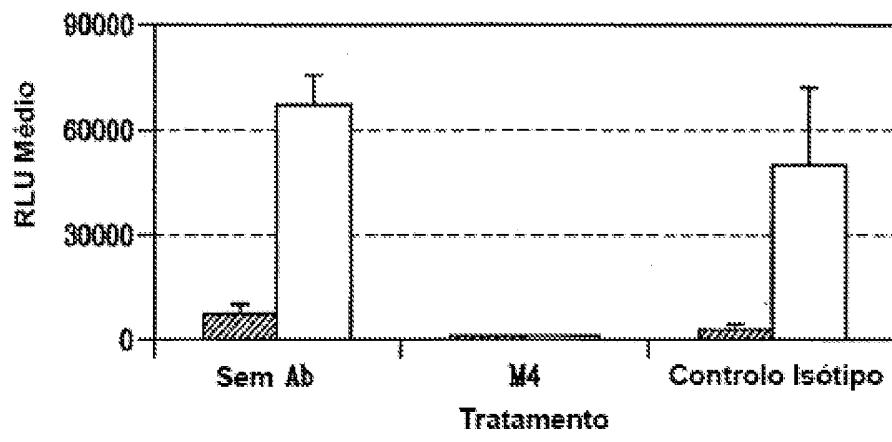


FIG. 12A

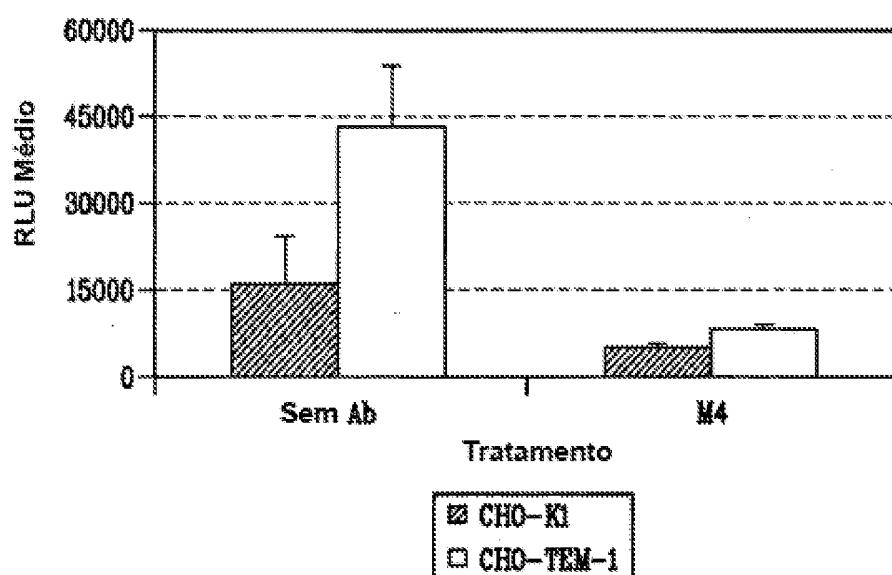
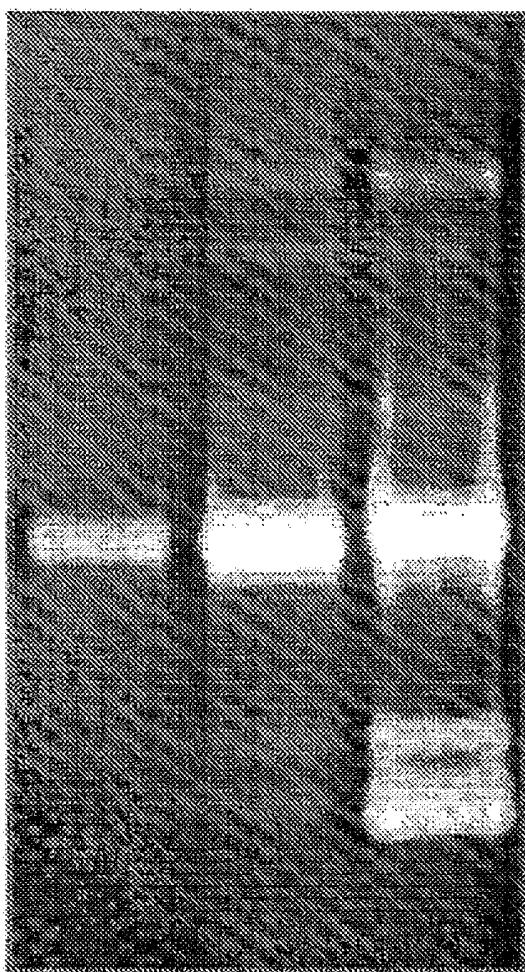


