



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 478**

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01980305 .5**

96 Fecha de presentación : **30.08.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1381629**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2004**

54 Título: **Receptor del dominio ED_b de fibronectina (II).**

30 Prioridad: **07.09.2000 DE 100 45 803**
02.05.2001 DE 101 23 133

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es:
Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft
Mullerstrasse 178
13353 Berlin, DE

72 Inventor/es: **Menrad, Andreas;**
Redlitz, Alexander;
Koppitz, Marcus;
Egner, Ursula y
Bahr, Inke

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 312 478 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptor del dominio ED_b de fibronectina (II).

5 El invento describe una proteína, que se fija específicamente al dominio ED_b de fibronectina.

10 Las fibronectinas son una importante clase de glicoproteínas de matriz. Su cometido principal consiste en hacer posible la adhesión de células a un gran número de diferentes matrices extracelulares. La presencia de fibronectinas sobre la superficie de células no transformadas en fase de cultivo, así como su ausencia en el caso de células trans-
15 formadas condujo a la identificación de fibronectinas como importantes proteínas de adhesión. Ellas interactúan con otras numerosas moléculas diferentes, p.ej. de colágeno, proteoglicanos de sulfato de heparano y fibrina, y regulan de esta manera la forma de las células y la estructura del citoesqueleto. Además, ellas son responsables de una migración celular y de una diferenciación celular durante la embriogénesis. Además, ellas son importantes para la cicatrización de las heridas, en cuyo caso ellas hacen posible la migración de macrófagos y otras células inmunitarias en la región afectada, y en el caso de la formación de coágulos de sangre, al hacer posible ellas la adhesión de plaquetas sanguíneas a regiones dañadas de los vasos sanguíneos.

20 Las fibronectinas son unos dímeros de dos péptidos similares, teniendo cada una de las cadenas una longitud de aproximadamente 60 - 70 nm. Han sido identificadas por lo menos 20 diferentes cadenas de fibronectinas, todas las cuales se producen mediante un empalme alternativo del transcrito en ARN de un gen de fibronectina individual. Un análisis de digestiones proteolíticas de una fibronectina muestra que los polipéptidos se componen de seis dominios fuertemente plegados, cada uno de los cuales a su vez contiene unas denominadas secuencias de repetición (en inglés "repeats"), cuyas similitudes en lo referente a su secuencia de aminoácidos permiten una clasificación en tres tipos (los tipos I, II, III). La región central de ambas cadenas del dímero se compone de un segmento de unas denominadas repeticiones del tipo III, que en promedio tienen una longitud de 90 aminoácidos (Kombliht AR, Vibe-Pedersen K y Baralle FE, 1983. Aislamiento y caracterización de clones de ADNc (cromosómico) para fibronectinas humanas y bovinas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 3218-22). Unos estudios estructurales han establecido que cada repetición del tipo III se compone de siete cadenas beta, que están plegadas en dos hojas de pliegue antiparalelas, estando expuestas unas cortas regiones de bucle (en inglés "loop" como potenciales sitios de interacción de una proteína con otra proteína (Leahy DJ, Hendrickson WA, Aukhil I und Erickson HP. 1992. Estructura del dominio de fibronectina del tipo III a partir de tenascina regulada en fases mediante un análisis MAD de la proteína selenometionilo. *Science*, 258, 987-91). Estas repeticiones del tipo III hacen posible que las fibronectinas actúen como moléculas de adhesión, que interactúan con moléculas de superficies celulares, las denominadas "integrinas". El concepto de la integrina se utilizó en 1987 por primera vez en un artículo de compendio (Hynes R.O., 1987, *Cell* 48, 549-550), con el fin de describir a un grupo afín de moléculas de superficies celulares heterodímeras, que actúan como mediadoras entre la matriz extracelular y el citoesqueleto intracelular, y de esta manera inducen la adhesión y la migración celulares. Estos receptores heterodímeros "integran" o transmiten por lo tanto señales precedentes del medio extracelular con funciones celulares específicas. Hasta hoy en día se han conocido 17 subunidades beta, que pueden interactuar de una manera específica y no covalente con más de 20 subunidades alfa, para formar de esta manera más de 20 diferentes familias (Plow E. F. y colaboradores 2000, *J Biol Chem*, 275, 21785-21788). En particular, la secuencia RGDS, que se encuentra en la décima repetición del tipo III de la fibronectina (III-10), media en la interacción de una fibronectina con por lo menos 8 diferentes integrinas. Además de esto, se mostró que por lo menos cuatro integrinas pueden interactuar específicamente con una fibronectina de un modo independiente de la RGDS (Plow E. F. y colaboradores 2000, *J Biol Chem*, 275, 21785-21788). El conjunto de la secuencia de repetición del tipo III abarca, junto a las secuencias III7, III8, III9 y III10, también las secuencias de repetición EIIIB y EIIIA (ED_b y ED_a). Las funciones de estas dos secuencias de repetición no han sido comprendidas hasta ahora o solamente lo han sido en una pequeña medida. Un estudio de Jamagin W. y colaboradores (Jamagin W, Rockey D, Koteliansky V, Wang S. y Bissell D. 1994, expresión de fibronectinas variantes en la cicatrización de heridas: fuente celular y actividad biológica del segmento EIIIA en una fibrogénesis hepática de rata. *J Cell Biol*, 127, 2037-4.8), sugiere que el dominio ED_a participa en el caso de una respuesta temprana del hígado a una lesión, y además el dominio ED_a parece ser que participa en la mediación de procesos de adhesión de células. Una isoforma de fibronectina, que contiene la secuencia de ED_b (ED_b-FN o ED-B o EDB) no puede detectarse en un tejido normal de un adulto, pero muestra una fuerte expresión en un tejido fetal así como en un tejido tumoral, al igual que también durante la cicatrización de heridas. Durante el desarrollo de un tumor, la matriz extracelular del tejido, en el que crece el tumor, es reconstruida mediante una degradación proteolítica de componentes ya existentes de la matriz. En este caso resulta una matriz extracelular inducida por un tumor, que se diferencia de la de tejidos normales, ofrece un entorno más apropiado para el crecimiento de tumores y favorece a la angiogénesis. La angiogénesis es uno de los más importantes procesos en el caso del crecimiento de tumores y designa al proceso, en el que unos nuevos vasos proceden de vasos revestidos con endotelio existentes. La angiogénesis es un proceso invasivo, que exige una proteólisis de la matriz extracelular, una proliferación, una migración y una diferenciación dirigidas de células endoteliales en nuevos capilares, que apoyan el crecimiento de un tumor más allá de una determinada magnitud.

65 Una fibronectina (FN) con ED_b ha sido puesta en vinculación con el crecimiento de tumores. Además una ED_b-FN es enriquecida con nuevos vasos sanguíneos durante procesos angiogénicos y pone a disposición por consiguiente un marcador para la angiogénesis (Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L (1994) *Int. J. Cancer* 59:612-618).

El dominio ED_b es una secuencia de repetición del tipo III, que comprende 91 aminoácidos, y tiene una homología de secuencias extremadamente alta entre la fibronectina de rata y la fibronectina de gallina, que está situada entre

96% y 100%. Dentro del dominio no se presenta ningunas secuencias RGDS ni de otros aminoácidos, de las cuales se conozca que ellas median en una interacción con integrinas. La función exacta del dominio ED-B es desconocida hasta la fecha. Se han publicado tres estudios, que ponen en marcha especulaciones acerca de una función favorecedora general en lo que se refiere a la adhesión/propagación celular para diferentes células.

Chen y Culp (1996), *Exp. Cells Res.* 223, 9-19, han mostrado que ciertas fibronectinas celulares contienen el dominio ED_b y secuencias de repetición contiguas del tipo III como secuencias que en ciertas circunstancias favorecen a la adhesión, las cuales pueden ser reguladas por las células mediante un empalme alternativo del transcrito primario de una fibronectina.

En un posterior estudio (de Chen y Culp, 1998, *Clin. Exp. Metast.*, 16, 1, 30-42) se pudo mostrar que el ED_b induce sucesos de señales celulares, que conducen a una fosforilación de tirosina de proteínas de adhesión focal, y ciertamente con un mecanismo que se diferencia del que es mediado por las secuencias de repetición III8-9-10, que reconocen a integrinas. Se ha reconocido crecientemente que la adhesión celular a matrices extracelulares o respectivamente a otras células, es una fuente importante para señales de células, la cual es responsable de la regulación de muchos fenómenos, tales como p.ej. el crecimiento, la diferenciación y la transformación de células. Una emisión de señales inducida por adhesión comprende la activación de proteína - tirosina - cinasas y una cascada de la fosforilación de tirosina de diferentes moléculas de señalización. Los autores del estudio que se acaba de mencionar apuntan a que para este proceso de señalización es de importancia primordial la cinasa de adhesión focal (FAK, de Fokale Adhäsions Kinase) con un tamaño de 125 kDa, que vincula a la interacción de células con proteínas de matriz con la activación de moléculas de señalización intracelulares, tales como por ejemplo la Src (Xing Z, Chen HC, Nowlen JK, Taylor SJ, Shalloway D y Guan JL, 1994, interacción directa de v-Src con la cinasa de adhesión focal mediada por el dominio SH2 de Src, *Mol Biol Cell.* 5, 413-21), el Grb2 (Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T y van der Geer P, 1994, transducción de señales mediada por integrinas, enlazada con la trayectoria de una Ras por fijación de GRB2 a la cinasa de adhesión focal. *Nature*, 372, 786-91) y la cinasa de PI-3 (Chen HC y Guan JL, 1994, asociación de una cinasa de adhesión focal con su sustrato potencial fosfatidil-inositol 3-cinasa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 10148-52). De otra proteína de adhesión focal distinta, la p130cas, se supone asimismo que ella participa en el caso de sucesos de señales mediados por adición y en el caso de específicas actividades de oncogenes, aunque su función exacta no ha sido explicada hasta ahora (Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, y colaboradores 1994, una nueva molécula de señalización, la p130, forma *in vivo* complejos estables con v-Crk y con c-Src de una manera dependiente de la fosforilación de tirosina. *EMBO J.* 13, 3748-56; Petch LA, Bockholt SM, Bouton A, Parsons JT y Burrige K, 1995, fosforilación de tirosina, inducida por adhesión, del sustrato de SRC p130. *J Cell Sci*, 108, 1371-9; Polte TR y Hanks SK, 1995, interacción entre la cinasa de adhesión focal y el sustrato p130^{Cas} de la tirosina cinasa, asociado con Crk, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 10678-82).

El estudio de Chen y Culp (1998, véase una cita anterior) muestra que la mono-proteína de repetición ED_b era más fuertemente favorecedora de la propagación de células Balb/c 3T3, así como de la inducción de la fosforilación de tirosina de FAK, que las secuencias de repetición contiguas III8, etc. Se establece la suposición de que en el caso de unas concentraciones fisiológicas de las fibronectinas celulares, la fijación del tetrapéptido RGDS procedente de III10 a las integrinas genera posiblemente una señal no suficientemente fuerte para la adhesión celular, de manera tal que en el caso de los mecanismos mediados por la interacción entre III10 y una integrina no se llega a ninguna respuesta de fosforilación de tirosina. Se supone además que la diferencia en lo que se refiere a la respuesta a las diferentes adhesiones celulares mediadas es causada por una activación distinta de diferentes proteínas pequeñas que se fijan a GTP. Tres de estas proteínas, las cdc42, rac y rho, todas las cuales son miembros de la superfamilia ras, desempeñan unos importantes cometidos en el caso de modificaciones morfológicas de células. La cdc42 actúa sucesivamente secuencia arriba de rac e induce directamente la aparición de filopodios (Nobes CD y Hall A, 1995, las GTPasas de Rho, rac, y cd42 regulan el ensamble de complejos focales multimoleculares asociados con fibras de estrés de actinas, lamelipodios y filopodios, *Cell* 81, 53-62). La activación de la rac es entonces responsable de la formación de lamelipodios y de la red de filamentos de actinas entre los filopodios. Situada secuencia abajo más adelante, la rho puede ser activada por la rac e induce adhesiones focales y fibras de tracción de actinas. Todos estos sucesos son dependientes de la activación de una tirosina cinasa, y de una FAK se supone que ella participa en estos procesos. Chen y Culp establecen la suposición de que las diferencias morfológicas entre células, que son adherentes a través de 7-ED_b-8, así como entre células, que son adherentes a través de 8-9-10, se basan en la diferente activación de las pequeñas proteasas que se fijan a GTP. A partir de esto se saca la conclusión de que una adhesión a través de 8-9-10 por la vía de señalización mediada por integrinas conduce finalmente a una activación de la rho, con el fin de generar adhesiones focales y fibras de tracción de actinas, mientras que la adhesión de células Balb/c-3T3 a través de 7-ED_b-8 conduce solamente a una activación de las proteínas cdc42 y rac, pero no activa a la rho. Para las suposiciones que se acaban de mencionar, no se presentan sin embargo datos en ninguno de los dos estudios.