FIG. 12B

14/17

CHO-  
CHO-K1    TEM-1    MMP-2/9

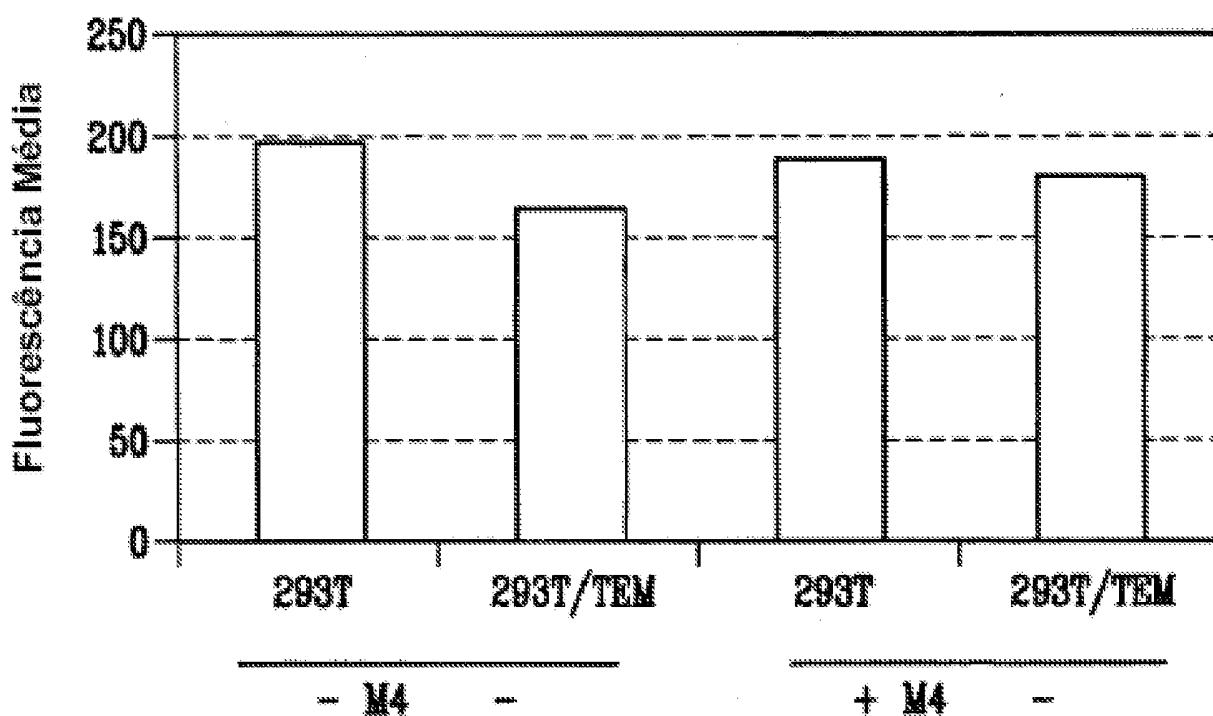


- ← proMMP-9 (180kDa)
- ← (Banda desconhecida)
- ← (Banda desconhecida)
- ← MMP-9 (92kDa)
- ← proMMP-2 (68kDa)
- ← MMP-2 (62kDa)

FIG. 13

15/17

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



*FIG. 14A*

16/17

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

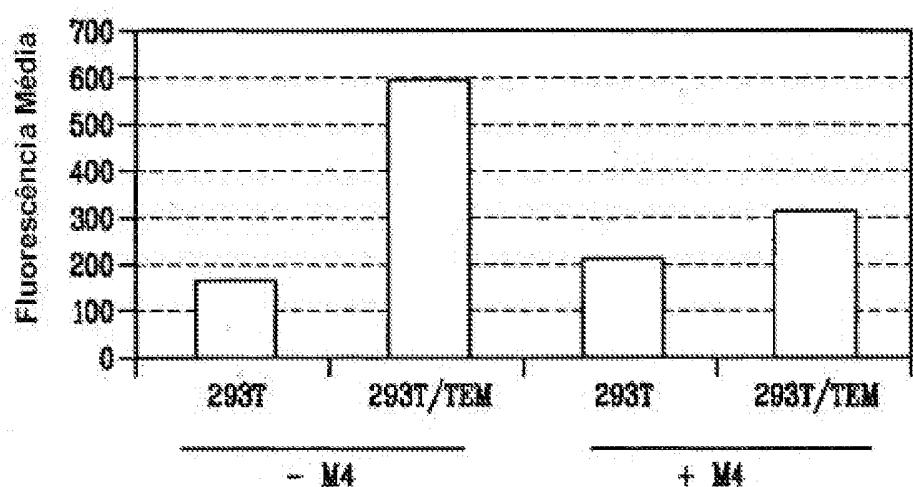


FIG. 14B

17/17