Otro estudio (de Hashimoto-Uoshima y colaboradores, 1997, *J. Cell Sci.* 110, 2271-2280) muestra que la adhesión a células de fibroblastos cultivados es reforzada por la presencia de fragmentos de fibronectinas, que incluyen el dominio ED_b de fibronectina. A partir de esto se saca la conclusión de que el dominio ED_b empalmado puede tener una importante función biológica en lo que se refiere al refuerzo de la adhesión y propagación de células. Por el contrario, la inclusión del ED_a en fragmentos en ausencia del ED_b impide la formación de buenas adhesiones focales en células. Basándose en esto, los autores de este estudio especulan que la inclusión de ambos dominios en la molécula de una fibronectina puede constituir un mecanismo, con el cual se consigue una adhesión de células en la medida en que se facilitan los procesos de movimiento de avance, en los cuales se necesitan tanto una adhesión como también pérdidas de la adhesión para el movimiento de avance de células.

ES 2 312 478 T3

Unas investigaciones con embriones de gallina y con ratones adultos mostraron que una angiogénesis mediada por el ED_b puede ser bloqueada mediante una inhibición de la integrina de células endoteliales $\alpha 3\beta 1$ (Renato y colaboradores, AACR 2001, LB-60).

5 Ninguno de los estudios e investigaciones que se han mencionado proporciona sin embargo una clara respuesta en lo referente a la función del dominio ED_b, ni se presentan informaciones acerca de la intensidad de un posible receptor (o de unos posibles receptores) para el dominio ED_b.

10 Por lo tanto, una misión del presente invento es la de explicar aun más la función del dominio ED_b. Otra misión adicional del presente invento es la de identificar a un posible receptor específico para el dominio ED_b. Una misión adicional del presente invento es la de explicar el mecanismo de adhesión específico para el ED_b y la interacción con moléculas de receptores, que podrían participar en el proceso de la angiogénesis. Además una misión del presente invento es la de identificar una región de ED_b que sea responsable de la fijación específica.

15 Se describe

una proteína,

20 a) que tiene la capacidad de fijarse específicamente al dominio ED_b de fibronectina;

b) que es expresada o activada específicamente en células endoteliales;

c) que es expresada o activada específicamente en células estromales de un tumor;

25 d) que es expresada o activada específicamente en células tumorales;

e) cuya fijación al dominio ED_b de fibronectina es inhibida por medio de un polipéptido; y

30 f) que tiene un peso molecular aparente de 120 - 130 kDa para la cadena ligera y uno de 150 - 160 kDa para la cadena pesada, determinados mediante una electroforesis en gel de SDS-poli(acrilamida) (SDS-PAGE).

Es preferida en particular una proteína,

35 a) que tiene la capacidad de fijarse específicamente al dominio ED_b de fibronectina, estando caracterizada la región de fijación por al menos una secuencia, que se selecciona entre el conjunto, que comprende las SEQ ID NO: 1 - 3;

b) que es expresada o activada específicamente en células endoteliales;

40 c) que es expresada o activada específicamente en células estromales de un tumor;

d) que es expresada o activada específicamente en células tumorales;

45 e) cuya fijación al dominio ED_b de fibronectina es inhibida por medio de un polipéptido, que comprende una secuencia, que se selecciona entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO:1 - 3; y

f) que tiene un peso molecular aparente de 120 - 130 kDa para la cadena ligera y uno de 150-160 kDa para la cadena pesada, determinados mediante una electroforesis en gel de SDS-poli(acrilamida).

Es muy especialmente preferida una proteína,

50 a) que tiene la capacidad de fijarse específicamente al dominio ED_b de fibronectina, y que comprende la cadena $\alpha 2\beta 1$ de la integrina;

b) que es expresada o activada específicamente en células endoteliales;

55 c) que es expresada o activada específicamente en células estromales de un tumor;

d) que es expresada o activada específicamente en células tumorales;

60 e) cuya fijación al dominio ED_b de fibronectina es inhibida por un polipéptido, y que comprende la cadena α de la integrina; y

f) que tiene un peso molecular aparente de 120 - 130 kDa para la cadena ligera y uno de 150 - 160 kDa para la cadena pesada, determinados mediante una electroforesis en gel de SDS-poli(acrilamida).

65 En una forma preferida de realización, las células endoteliales son células endoteliales en fase de proliferación.

En una forma preferida de realización, las células estromales son células de estroma de un tumor.

ES 2 312 478 T3

Se describe además una proteína, cuya fijación específica al dominio ED_b de fibronectina media en la adhesión de células endoteliales, de células de estroma de un tumor y de células de tumores. La región de fijación puede ser caracterizada aquí por al menos una secuencia, que está seleccionada entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO: 1 - 3 y que en particular comprende la cadena $\alpha 2\beta 1$ de la integrina.

Se describe también una proteína, cuya fijación específica al dominio ED_b de fibronectina induce la proliferación de células endoteliales. La región de fijación puede ser caracterizada aquí por al menos una secuencia, que está seleccionada entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO: 1 - 3 y que en particular comprende la cadena $\alpha 2\beta 1$ de la integrina.

Además, se describe una proteína, cuya fijación específica al dominio ED_b de fibronectina induce la proliferación, la migración y la diferenciación de células endoteliales en una matriz de colágeno, siendo caracterizada la región de fijación por al menos una secuencia. La región de fijación puede ser caracterizada aquí por al menos una secuencia que se selecciona entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO: 1 - 3 y que en particular comprende la cadena $\alpha 2\beta 1$ de la integrina.

Se describe además una proteína, que se fija al dominio ED_b de fibronectina e induce unas específicas vías de transducción de señales, siendo inducido por lo menos un gen, que codifica una proteína, que está seleccionada entre el conjunto que comprende

- una cinasa de adhesión focal,
- un ligando de CD6 (ALCAM),
- la cadena α del receptor de vitronectina,
- la subunidad alfa 8 integrada, y
- un/el precursor para una proteína afín a la folistatina.

La región de fijación puede ser caracterizada aquí por al menos una secuencia, que está seleccionada entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO: 1 - 3 y en particular la cadena $\alpha 2\beta 1$ de la integrina.

Se prefiere que en el caso de la inducción de vías específicas de transducción de señales, por lo menos uno de los mencionados genes sea inducido por lo menos una vez. De manera más preferida, en este caso se induce dos veces por lo menos uno de los mencionados genes.

Se describe también un anticuerpo, que está en situación de fijarse a una proteína de acuerdo con el presente invento.

Además, se describe un anticuerpo, que está en situación de fijarse a una proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos, que está seleccionada entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4.

En una forma preferida de realización, el anticuerpo está en situación de inhibir unos efectos que son específicos para el dominio ED_b.

Se prefiere que la fijación y la inhibición se efectúen *in vitro* y/o *in vivo*.

En una forma preferida de realización, el anticuerpo es monoclonal o recombinante.

En una forma preferida de realización, el anticuerpo es un fragmento scFv.

Se describe también una célula, que expresa una proteína de acuerdo con el presente invento.

Además, se describe una célula, que expresa un anticuerpo de acuerdo con el presente invento.

Por otra parte, se describe un fago, que expresa un anticuerpo de acuerdo con el presente invento.

Se describe también un procedimiento para el escrutinio en cuanto a compuestos, que se fijan a un receptor del dominio ED_b de fibronectina, comprendiendo el procedimiento:

Una comparación de una respuesta de células en presencia de uno o varios de estos compuestos, con la respuesta testigo de las mencionadas células en ausencia de estos compuestos, realizándose que las células

- expresan una proteína de acuerdo con el presente invento, o
- comprenden un ácido nucleico, que codifica esta proteína, y

ES 2 312 478 T3

siendo mediada la respuesta o respectivamente la respuesta testigo por un receptor del dominio ED_b de fibronectina.

En una forma preferida de realización, la respuesta o respectivamente la respuesta testigo comprende la adhesión de las células a unas superficies, que están revestidas con el dominio ED_b de fibronectina o con partes de éste.

En una forma preferida de realización del procedimiento, una región de fijación del dominio ED_b de fibronectina comprende las secuencias SEQ ID NO:1 - 4 o partes de las mismas.

Se prefiere que la respuesta o respectivamente la respuesta testigo comprenda la proliferación de las células junto a superficies, que están revestidas con el dominio ED_b de fibronectina o con partes de éste.

En una forma preferida de realización, la respuesta o respectivamente la respuesta testigo comprende la proliferación, la migración y la diferenciación de células endoteliales en una matriz de colágeno, que está reunida con el dominio ED_b de fibronectina o con partes de éste.

Se prefiere que los compuestos estén seleccionados entre el conjunto que comprende anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos artificiales, péptidos, compuestos de bajo peso molecular, aptámeros y espejmeros (= meros especulares).

En una forma preferida de realización, los anticuerpos son anticuerpos recombinantes.

Se prefiere que los anticuerpos se seleccionen entre el conjunto que comprende el scFv y fragmentos del mismo.

Se describe asimismo un procedimiento para el escrutinio en cuanto a compuestos que se fijan al dominio ED_b de fibronectina, comprendiendo el procedimiento:

a) poner en contacto unas células con una concentración fijamente establecida de una proteína, que comprende el dominio ED_b de fibronectina o una proteína con una de las secuencias representadas en SEQ ID NO:1 - 4, en la presencia de diferentes concentraciones de uno o varios de los compuestos; y

b) detectar diferencias en la respuesta de las células a la proteína, que comprende el dominio ED_b de fibronectina, o una proteína con una de las secuencias representadas en SEQ ID NO:1 - 4, en la presencia de los compuestos, en comparación con la respuesta testigo de las células a la proteína, que comprende el dominio ED_b de fibronectina, o una proteína con una de las secuencias representadas en SEQ ID NO:1 - 4, en la ausencia de estos compuestos, realizándose que

las células expresan una proteína de acuerdo con el presente invento, o

comprenden un ácido nucleico, que codifica esta proteína,

y realizándose que la respuesta o respectivamente la respuesta testigo es mediada por un receptor del dominio ED_b de fibronectina.

En tal caso se prefiere que la respuesta o respectivamente la respuesta testigo comprenda la adhesión de las células a unas superficies, que están revestidas con el dominio ED_b de fibronectina o con partes de éste.

Se produjeron anticuerpos monoclonales mediante métodos clásicos de la tecnología de los hibridomas y se caracterizaron inmunohistológicamente en criosecciones de un tumor humano (véase la Figura 13).

A modo de ejemplo: el AK AM-EDBr-2 (IgG 1/kappa murina).

En una forma preferida de realización, la respuesta o respectivamente la respuesta testigo comprende la proliferación de las células junto a superficies, que están revestidas con el dominio ED_b de fibronectina o con partes de éste.

En otra forma preferida de realización, la respuesta o respectivamente la respuesta testigo comprende la proliferación, la migración y la diferenciación de células endoteliales en una matriz de colágeno, que está reunida con el dominio ED_b de fibronectina o con partes de éste.

Se prefiere que los compuestos estén seleccionados entre el conjunto que comprende anticuerpos, anticuerpos artificiales, fragmentos de anticuerpos, péptidos, sustancias de bajo peso molecular y aptámeros especulares.

Se describe además la utilización de un ácido nucleico, que codifica una proteína, que comprende una secuencia, que está seleccionada entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO: 1 - 4, para el escrutinio en cuanto a compuestos, que se fijan a un receptor del dominio ED_b de fibronectina o al dominio ED_b de fibronectina.

Se describe también la utilización de una proteína de acuerdo con el presente invento o respectivamente de un anticuerpo de acuerdo con el presente invento para el escrutinio en cuanto a compuestos, que se fijan a un receptor del dominio ED_b de fibronectina o al dominio ED_b de fibronectina.

ES 2 312 478 T3

Asimismo se describe la utilización de una célula para el escrutinio en cuanto a compuestos que se fijan a un receptor del dominio ED_b de fibronectina o al dominio ED_b de fibronectina.

5 Se describe asimismo la utilización de un ácido nucleico, que codifica una proteína, que comprende una secuencia, que está seleccionada entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO: 1 - 4, para el desarrollo de anticuerpos o proteínas de fusión con el scFv para finalidades de diagnóstico o terapéuticas.

10 Se describe asimismo la utilización de una proteína de acuerdo con el presente invento para el desarrollo de anticuerpos o proteínas de fusión con el scFv para finalidades de diagnóstico o terapéuticas. Como finalidad terapéutica se entiende, entre otros, el tratamiento antiangiogénico con unos compuestos, que inhiben la interacción específica entre el ED_b y el receptor. Los anticuerpos están en este caso dirigidos tanto hacia el receptor como también hacia el ED_b, pasando a utilizarse los péptidos con las secuencias SEQ ID NO:1 - 3 y derivados estabilizados de los mismos así como compuestos de bajo peso molecular.

15 Se describe asimismo la utilización de una célula de acuerdo con el presente invento para el desarrollo de anticuerpos o de proteínas de fusión con el scFv para finalidades de diagnóstico o terapéuticas.

20 Se describe asimismo la utilización de un fago de acuerdo con el presente invento para el desarrollo de anticuerpos o de proteínas de fusión con el scFv para finalidades de diagnóstico o terapéuticas.

Se describe asimismo la utilización de una proteína, que comprende una secuencia, que está seleccionada entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO: 1 - 4, para una terapia proangiogénica.

25 Se describe asimismo la utilización de una proteína, que comprende una secuencia, que está seleccionada entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO: 1 - 4, para finalidades de diagnóstico.

Se describe asimismo la utilización de una proteína, que comprende una secuencia, que está seleccionada entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO: 1 - 4, en la terapia génica.

30 Se describe asimismo la utilización de una proteína, que comprende una secuencia, que está seleccionada entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO: 1 - 4, para el revestimiento de superficies, a las que se fijan células endoteliales.

35 En este caso se prefiere que el revestimiento se efectúe *in vitro* o *in vivo*.

Se describe asimismo la utilización de una proteína, que comprende una secuencia, que está seleccionada entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO: 1 - 4, en cultivos celulares.

40 Se describe asimismo la utilización de una proteína, que comprende una secuencia, que está seleccionada entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO: 1 - 4, en común con por lo menos un elemento trasplantado.

45 En este caso se prefiere que el elemento trasplantado se seleccione entre el conjunto que comprende uno o varios vaso(s), piel, córnea, riñón, hígado, médula ósea, corazón, pulmones, huesos, timo, intestino delgado, páncreas, otros órganos internos, así como partes y células de los mismos.

Se describe asimismo la utilización de una proteína, que comprende una secuencia, que está seleccionada entre el conjunto que comprende las SEQ ID NO: 1 - 4, en común con por lo menos un elemento implantado.

50 En este caso se prefiere que el elemento implantado se seleccione entre el conjunto que comprende implantes pulmonares, marcapasos artificiales, válvulas cardíacas artificiales, implantes vasculares, endoprótesis, tornillos, carriles, placas, alambres, clavos, varillas, articulaciones artificiales, implantes mamarios, placas craneales artificiales, dientes artificiales, rellenos dentales y puentes dentales.

55 Como “efectos que son específicos para el dominio ED_b de fibronectina” se entienden todos aquellos efectos, que son provocados por el dominio ED_b de fibronectina, pero no por los EIII7, EIII8, etc. Un efecto tal está descrito p.ej. en la cita de Chen y colaboradores, 1998 (véase una cita anterior), es decir una rápida fosforilación de tirosina en varias proteínas intracelulares, al contrario que la fosforilación más bien lenta después de una adhesión mediada por los dominio EIII8-9-10. Como “compuestos de bajo peso molecular” se entienden todos los compuestos, cuya masa molecular relativa está situada por debajo de aproximadamente 1.000 - 1.200. Como “aptámeros” se entienden unas moléculas constituidas a base de ácidos nucleicos, que están en situación de actuar como ligandos muy específicos para un gran número de biomoléculas. Como “una terapia proangiogénica” se entiende cualquier forma de terapia en la cual se debe favorecer la angiogénesis. Como “un tratamiento o una terapia antiangiogénico/a” se entiende cualquier tratamiento o forma de terapia que tenga como meta una inhibición de la angiogénesis. Como “una terapia génica” se entiende cualquier forma de la terapia, que tenga como meta la exclusión de una función errónea debida a un gen
65 o respectivamente al restablecimiento de una función génica normal en el caso de unas enfermedades que han de ser influidas por la eliminación o puesta a disposición de una proteína. Ella puede contener la introducción de un ADN ajeno en células corporales, pero no ha de ser considerada como limitada por ésta. Como “cultivos celulares” se deben de entender tanto los medios de cultivo de células como también los recipientes de cultivo de células. Se prefieren los

ES 2 312 478 T3

recipientes de cultivo de células que están seleccionados entre el conjunto que comprende frascos, cubetas, pocillos y placas de cultivo de células, placas de microtitulación, placas de 96 pocillos, matraces de cultivo de células y biorreactores.

5 Son “finalidades de diagnóstico” todas las finalidades que sirven para el reconocimiento de un estado de un organismo / de un órgano / de una célula, o respectivamente para la asociación de un estado actual de un organismo / de un órgano / de una célula a una determinada categoría de estado (p.ej. a una determinada enfermedad), por ejemplo ésta puede ser el empleo de un estuche / de reactivos químicos/ de una disposición de medición, para la determinación de una magnitud física, tal como la temperatura, etc., o de una magnitud química, tal como la concentración, etc., pero
10 no se debe de considerar como limitada a esto.

Son “finalidades terapéuticas” todas las finalidades que sirven para el mejoramiento o respectivamente para la curación de un estado morbo de un organismo / de un órgano / de una célula. Por el concepto de “la utilización de una proteína conjuntamente con un elemento implantado” se entiende o bien una utilización idéntica en el tiempo
15 o en el espacio. Por ejemplo, unas moléculas de proteínas pueden estar fijadas al elemento implantado al realizar la “incorporación” de éste en el cuerpo, o sino pueden estar separadas en el espacio del elemento implantado, pero son administradas en el mismo momento en que se realice la “incorporación” del implante (inyecciones, etc).

El invento es descrito ahora detalladamente con ayuda de los Ejemplos y de las Figuras siguientes.

20 En este contexto:

la Fig. 1 muestra una representación esquemática de las secuencias de repetición del tipo III que se utilizan en este estudio;

25 la Fig. 2 muestra los resultados de un ensayo de proliferación bajo la influencia del dominio ED_b de fibronectina (ED-B) sobre células endoteliales o respectivamente células estromales humanas, en diferentes sustratos;

30 la Fig. 3 muestra los resultados de un ensayo de germinación (en inglés tube formation test = ensayo de formación de tubos) de células endoteliales bajo la influencia del ED-B;

la Fig. 4 muestra los resultados de un ensayo de adhesión, en el cual se ensayó la adhesión de células endoteliales a superficies revestidas con el ED-B;

35 la Fig. 5 muestra los resultados de un ensayo, similar al representado en la Fig. 4, con la excepción de que las células habían sido previamente incubadas con diferentes péptidos sintéticos, cuyas secuencias son secuencias parciales del dominio ED_b de fibronectina;

40 la Fig. 6 muestra las secuencias parciales utilizadas en la Fig. 5, de los péptidos sintéticos procedentes del dominio ED_b de fibronectina;

la Fig. 7 muestra los resultados de un ensayo de adhesión de células endoteliales a diferentes péptidos de ED-B sintéticos;

45 la Fig. 8 muestra la situación de los péptidos sintéticos determinados en las Fig. 6-7 en una estructura modelo de la cadena principal de péptido del ED-B;

50 la Fig. 9 muestra el efecto del dominio ED_b de fibronectina y de un péptido que procede del bucle (loop) 5 (SEQ ID NO:2) sobre la inducción de estructuras similares a capilares en un ensayo de germinación (ensayo de formación de tubos);

55 la Fig. 10 muestra los resultados de dos pasadas de cromatografía por afinidad mediando utilización de Fn-7-8-9 o respectivamente de Fn-7-B-8-9 de materiales lisados celulares de células endoteliales cutáneas humanas marcadas en las superficies;

la Fig. 11 muestra los resultados de dos pasadas de cromatografía por afinidad mediando utilización de Fn-7-8-9 o respectivamente de Fn-7-B-8-9 de materiales lisados celulares de células estromales cutáneas humanas marcadas en las superficies;

60 la Fig. 12 muestra la purificación por cromatografía de afinidad del receptor de ED_bB.

la Fig. 13 muestra criosecciones de tumores humanos, caracterizadas inmunohistológicamente.

65 La Fig. 1 muestra diferentes fragmentos recombinantes de fibronectina utilizados en este estudio, que presentan una diversa estructuras del dominio con diferentes secuencias de repetición del tipo III. En este caso, Fn-7-B-8-9 comprende los dominios 7, ED_b, 8 y 9 de fibronectina, Fn-7-8-9 comprende los dominios 7, 8 y 9, ED-B comprende el dominio ED_b, Fn-10 comprende el dominio 10 y Fn-6 comprende el dominio 6. Estas proteínas fueron expresadas en *E. coli* como proteínas provistas de una marca (en inglés tag) de His, y fueron purificadas en una columna de Sepharose

ES 2 312 478 T3

y un quelato con níquel. Las denominaciones numéricas utilizadas en este estudio corresponden a las utilizadas en la bibliografía. En este contexto, las abreviaturas FN-B, ED-B, EDB y ED_b designan todas en cada caso al dominio ED_b de fibronectina y han de ser consideradas como sinónimas.

5 La Fig. 2 muestra los resultados de un ensayo de proliferación, en el que se investigó el efecto del dominio ED_b de fibronectina (ED-B) sobre la proliferación de células endoteliales (EC) o respectivamente de células de estroma (SC). 1.000 células por pocillo se incubaron en placas de 96 pocillos. Se añadió el ED-B soluble (10 µg/l) al medio durante el ensayo de proliferación. Después de tres días se determinó el número de células con el ensayo de MTS. La proliferación de las células fue inducida mediante el factor de crecimiento de fibronectina básico (bFGF). Se mostró, 10 que el ED-B no tenía ningún efecto en ausencia del bFGF, y asimismo no se pudo comprobar ningún efecto sobre las células para el dominio 10 de fibronectina del tipo III en presencia del bFGF (no se muestran los datos). Un efecto del ED-B sobre una proliferación de células endoteliales humanas se pudo comprobar en el caso de células, que habían sido sembradas en placas sobre gelatina (EC/gelatina), y asimismo en el caso de células que habían sido sembradas en placas sobre colágeno (EC/colágeno), no siendo sin embargo este último efecto tan manifiesto como en el caso de la siembra en placas sobre gelatina. En el caso de células estromales humanas sobre gelatina (SC/gelatina) ya tuvo lugar 15 en ausencia del bFGF una proliferación, la cual estaba situada manifiestamente por encima de la de células endoteliales humanas. Ella no pudo ser aumentada mediante la adición del bFGF o respectivamente del bFGF más ED-B. Como medida para el número de células se determinó la extinción a 490 nm.

20 Para el ensayo de proliferación se siguió el siguiente método experimental:

Material: placa de 96 pocillos (con fondo plano), de Nunc

Medio: MCDB 131, Pen/Strep, anfotericina (0,25 µg/ml), heparina (20 µg/ml), FCS (suero de ternero fetal desactivado por calor (al 5%))

Pen = penicilina; Strep = estreptomina

30 Método:

Unas células, a razón de 500-1.000 por pocillo (placa de 96 pocillos) en 100 µl, se cultivan durante 3 días en un medio con bFGF (1 - 3 ng/ml) o con VEGF (30 - 50 ng/ml). La cantidad exacta debería ser determinada por valoración para cada carga: es óptima la concentración mínima, que consigue una máxima estimulación de la proliferación. 35 Una sincronización de las células antes del experimento no es necesaria, pero se puede hacer. Después de 3 días se determina el número de células con el estuche de MTS (de Promega) de acuerdo con los datos del fabricante. Se recomienda medir la absorción en varios momentos con el fin de obtener una máxima absorción en la zona lineal (0,5; 1; 2; 4 horas)

40 Testigos:

Testigo negativo, sin ningún mitógeno (ninguna proliferación) (-bFGF/VEGF)

45 Testigo positivo, con un mitógeno (estimulación máxima) (+bFGF/VEGF)

La Fig. 3 muestra el efecto del ED-B sobre la germinación de células endoteliales a partir de unos esferoides. Para esto unos esferoides de HUVEC (de Human Umbilical Vein Endothelial Cells = células endoteliales de cordón umbilical humano) fueron embebidos en colágeno y mediante la adición de 10 µg/ml del bFGF (del inglés basic Fibroblast Growth Factor = factor de crecimiento de fibroblastos básico) se indujeron a la germinación en ausencia o presencia de 6 µg/ml del ED-B. Se mostró que mediante la adición del bFGF a solas se induce la germinación y luego se pudo estimular aun más mediante la adición de ED-B (+bFGF + ED-B).

55 Para el ensayo de germinación (ensayo de formación de tubos) se utilizó el siguiente método experimental:

Material:

Metil-celulosa, con la más alta viscosidad (Sigma)

60 Tripsina/EDTA para cultivo de células (Gibco)

Placas de 96 pocillos de fondo redondo (Greiner #650185)

65 bFGF recombinante (Gibco #13256-029)

VEGF recombinante (R & D System)

ES 2 312 478 T3

CD31 anti-rata (RDI #RDI-CD31TLD)

Heparina (Gibco #15077-027)

5

Soluciones:

PBS/antibióticos: cultivo de células-PBS 10 x Pen/Strep, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina (PBS = solución salina tamponada con fosfato)

10

1% de de gelatina (disco), tratar en autoclave y después de haber enfriado mezclar con Pen/Strep y con anfotericina (0,25 $\mu\text{g/ml}$).

15

Medio: MCDB 131, glutamina, Pen/Strep, anfotericina (0,25 $\mu\text{g/ml}$), heparina (20 $\mu\text{g/ml}$),
FCS desactivado por calor (10%)

Medio de crecimiento: medio con 2 ng/ml del bFGF y 10 ng/ml del VEGF

20

Células:

HUVEC

25

MVEC dérmicas (pasada >4)

Métodos:

30

Unas células endoteliales se desprenden por disolución con tripsina/EDTA y se diluyen hasta 5.000 células en un medio con 0,24% de metilcelulosa. En cada caso 200 μl (1.000 células) se añaden a pocillos de una placa de Greiner y se incuban durante una noche. Unos montones redondos de células (esferoides) se cosechan con una pipeta de 1 ml de capacidad con punta recortada y se centrifugan. Los esferoides se vuelven a suspender en 1,2% de metilcelulosa/FCS y se mezclan con un gel de colágeno neutralizado. El ED_b y el bFGF fueron copolimerizados.

35

Tal como se pone de manifiesto a partir de la Figura, mediante la adición de ED-B se efectúa un manifiesto aumento de la germinación por encima de la medida inducida por el bFGF.

40

La Fig. 4 muestra los resultados de un ensayo de adhesión de células endoteliales a placas de pocillos de microtitulación, que habían sido revestidas con ED-B. Para esto, unas células endoteliales procedentes de su recipiente de cultivo original fueron desprendidas mediante tripsinación (con tripsina/EDTA) desde su sustrato y luego fueron incubadas en placas de pocillos de microtitulación, que habían sido revestidas con diferentes concentraciones (0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) del ED-B y se dejaron adherir durante una hora. Como un testigo negativo sirvieron los pocillos, que habían sido revestidos con 1 mg/ml de BSA (albúmina de suero bovino); la adhesión a BSA (< 10%) fue restada.

45

La adhesión fue cuantificada mediante tinción con violeta cristal, seguida por una lisis con SDS (dodecil-sulfato de sodio). La cuantificación se efectuó mediante una medición de la extinción a 595 nm. Una línea colocada horizontalmente en la figura para $A_{595 \text{ nm}} = 1,06$ muestra la adhesión al 100% a una fibronectina plasmática.

50

El resultado de este ensayo indica que las células se adherían a las superficies revestidas con el ED-B, lo cual sugiere un receptor situado sobre la superficie celular para el ED-B.

Para el ensayo de adherencia/adhesión se utilizó el siguiente método experimental:

55

Soluciones:

1% de BSA (Sigma, precipitada con etanol)

2% de suero en PBS (o en una solución de neutralización de tripsina)

60

Medio: MCDB 131, Pen/Strep, anfotericina (0,25 $\mu\text{g/ml}$), heparina (20 $\mu\text{g/ml}$), 0,1% de BSA (Sigma, precipitado con etanol)

0,1% de violeta cristal, 2% de aldehído glutárico en PBS, filtrado en condiciones estériles

65

2% de SDS

ES 2 312 478 T3

Método:

Unos pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) se cubren durante 1 hora a 37°C con una proteína. En el caso de proteínas pequeñas (< 20 kDa) o de péptidos se recomienda dejar a éstas/os secarse sobre la placa (durante una noche sin ninguna tapa por debajo del banco de esterilización). Después de esto, los pocillos se saturan con 1% de BSA durante 1 h a 37°C. Las células se desprenden por disolución con 1 vez X tripsina, se lavan con 2% de un suero para la desactivación de la tripsina, y se vuelven a suspender en el medio. Cuando se deben de ensayar anticuerpos o péptidos, las células se incuban previamente en suspensión con éstos durante 30 min a 37°C. Por cada pocillo (placa de 96 pocillos) se incuban a 37°C durante 1 h 10⁴ células en un volumen de 50 - 100 µl. El material sobrenadante se vierte cuidadosamente, la placa se deja quieta estar en rotación para escurrirse sobre un pañuelo de papel durante 1 min y las células adheridas se tiñen y fijan con violeta cristal/aldehído glutárico durante 15 minutos. Los pocillos se lavan 3 veces con PBS y a continuación las células se lisan por adición de 2% de SDS (durante 15 min sobre el sacudidor). Se mide la absorción a 595 nm. Después de haber lavado tres veces con agua, las células pueden ser teñidas de nuevo, en el caso de que se desee.

Testigos:

Testigos negativos: pocillos vacíos (testigo con BSA)

Testigo positivo: fibronectina plasmática (2,5 µg/ml)

% de adhesión = A_{595} (de muestra): 100 x A_{595} (de fibronectina)

La Fig. 5 muestra los resultados de un ensayo, que es similar al de la Fig. 4, con la excepción de que, antes de la adhesión a placas de pocillos de microtitulación revestidos con el ED-B, las células endoteliales habían sido incubadas previamente con 250 µM de diferentes péptidos sintéticos, cuya secuencia era una secuencia parcial del dominio ED_b de fibronectina. La adhesión fue determinada por medio de la determinación de la extinción a 595 nm (A_{595}). Las denominaciones de péptidos, que se señalan en la Figura, se explican en la Fig. 6. En este caso, la secuencia de péptido n° 043 corresponde a la secuencia representada en SEQ ID NO:1, la secuencia de péptido n° 553 corresponde a la secuencia representada en SEQ ID NO:2, y la secuencia de péptido n° 038 corresponde a la secuencia representada en SEQ ID NO:3. Un valor más alto de A_{595} corresponde a una adhesión no inhibida, mientras que un valor más bajo de A_{595} corresponde a una inhibición de la adhesión por el correspondiente péptido.

Se siguió el método descrito para la Fig. 4.

La Fig. 6 muestra las secuencias parciales sacadas de la secuencia total del dominio ED_b de fibronectina, de los péptidos de ED-B sintéticos con las denominaciones de secuencias escogidas para éstos. Se utiliza un código de una sola letra para aminoácidos.

La Fig. 7 muestra los resultados de un ensayo, que es similar al representado en la Fig. 5, excepto que aquí las placas de pocillos de microtitulación no se habían revestido con el dominio ED_b de fibronectina, sino que se habían incubado previamente con los péptidos que se habían manifestado como inhibidores en el ensayo de la Fig. 5 o respectivamente con los péptidos que se habían manifestado como no inhibidores, y por consiguiente fueron revestidas con éstos. En este caso se muestra que las células muestran en estos ensayos, ahora en el caso de un revestimiento cada vez con uno de los péptidos inhibidores, una adhesión, medida en el valor de A_{595} , mientras que un péptido, que se ha manifestado como no inhibidor a partir de la Fig. 5, no conduce a ninguna adhesión.

Se siguió el método descrito para la Fig. 4.

La Fig. 8 muestra una estructura modelo del dominio ED_b de fibronectina (ED-B), a partir de la cual se deduce la situación de los péptidos inhibidores n° 1 (= SEQ ID NO:1), n° 2 (= SEQ ID NO:2) y n° 3 (= SEQ ID NO:3). Se muestra que estos péptidos inhibidores se encuentran en el bucle 1 o respectivamente en el bucle 5 de la estructura de ED-B y por consiguiente identifican a la región del dominio, a través de la cual tiene lugar una fijación a la célula o respectivamente al receptor que se encuentra en la célula. La estructura modelo del dominio ED-B, mostrada en la Fig. 8, se basa en una estructura, ya determinada, del dominio 7 de fibronectina del tipo III. N-T y C-T representan al extremo terminal de N o respectivamente de C.

La Fig. 9 muestra los resultados de un ensayo, en el que se investiga el efecto de la adición de ED-B y del péptido n° 2 determinado previamente como inhibidor, así como de la adición del dominio 6 de fibronectina del tipo III, sobre la inducción de estructuras similares a capilares (formación de tubos) en el ensayo de germinación. Se muestra que, por medio de la penetración basal, inducida por el bFGF, en geles de colágeno se genera el más grande efecto mediante el péptido inhibidor de adhesión SEQ ID NO:2. Este péptido tiene, por lo tanto, un efecto estimulador sobre la penetración de células endoteliales en geles de colágeno. Este péptido corresponde por lo tanto a la región de fijación del ED_b y estimula, por analogía al ED_b propiamente dicho, la penetración de células endoteliales en el colágeno.

Se siguió el método descrito para la Fig. 3.

ES 2 312 478 T3

La Fig. 10 muestra los resultados de una cromatografía de afinidad de un material lisado de células a partir de células endoteliales cutáneas humanas, marcadas en las superficies. Para esto, unas células endoteliales biotiniladas junto a la superficie celular, que estaban en fase de proliferación, se lisaron con un detergente y se sometieron a una cromatografía de afinidad, en la cual unos cortos fragmentos de fibronectina habían sido acoplados a Sepharose con o sin el dominio ED_b de fibronectina introducido (con el dominio ED_b de fibronectina = Fn-7-B-8-9, sin el dominio ED_b de fibronectina = Fn-7-8-9). Se pudo mostrar que una proteína biotinilada, con un peso molecular aparente de 120 - 130 kDa, se fija específicamente al fragmento que contiene el ED-B (véase la flecha). La elución se efectúa mediante EDTA (ácido etilen-diamina-tetraacético). Se recogieron varias fracciones descritas a continuación. Las fracciones fueron sometidas seguidamente a un SDS-PAGE, y fueron investigadas con una transferencia de borrón Western con luminiscencia de peroxidasa y estreptavidina y con quimioluminiscencia (ECL). Las pistas 1 y 5 muestran unas fracciones previas a la elución, mientras que las pistas 2, 3, 4 y respectivamente 6, 7, 8 muestran las fracciones 1, 2 y 3 eluidas. Las pistas 1 - 4 muestran la cromatografía con Fn-7-8-9, mientras que las pistas 5 - 8 muestran la cromatografía con Fn-7-B-8-9. El resultado aquí mostrado es un fuerte indicio de que la banda prominente con un peso molecular comprendido entre 120 - 130 kDa es una proteína, que se fija específicamente a un fragmento de fibronectina que contiene el ED_b y por consiguiente constituye un receptor para el dominio ED_b de fibronectina.

Para la biotinilación y la lisis de las células endoteliales se siguió el siguiente método experimental:

Material: Éster de 3-sulfo-N-hidroxi-succinimida de ácido biotinamido-hexanoico; Sigma PBS w/o Mg/Ca (Dulbecco)

Tampón Hepes 20 mM de Hepes pH 7,6, 1 mM de CaCl₂, 1 μM de MgCl₂, 0,1% de NaN₃, 1% de CHAPS (V/V)

y un mini inhibidor de proteasa completo de Boehringer, exento de EDTA, tabletas con un cóctel

Método: Los frascos para cultivo de células fueron lavados antes y después de la biotinilación, en cada caso 3 veces con PBS w/Ca + Mg. Antes del último proceso de lavado se formula el tampón de biotina (1 mg/15 ml de PBS). En cada uno de los frascos se añaden con pipeta lentamente 5 ml del tampón (para placas de 225 cm²) o 12,5 ml de éste (para placas de 500 cm²) en el centro del fondo, de manera que el volumen se puede distribuir mediando basculación por todo el fondo del frasco. Luego, el primer frasco de cultivo se trata con la mitad del volumen del tampón de lisis. El tampón es asimismo añadido con pipeta en el centro del fondo del frasco y es distribuido a lo largo de toda la superficie. Luego las células se separan por raspado con ayuda de un raspador de células. A continuación, el volumen total del 1º frasco de cultivo se añade con pipeta al 2º frasco, donde se repite luego el proceso. Después del último frasco, el volumen se transfiere a un tubito de centrifuga cónico con una capacidad de 50 ml. Con la otra mitad del tampón de lisis, se repite este proceso en todos los frascos de cultivo (sin raspador de células) y el volumen final se añade asimismo a tubitos de centrifuga. Se centrifuga en tubitos cónicos para el cultivo de células con una capacidad de 50 ml a 3.000 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 min a la TA (temperatura ambiente) (en una centrifuga de mesa de Heraeus). El material lisado se saca con pipeta e idealmente se debería emplear inmediatamente para la cromatografía de afinidad (sin embargo, en caso necesario, se puede congelar también a -80°C).

Para el acoplamiento covalente de proteínas a Sepharose se escogió el siguiente modo de proceder:

Material: CH Sepharose 4 B activado de Pharmacia Biotech, nº de código 17-0490-01 1 mmol de HCl, 2,2% de NaHCO₃.

Método: El HCl se enfría en un baño de hielo y el Sepharose se deja calentar a la temperatura ambiente. Luego el Sepharose se lava con 1 mmol de HCl. Por cada mol de Sepharose se necesitan 10 ml de HCl. El Sepharose se deja correr lentamente dentro del tubito previamente enfriado, donde luego se hincha durante aproximadamente 15 minutos. (1 g de Sepharose corresponde a 3 ml de Sepharose hinchado). A continuación, el tubito se centrifuga a 800 rpm durante 1 minuto. El material sobrenadante se retira con pipeta y se desecha.

Este proceso se repite 3 veces.

Después del 3º lavado se añade de nuevo HCl, el tubito se hace bascular y se centrifuga durante 3-5 min a 800 revoluciones (U). El material sobrenadante se retira con pipeta y el sedimento se disuelve con 20 ml de una mezcla de Millipore y agua, y se transfiere a 2 nuevos tubitos de centrifuga (cada vez 1 tubito para el 7-EDB-8-9 Sepharose y para el 7-8-9 Sepharose, es decir Sepharose junto al que se ha acoplado un polipéptido con las secuencias de repetición III7, ED_b, III8 y III9 o respectivamente III7, III8 y III9). Los tubitos se centrifugan inmediatamente de nuevo, el material sobrenadante se retira con pipeta y los 1-5 mg de proteína/ml de Sepharose se pueden acoplar.

(es decir 2 mg de proteína/ml de Sepharose 7-8-9

2 mg " " 7-EDB-8-9)

Los tubitos fueron mezclados mediante removido por basculación. Luego se efectúa rápidamente la adición de 2,2% de NaHCO₃. (50 μl/ml de gel). De esta manera se neutraliza el HCl restante. Los tubitos son removidos por basculación y en el escalón más alto se mezclaron a fondo en una mesa de sacudimiento ("Wipptisch") durante 1 - 5 horas.

ES 2 312 478 T3

A continuación los tubitos se centrifugan de nuevo.

Para la determinación de la concentración de proteína, que se debe emplear en el caso del acoplamiento covalente a Sepharose, se llevó a cabo un ensayo de Bradford.

5

Material: Solución original de BSA 2 mg/ml

Reactivo de Bradford

10

Método: La solución de BSA se aplica de la manera siguiente sobre una placa Nunc Immuno (Maxi Sorp):

5 μg -4 μg -3 μg -2 μg - 1 μg (volumen 80 μl + 20 μl de medio de ensayo)

Dilución previa para la BSA: 5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l} = 0,1 \text{ mg/ml}$

15

La solución original, a 2 mg/ml, se diluye mediante una dilución a 1:20 hasta una concentración de 0,1 mg/ml.

Para la realización de la cromatografía de afinidad o respectivamente para la elución, se escogió el siguiente modo de proceder:

20

a) *Cromatografía de afinidad*

25

Material: CH Sepharose 4 B activado de Pharmacia Biotech, N° de código 17-0490-01

Tampón A (20 mM de Hepes de pH 7,6, 1 mM de CaCl_2 , 1 mM de MgCl_2 , 0,1% de NaN_3)

Tampón B (tampón A + 150 mM de NaCl + 0,1% de Chaps)

30

Tampón C (tampón A + 0,1% de Chaps)

Tampón de pH 4 (mezcla de Millipore + 0,1% de ácido acético glacial + 0,1% de Chaps)

35

Tampón de EDTA (tampón A + 200 mM de EDTA de pH 8,5 + 0,1% de Chaps).

Método: El material lisado se alimenta primeramente 3 veces por encima de la columna.

40

Por debajo de la columna se encuentra un tubito para la captación y recogida del líquido. Los primeros 2 ml del material lisado se añaden cuidadosamente con una pipeta de Eppendorf al gel. Para el volumen adicional de material lisado se utiliza una pipeta de medición. Hay que procurar que la columna esté derecha. Si la columna se utiliza por primera vez, antes de la pasada propiamente dicha lleva a cabo una "pasada en seco" con todos los tampones exentos de proteínas. Un relleno de la columna debería usarse como máximo 5 veces.

45

Cuando el material lisado se presenta en estado congelado (a -80°C) se calienta primeramente en un baño de agua y luego se centrifuga (durante 5 min a 3.000 rpm).

Sin embargo, un material lisado reciente siempre ha de preferirse con respecto al congelado.

50

Del material lisado se trasiegan con pipeta 500 μl a un recipiente de Eppendorf.

Esto sirve para el examen del material lisado antes y después de la cromatografía.

55

Si se utilizan 2 columnas (en cada caso una para el 7-8-9 Sepharose y para el 7-B-8-9 Sepharose), se alimenta cada vez la mitad del volumen de material lisado a través de cada una de las columnas. Ambas columnas deberían tener la misma velocidad de flujo. Si éste no es el caso, la columna "más lenta" se cierra durante un período correspondientemente largo. La velocidad de flujo ideal es de 0,2 - 0,5 ml/min.

60

Si el material lisado ha pasado 3 veces a través de la columna, a partir de la fracción pasada, después de que ella se hubiera sido mezclada, se trasiegan con pipeta en cada caso 500 μl a un recipiente de Eppendorf, para que también aquí se pueda efectuar un examen.

A continuación se alimentan 10 volúmenes columnares del tampón B y del tampón C a través de la columna. Después de esto se termina el proceso de lavado.

65

ES 2 312 478 T3

b) *Elución*

5 Elución previa: El tampón C es alimentado a través de la columna, para que se pueda comprobar si, a pesar del proceso de lavado, todavía han quedado proteínas. 500 μ l se recogen en un recipiente de Eppendorf. (En el caso de 2 columnas, correspondientemente 2 x 500 μ l).

10 Elución con EDTA: El EDTA convierte en complejos a los iones de Ca y Mg. De esta manera se eluyen las proteínas de células endoteliales, que necesitan Ca y Mg para la fijación. 2 x 4 ml del tampón de EDTA se alimentan a través de la columna (o respectivamente a través de ambas columnas) y se recogen en 2 fracciones (E1 y E2/BE1 y BE 2) en tubitos de Falcon. Luego el contenido de los tubito se mezcla y se trasiegan con pipeta 5000 μ l a uno (o respectivamente 2) recipiente(s) de Eppendorf.

15 Elución a pH 4: El valor de pH propiamente dicho del tampón es de 3,7. Fuera de la región neutra de pH (pH 6 -8) se puede inhibir la fijación del receptor a su proteína. También aquí, igual a como en el caso de la elución con EDTA se alimentan a través de la columna 2 x 4 ml de tampón de pH 4, se recogen en 2 fracciones y se retiran con pipeta en cada caso 500 μ l (4,1 y 4,1/B 4,1 y B 4,2).

20 A continuación se añaden 3 volúmenes columnares del tampón A a través de la columna, para que el ácido sea separado por lavado. El último volumen columnar queda dentro de la columna. La columna se cierra y se conserva en un armario frigorífico.

Las fracciones de 500 μ l en los recipientes de Eppendorf se congelan durante a -80°C por lo menos durante 15 min y a continuación se liofilizan en un aparato "Speed vac".

25 Las fracciones o las fracciones previas a la elución, así obtenidas, se separaron con un SDS-PAGE y se sometieron a una transferencia de borrón Western en condiciones reductoras.

30 La Fig. 11 muestra el mismo experimento que en la Fig. 10, con la excepción de que aquí no se utilizan células endoteliales lisadas sino células estromales lisadas. En el borrón de transferencia Western que se muestra en la Fig. 11, las pistas 1 - 3 muestran la elución de una columna de afinidad con Fn-7-8-9, mientras que las pistas 4 - 6 muestran la elución de una columna de afinidad con Fn-7-B-8-9. Las pistas 1 y 4 son de factores previos a la elución, mientras que las pistas 2, 3 y respectivamente 5, 6 muestran las fracciones 1 y 2 de la respectiva fracción de elución. Una banda prominente con un peso molecular aparente de 120 - 130 kDa, tal como puede verse en la Fig. 10, no se puede comprobar en el caso de este material lisado de células procedente de células estromales humanas.

35 Las características del invento, divulgadas en la precedente memoria descriptiva, en las reivindicaciones así como los dibujos, pueden ser esenciales tanto individualmente como también en combinaciones arbitrarias para la realización del invento en sus diferentes formas de ejecución.

40 La Fig. 12 muestra la proteína de fijación de ED-B, que había sido purificada mediante una cromatografía de afinidad, tal como se ha descrito, y había sido separada mediante una electroforesis en gel de gradientes de SDS (4-12%). Las bandas dobles enriquecidas específicamente (flechas) se recortaron y se analizaron mediante una espectroscopia de masas.

45 El análisis de las secuencias identificó inequívocamente a la proteína aislada como la alfa2,beta1-integrina, correspondiendo la banda pesada, predominante, a la subunidad beta1 y la banda ligera a la subunidad alfa2. Este hallazgo habla en favor de que la fijación al EDB es mediada principalmente por la subunidad beta1 de la integrina. De un modo correspondiente al tipo investigado de células, también otras subunidades alfa (p.ej. alfa2) combinadas con beta1 pueden mediar también en la fijación a EDB-FN.

50 La Fig. 13 muestra criosecciones de tumores humanos, caracterizadas inmunohistológicamente, significando:

55 A: un carcinoma de células renales, las flechas muestran la tinción específica mediante el AK AM-EDBr-2

B: un cierre (en inglés close-up) del mismo preparado

60 C: un carcinoma hepatocelular

D: un melanoma (aquí no se halló ninguna tinción específica)

Análisis del receptor de EDB

65 Las bandas fueron recortadas a partir de un gel de 1D, lavadas con una solución de NH_4HCO_3 y con acetonitrilo, secadas y reunidas con una solución de tripsina para la proteólisis de las proteínas en el gel. Los péptidos eluidos en la solución de digestión a partir del gel, fueron aumentados de concentración a través de unas columnas μC_{18} y fueron desalinizados y medidos con espectrometría de masas MALDI (= lista de masas peptídicas de la proteína digerida).

ES 2 312 478 T3

Con las masas peptídicas encontradas a partir de cada banda de gel se llevó a cabo una búsqueda en un banco de datos. En el caso de unos resultados no inequívocos de la búsqueda se midieron adicionalmente espectros de MALDI-PSD (espectros de fragmentos) de un péptido individual. Los espectros fueron utilizados o bien directamente para la confirmación de una secuencia supuesta de péptido (interpretación del espectro) o se llevó a cabo una búsqueda en un banco de datos con estos espectros.

Bandas investigadas:

Banda A = banda 1 procedente de la preparación 6
banda 4 procedente de la preparación 5
banda 6 procedente de la elución en condiciones ácidas

Resultado: integrina $\alpha 2$

- véase el resultado de la búsqueda en un banco de datos de la banda 4
- los espectros procedentes de las bandas 1 y 6 muestran los mismos péptidos que son los más intensos
un espectro de PSD de un péptido procedente de la banda 1 confirma una secuencia parcial de la integrina $\alpha 2$

Banda B = banda 2 procedente de la preparación 6
banda 5 procedente de la preparación 5
Banda 7 procedente de la elución en condiciones ácidas

Resultado: integrina $\beta 1$

- véanse los resultados de la búsqueda en un banco de datos de las bandas 5 y 7
- el espectro procedente de la banda 2 muestra los mismos péptidos más intensos
- la búsqueda en un banco de datos con un espectro de PSD procedente de la banda 2 confirmó la integrina $\beta 1$.

BSA

- está contenida en las tres bandas
- se confirma mediante la búsqueda en un banco de datos con un espectro PSD y numerosas masas de péptidos.

```
función expandIt(whichE1) {whichE1.estilo.monitor = (whichE1.estilo.monitor == "ninguno"?  
"ninguno";}
```

ProFound - Sumario de resultados de búsqueda

Versión 4.10.6

© 1997-2000 ProteoMetrics

```
A: hover { COLOR: rojo } función palanca ll(E1) {whichlm = suceso.srcElemento; if (E1.estilo.monitor ==  
"onej{E1.estilo.monitor = "" ; whichlm.src = "prowVmenos.gif"} else {whichlm.src =  
"prowl/plus.gif"; E1.estilo.monitor = "ninguno";}} A: hover { COLOR: rojo }
```

Proteínas candidatos a buscar 20010208092948-0121-149234049162 [121056 secuencias
buscadas]

ES 2 312 478 T3

	<u>Rango</u>	<u>Probabilidad</u>	<u>Est'd</u> <u>Z</u>	<u>Herramientas (T) de información de proteínas y</u> <u>análisis de secuencias</u>	<u>%</u>	<u>pl</u>	<u>kDa</u>
5	1	1.0e+000	2,20	gi 4504743 ref NP_002194.1 precursor de integrina alfa2	19	5,2	129,28
10	+2	2.3e-010	-	gi 628012 pir A53933 miosina I myr 4 – rata	15	9,6	116,17
		-	-	gi 6981242 ref NP_037115.1 miosina no convencional de rata 4 para miosina cadena pesada	15	9,6	116,12
15							
	3	8.3e-011	-	gi 7513010 pir T00322 proteína hipotética KIAA0542 – humana	15	11,5	117,58
20							
	4	1.7e-012	-	gi 4210973 gb AAD12058.1 (AF105016) ATPasa que transloca protones vacuolares, subunidad de 116-kDa isoforma a2; V-ATPasa isoforma de 116-kDa isoforma a2 [de Bos taurus]	11	5,9	97,99
25							
	5	5.4e-013	-	gi 543747 sp P36633 ABP RAT PRECURSOR DE AMINA OXIDASA SENSIBLE A AMILORIDA [QUE CONTIENE COBRE] (DIAMINA OXIDASA) (DAO) (PROTEÍNA QUE FIJA A AMILORIDA) (ABP) (HISTAMINASA)	16	6,6	85,00
30							
	6	4.2e-013	-	gi 7656867 ref NP_055059.1 una metaloproteasa similar a disintegrina y (del tipo de reprotisina) con tromboespondina tipo 1 motivo, 2	12	6,8	134,71
35							
	7	8.6e-014	-	gi 3688530 emb CAA09465.1 (AJ011035) fosfolipasa C beta 2 [de Rattus norvegicus]	11	5,8	134,87
40							
	+8	6.5e-014	-	gi 4504085 ref NP_000399.1 glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2 (mitocondrial)	21	7,0	80,80
45							
		-	-	gi 7446012 pir G02093 glicerol-3-fosfato deshidrogenasa – humana	21	7,3	80,82
50							
	9	5.0e-014	-	gi 7513725 pir T29098 proteína 4 asociada a microtúbulos, específica para músculos – ratón (fragmento)	14	8,1	114,87
55							
	10	4.7e-014	-	gi 6005970 ref NP_009078.1 proteína de dedo de zinc 175	22	9,6	81,59
60							
65							

ES 2 312 478 T3

NOTA:

1. Buscar de nuevo usando masas no emparejadas, teclear el símbolo @.
2. A secuencias de proteínas similares se les asignó el mismo rango (IE usuario: teclear "+" para expandir/contrair).

Sumario de entrada

Fecha & Hora	Jueves 08 Feb 08:29:55 2001 UTC (Tiempo de búsqueda: 6,30 segundos)
Muestra ID	EDB Fibronectina, Banda 4
Base de datos	NCBI nr [.. \base de datos\nr]
Taxonomía Categoría	Mammalia (mamíferos)
Intervalo de masas de proteína	80 - 135 kDa
Intervalo de pl de proteína	0,0 -14,0
Buscar	Solo una proteína
Química de digestión	Tripsina
Corte omitido máximo	2
Modificaciones	+C3H50N@C(parcial); +O@M(Parcial);
Estado de cargas	MH+
Masas de péptidos (Da, Media)	1,00 ppm
Masas de péptidos (Oa.Monoisotópico)	935.536 1007.504 1179.635 1222.729 1277.731 1307.689 1473.816 1479.833 1510.835 1553.895 1567.768 1586.801 1638.888 1707.772 1819.830 1851.993 1915.959 1931.980 1947.990 1973.966 1993.998 2044.968 2051.077 2068.095 2095.065 2150.093 2224.097 2283.137 2344.115 2501.214 2705.123 2775.304 2872.336 2902.333 2932.502 3052.424 3280.542
Tolerancia(MON)	50,00 ppm
Número de péptidos	37

ProteoMetJics' ProFound se basa en ProFound en La Universidad Rockefeller [search +
transmisProteoMetJics' ProFound se basa en ProFound en La Universidad Rockefeller [tiempo de
búsqueda & transmisión: >=6,33 segundos]

función expandIt(whichE1) {whichE1.estilo.monitor = (whichE1.estilo.monitor == "ninguno")?
":"ninguno";}

ES 2 312 478 T3

ProFound - Sumario de resultados de búsqueda

Versión 4.10.6

© 1997-2000 ProteoMetrics

5

A: hover { COLOR: rojo } función palancalt(E1) {whichlm = suceso.srcElement;if (E1.estilo.monitor == "ninguno"){E 1.estilo.monitor = "" ;whichlm.src = n/prowl/menos.gif";}else{whichlm.src = n/prowl/plus.gif;E1.estilo.monitor = "ninguno";}} A: hover { COLOR: rojo }

10

Proteínas candidatos a buscar 20010207110038-0035-149234049162 [121056 secuencias buscadas]

15

<u>Rango</u>	<u>Probabilidad</u>	<u>Est'd Z</u>	<u>Herramientas (T) de información de proteínas y análisis de secuencias</u>	<u>%</u>	<u>PI</u>	<u>kDa</u>
+1	1.0e+000	1,15	gil124963 sp P055561 ITB1 HUMANO PRECURSOR DE LA SUBUNIDAD BETA DEL RECEPTOR DE FIBRONECTINA (INTEGRINA BETA-1) (CD29) (INTEGRINA VLA-4 SUBUNIDAD BETA)	<u>17</u>	5,3	88,45
	-	-	gil762977 emb CAA33272.1 (X15202) precadena beta del receptor de FN [Mus musculus]	<u>11</u>	5,8	88,18
	-	-	gil72070 pid JMSFB precursor de cadena beta del receptor de fibronectina – ratón	<u>11</u>	5,8	88,31
	-	-	gil8393636 ref NP_058718.1 integrina, beta 1	<u>11</u>	5,8	88,48
	-	-	gil124964 sp P09055 ITB1 RATÓN PRECURSOR DE LA SUBUNIDAD BETA DEL RECEPTOR DE FIBRONECTINA (INTEGRINA BETA-1)	<u>11</u>	5,7	88,21
	-	-	gil10336839 gb AAG16767.1 AF192528_1 (AF192528) integrina subunidad beta-1 [Sus scrofa]	<u>11</u>	5,3	88,25
	-	-	gil1708573 sp P53712 ITB1 BOVINO SUBUNIDAD BETA DEL RECEPTOR DE FIBRONECTINA (INTEGRINA BETA-1) (CD29) (INTEGRINA VLA-4 SUBUNIDAD BETA)	<u>9</u>	5,3	85,31
	-	-	gil1708574 sp P53713 ITB1 FELCA PRECURSOR DE LA SUBUNIDAD BETA DEL RECEPTOR DE FIBRONECTINA (INTEGRINA BETA-1) (CD29) (INTEGRINA VLA-4 SUBUNIDAD BETA)	<u>9</u>	5,2	88,0
2	1.9e-004	-	gil5453910 ref NP_006216.1 fosfolipase C, delta 1	<u>8</u>	6,2	85,75
+3	7.7e-005	-	gil1589134 prf 2210313A fosfatidilinositol 3-cinasa:SUBUNIDAD = reguladora de 55kD [Rattus	<u>10</u>	5,9	83,46

65

ES 2 312 478 T3

	<u>Rango</u>	<u>Probabilidad</u>	<u>Est'd Z</u>	<u>Herramientas (T) de información de proteínas y análisis de secuencias</u>	<u>%</u>	<u>PI</u>	<u>kDa</u>
5				norvegicus)			
		-	-	gi 6981358 ref NP_037137.1 fosfoinositida 3-cinasa p85 (otras variantes de empalme: p55 y p50)	<u>8</u>	5,9	83,51
10							
				gi 1163174 gb AAA85505.1 (U32575) similar a levadura Sec6p, Número de Acceso a Swiss-Prot P32844; similar a mamifero B94, Número de Acceso a Swiss-Prot Q03169; Método: traducción conceptual proporcionada por el autor [Rattus norvegicus)	<u>8</u>	5,8	86,48
15	4	1.8e-005	-				
20	5	1.1e-005	-	gi 2137061 pir PC4183.1 -fosfatidilinositol fosfodiesterasa (EC 3.1.4.10) delta 1 - hamster chino (fragmento)	<u>10</u>	5,9	84,62
25	6	6.1e-006	-	gi 9910238 ref NP_064388.1 control general de la síntesis de aminoácidos, similar a homólogo de levadura 2	<u>10</u>	9,6	93,37
30	7	2.4e-006	-	gi 10047327 dbj BAB13451.1 (AB046845) proteína KIAA1625 [Homo sapiens)	<u>6</u>	9,0	97,20
35	8	1.1e-006	-	gi 5032191 ref NP_005793.1 proteína que fija a la proteína de tumor p53	<u>10</u>	9,7	93,48
40	+9	9.9e-007	-	gi 9910260 ref NP_064581.1 proteína HCNP	<u>9</u>	8,7	98,86
				gi 6330235 dbj BAA86491.1 (AB033003) proteína KIAA1177 [Homo sapiens)	<u>6</u>	5,6	87,80
45	+10	9.6e-007	-	gi 9453796 emb CAB99365.1 (AL 117378) dJ131 F15.2 (fosfo-diesterasa I/nucleótido pirofosfatasa 1 (homóloga al antígeno Ly-41 de ratón) (PC1, NPPS)) [Homo sapiens)	<u>11</u>	6,8	96,83
50							
				gi 129678 sp P22413 PC1 HUMANO GLICOPROTEÍNA DE MEMBRANA CELULAR - PLASMA PC-1 [INCLUYE: FOSFODIESTERASA ALCALINA I ; NUCLEÓTIPOE PIROFOSFATASA (NPPASA)]	<u>7</u>	6,8	99,91
55							

60 NOTA:

1. Buscar de nuevo usando masas no emparejadas, teclear el símbolo @.

65 2. A secuencias de proteínas similares se les asignó el mismo rango (IE usuario: teclear "+" para expandir/contraer).

ES 2 312 478 T3

ProFound - Sumario de resultados de búsqueda

Versión 4.10.6

© 1997-2000 ProteoMetrics

5

A: hover { COLOR: rojo } función palancalt(E1) { whichlm = suceso.srcElement; if (E1.estilo.monitor == "ninguno" { E1.estilo.monitor = ""; whichlm.src = n/provl/menos.gif; } else { whichlm.src = "/provl/plus.gif; E1.estilo.monitor = "ninguno"; } } A: hover { COLOR; rojo }

10

Proteínas candidatos a buscar 20010207110746-00D6-149234049162 [121056 secuencias buscadas]

15

<u>Rango</u>	<u>Probabilidad</u>	<u>Est'd</u> <u>Z</u>	<u>Herramientas (T) de información de proteínas y análisis de secuencias</u>	<u>%</u>	<u>pI</u>	<u>kDa</u>
20			gi 124963 sp P05556 ITB1 HUMANO PRECURSOR DE LA SUBUNIDAD BETA DEL RECEPTOR DE FIBRONECTINA (INTEGRINA BETA-1) (CD29) (INTEGRINA VLA-4 SUBUNIDAD BETA)			
+1	1.0e+000	1,61		<u>18</u>	5,3	88,45
25			gi 10336839 gb AAG16767.1 AF192528.1 (AF192528) integrina beta-1 subunidad beta-1 [Sus scrofa]	<u>12</u>	5,3	88,25
30			gi 762977 emb CAA33272.1 (X15202) precadena beta del receptor de FN (Mus musculus)	<u>12</u>	5,8	88,18
35			gi 72070 pir IJMSFB precursor de cadena beta del receptor de fibronectina – ratón	<u>12</u>	5,8	88,31
40			gi 124964 sp P09055 ITB1 RATÓN PRECURSOR DE LA SUBUNIDAD BETA DEL RECEPTOR DE FIBRONECTINA (INTEGRINA BETA-1)	<u>12</u>	5,7	88,21
45			gi 8393636 ref NP_058718.1 integrina, beta 1	<u>12</u>	5,8	88,48
50			gi 1708573 sp P53712 ITB1 BOVINO SUBUNIDAD BETA DEL RECEPTOR DE FIBRONECTINA (INTEGRINA BETA-1) (CD29) (INTEGRINA VLA-4 SUBUNIDAD BETA)	<u>10</u>	5,3	85,31
55			gi 1708574 sp P53713 ITB1 FELCA PRECURSOR DE LA SUBUNIDAD BETA DEL RECEPTOR DE FIBRONECTINA (INTEGRINA BETA-1) (CD29) (INTEGRINA VLA-4 SUBUNIDAD BETA)	<u>11</u>	5,2	88,08
60			gi 479805 pir S35458 proteína homóloga SNF2- humana (fragmento)	<u>12</u>	7,0	88,59
65			gi 5725250 emb CAB52406.1 (AJ245661) proteína G7	<u>8</u>	5,9	94,65
+3	7.7e-007	-				

ES 2 312 478 T3

	<u>Rango</u>	<u>Probabilidad</u>	<u>Est'd</u> <u>Z</u>	<u>Herramientas (T) de información de proteínas y</u> <u>análisis de secuencias</u>	<u>%</u>	<u>pl</u>	<u>kDa</u>
5				[Homo sapiens]			
		-	-	gi 3108220 gb AAC62533.1 (AF048986) MutS homóloga 5 [Homo sapiens]	<u>8</u>	6,0	92,87
10							
		-	-	gi 4505253 ref NP_002432.1 mutS (E. coli) homóloga 5	<u>8</u>	6,0	92,86
15	4	6.7e-007	-	gi 7512247 pir I65253 metaloproteínasa testicular similar a disintegrina (EC 3.4.24.-) IVb – macaco comedor de cangrejos (fragmento)	<u>14</u>	6,6	80,82
20	5	1.8e-007	-	gi 10438454 dbj BAB15248.1 (AK025824) producto proteínico sin nombre [Homo sapiens]	<u>19</u>	6,4	80,60
25	6	5.4e-008	-	gi 1586344 prf 2203411A gen de rizador [Mus musculus]	<u>10</u>	5,7	99,37
30	7	3.0e-008	-	gi 4503165 ref NP_003581.1 cullina 3	<u>16</u>	9,0	88,91
	+8	1.4e-008	-	gi 6681275 ref NP_031934.1 cinasa del factor de elongación eucariótico 2	<u>14</u>	5,2	81,72
35							
		-	-	gi 6978795 ref NP_037079.1 cinasa del factor de elongación eucariótico 2	<u>9</u>	5,1	81,47
40	9	1.2e-008	-	gi 7662434 ref P_055733.1 proteína KIAA0990	<u>15</u>	9,5	91,71
45	10	5.2e-009	-	gi 7662436 ref NP_055749.1 proteína KIAA0996	<u>13</u>	5,8	96,68

NOTA:

1. Buscar de nuevo usando masas no emparejadas, teclear el símbolo @.

2. A secuencias de proteínas similares se les asignó el mismo rango (IE usuario: teclear "+" para expandir/contraer).

Sumario de entrada

Fecha & hora Viernes 07 Feb 10:07:52 2001 UTe (Tiempo de búsqueda: 5,88 segundos)

Muestra ID EDB Fibronectina. #0824, Banda 7

Base de datos NCBI nr [.. \base de datos\nr]

ES 2 312 478 T3

5	Taxonomía Categoría	Mammalia (mamíferos)
	Intervalo de masas de proteína	80 - 100 kDa
	Intervalo de pl de proteína	0,0 -14,0
10	Buscar	Solo una proteína
	Química de digestión	Tripsina
	Corte omitido máximo	2
15	Modificaciones	+C3H50N@C(parcial); +O@M(parcial);
	Estado de cargas	MH+
	Masas de péptidos (Da,Media)	
20	Tolerancia(MEDIA)	1,00 ppm
	Masas de péptidos (Da,Monoisotópico)	881.213 983.479 1222.615 1266.561 1376.698 1422.672 1473.821
25		1479.786 1553.850 1567.725 1639.856 1781.886 1819.830 1915.945
		1931.961 1961.051 2019.150 2068.101 2224.061 2283.101 2344.093
		2470.201 2501.215 2705.264 2776.358 2840.545 2872.558 3052.493
		3143.494 3159.559 3280.571 3298.572
30	Tolerancia(MON)	50,00 ppm
	Número de péptidos	32

35 ProteoMetrics' ProFound se basa en ProFound en La Universidad Rockefeller [tiempo de búsqueda & transmisión: >=5,91 segundos]

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el escrutinio en cuanto a compuestos, que se fijan a un receptor del dominio ED_b de fibronectina, que comprende la $\alpha 2\beta 1$ -integrina,

comprendiendo el procedimiento:

comparar una respuesta de células en presencia de uno o varios de estos compuestos, con la respuesta testigo de las mencionadas células en ausencia de estos compuestos, realizándose que las células

- expresan unas proteínas, que comprenden la integrina $\alpha 2\beta 1$,

realizándose que la respuesta o respectivamente la respuesta testigo es mediada por este receptor del dominio ED_b de fibronectina, y

realizándose que la respuesta o respectivamente la respuesta testigo comprende la proliferación o la adhesión de las células a unas superficies, que están revestidas con el dominio ED_b de fibronectina o con partes del mismo, y

realizándose que las células están seleccionadas entre células endoteliales, células estromales de un tumor y células tumorales.

2. Procedimiento para el escrutinio en cuanto a compuestos que se fijan al dominio ED_b de fibronectina, comprendiendo el procedimiento:

a) poner en contacto unas células con una concentración fijamente establecida de una proteína, que comprende el dominio ED_b de fibronectina o de una proteína con una de las secuencias representadas en las SEQ ID NO:1 hasta 4, en la presencia de diferentes concentraciones de uno o varios compuestos; y

b) detectar diferencias en la respuesta de las células a la proteína, que comprende el dominio ED_b de fibronectina, o una proteína con una de las secuencias representadas en las SEQ ID NO:1 hasta 4, en la presencia de los compuestos, en comparación con la respuesta testigo de las células a la proteína, que comprende el dominio ED_b de fibronectina, o una proteína con una de las secuencias representadas en las SEQ ID NO:1 a 4, en la ausencia de estos compuestos,

realizándose que las células

- expresan unas proteínas que comprenden la integrina $\alpha 2\beta 1$

y realizándose que la respuesta o respectivamente la respuesta testigo es mediada por este receptor del dominio ED_b de fibronectina, que comprende la integrina $\alpha 2\beta 1$,

realizándose que la respuesta o respectivamente la respuesta testigo comprende la proliferación o la adhesión de las células a unas superficies, que están revestidas con el dominio ED_b de fibronectina o con partes del mismo, y

realizándose que las células están seleccionadas entre células endoteliales, células estromales de un tumor y células tumorales.

3. Procedimiento para el escrutinio en cuanto a compuestos, que se fijan a un receptor del dominio ED_b de fibronectina, que comprende la integrina $\alpha 2\beta 1$,

comprendiendo el procedimiento:

comparar una respuesta de células en presencia de uno o varios de estos compuestos, con la respuesta testigo de las mencionadas células en ausencia de estos compuestos,

realizándose que las células expresan unas proteínas, que comprenden la integrina $\alpha 2\beta 1$, y

realizándose que la respuesta o respectivamente la respuesta testigo es mediada por este receptor del dominio ED_b de fibronectina, y

realizándose que la respuesta o respectivamente la respuesta testigo comprende la proliferación, la migración y la diferenciación de células endoteliales en una matriz de colágeno, que es reunida con el dominio ED_b de fibronectina o con partes del mismo.

4. Procedimiento para el escrutinio en cuanto a compuestos que se fijan al dominio ED_b de fibronectina,

comprendiendo el procedimiento:

ES 2 312 478 T3

a) poner en contacto unas células con una concentración fijamente establecida de una proteína, que comprende el dominio ED_b de fibronectina, o de una proteína con una de las secuencias representadas en las SEQ ID NO:1 hasta 4, en la presencia de diferentes concentraciones de uno o varios compuestos; y

5 b) detectar diferencias en la respuesta de las células a la proteína, que comprende el dominio ED_b de fibronectina o una proteína con una de las secuencias representadas en las SEQ ID NO: 1 hasta 4, en la presencia de los compuestos, en comparación con la respuesta testigo de las células a la proteína, que comprende el dominio ED_b de fibronectina o una proteína con una de las secuencias representadas en las SEQ ID NO: 1 hasta 4, en la ausencia de estos compuestos,

10 realizándose que las células

- expresan unas proteínas que comprenden la integrina $\alpha 2\beta 1$

15 y realizándose que la respuesta o respectivamente la respuesta testigo es mediada por este receptor del dominio ED_b de fibronectina, que comprende la integrina $\alpha 2\beta 1$, y

realizándose que la respuesta o respectivamente la respuesta testigo comprende la proliferación, la migración y la diferenciación de células endoteliales en una matriz de colágeno, que es reunida con el dominio ED_b de fibronectina o con partes del mismo.

20

5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 3, **caracterizado** porque el dominio ED_b de fibronectina comprende una de la secuencias SEQ ID NO: 1 - 4 o partes de dichas secuencias SEQ ID NO: 1 - 4.

25 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 5, estando seleccionados los compuestos entre el conjunto que comprende anticuerpos, anticuerpos artificiales, fragmentos de anticuerpos, péptidos, compuestos de bajo peso molecular, aptámeros y meros especulares.

30 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado** porque los anticuerpos son anticuerpos recombinantes.

8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** porque los anticuerpos están seleccionados entre el conjunto que comprende el scFv y fragmentos del mismo.

35

40

45

50

55

60

65

Denominación	
Fn-7-B-8-9	7 ED-B 8 9
Fn-7-8-9	7 8 9
ED-B	ED-B
Fn-10	10
Fn-6	6

Fig. 1

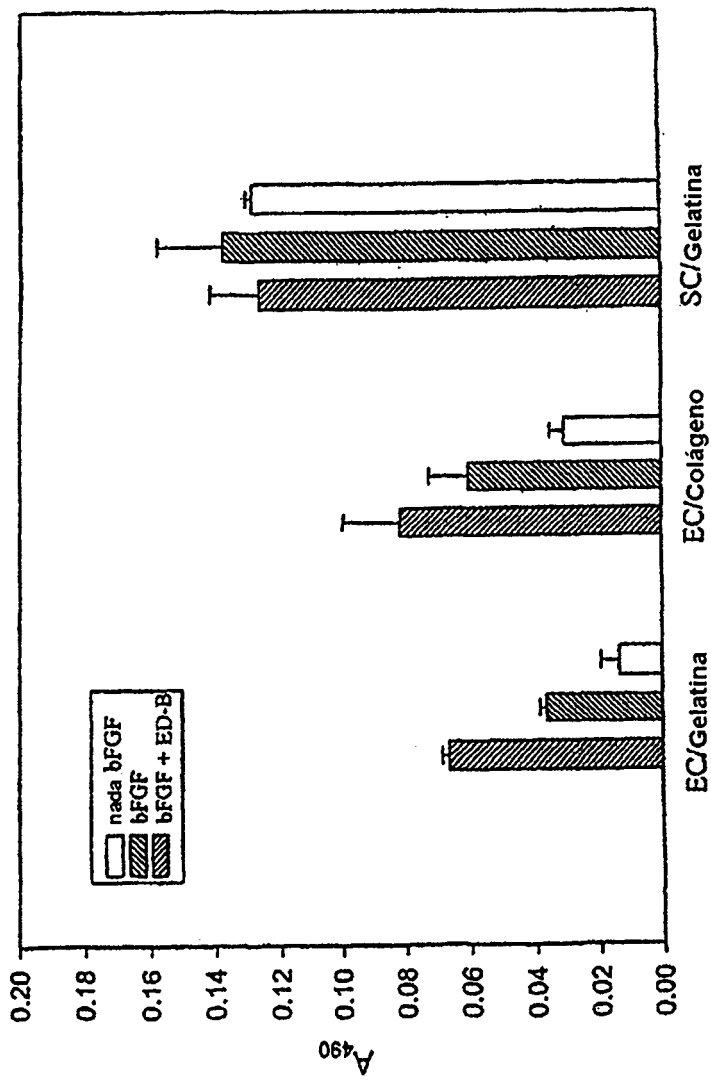


Fig. 2

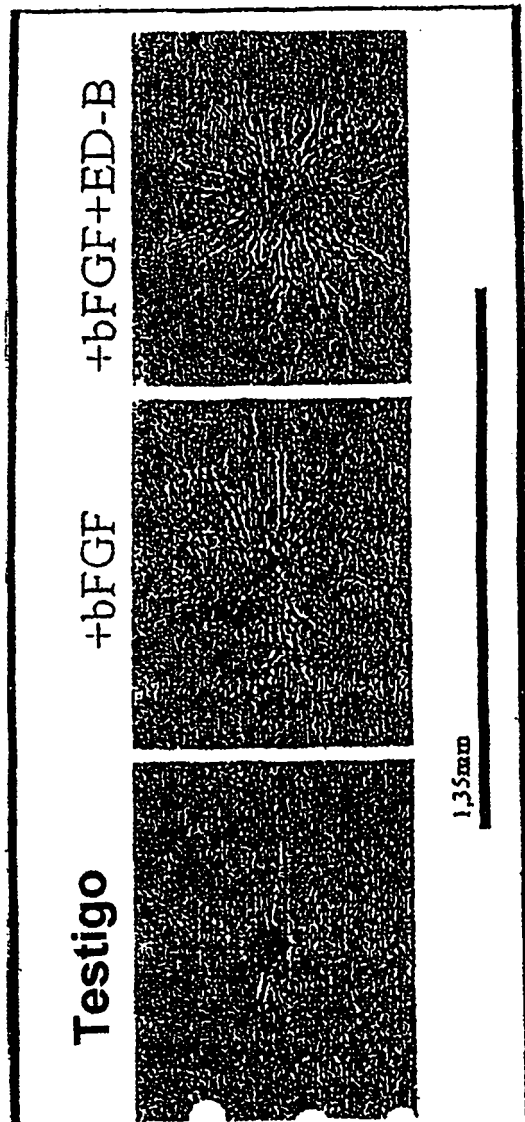


Fig. 3

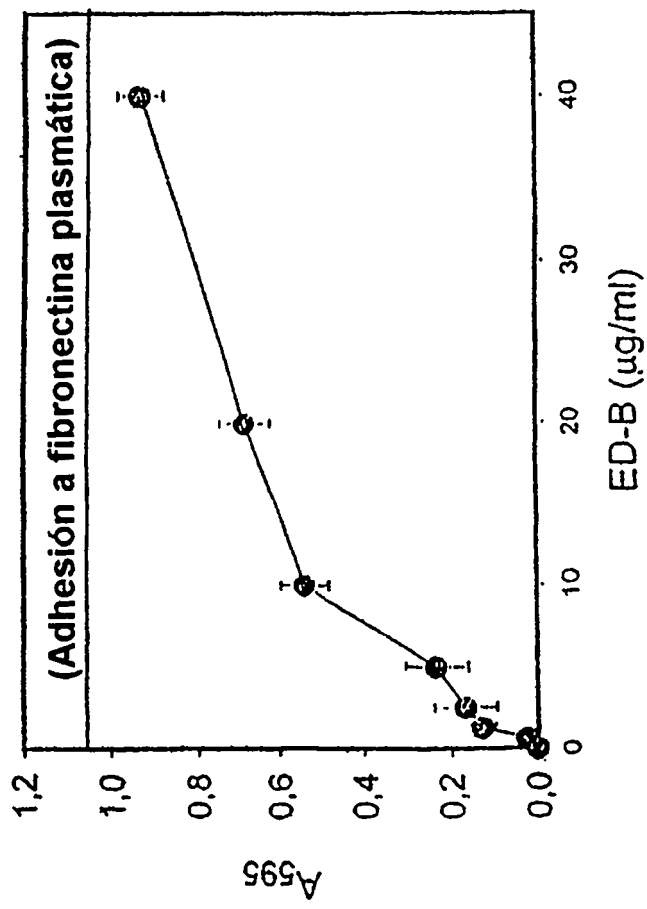
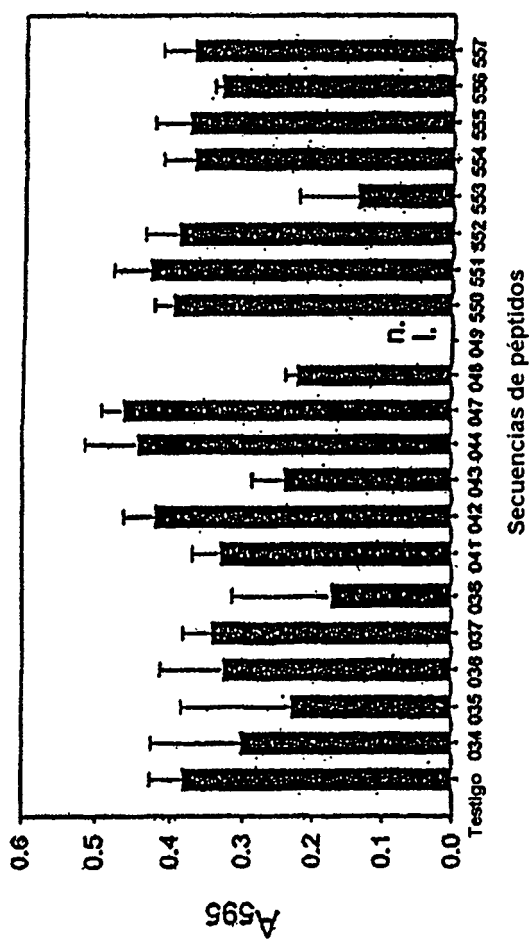


Fig. 4



n.l = no soluble

Fig. 5

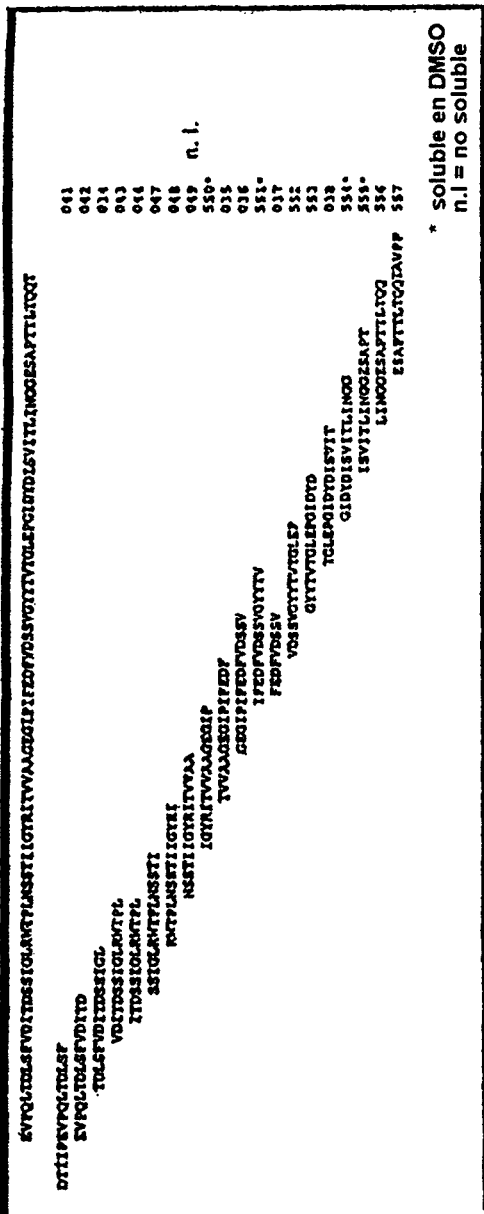


Fig. 6

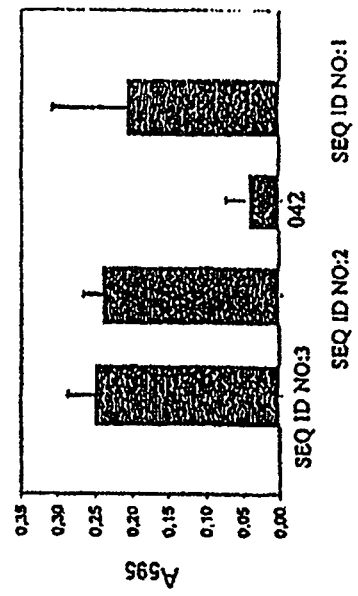


Fig. 7

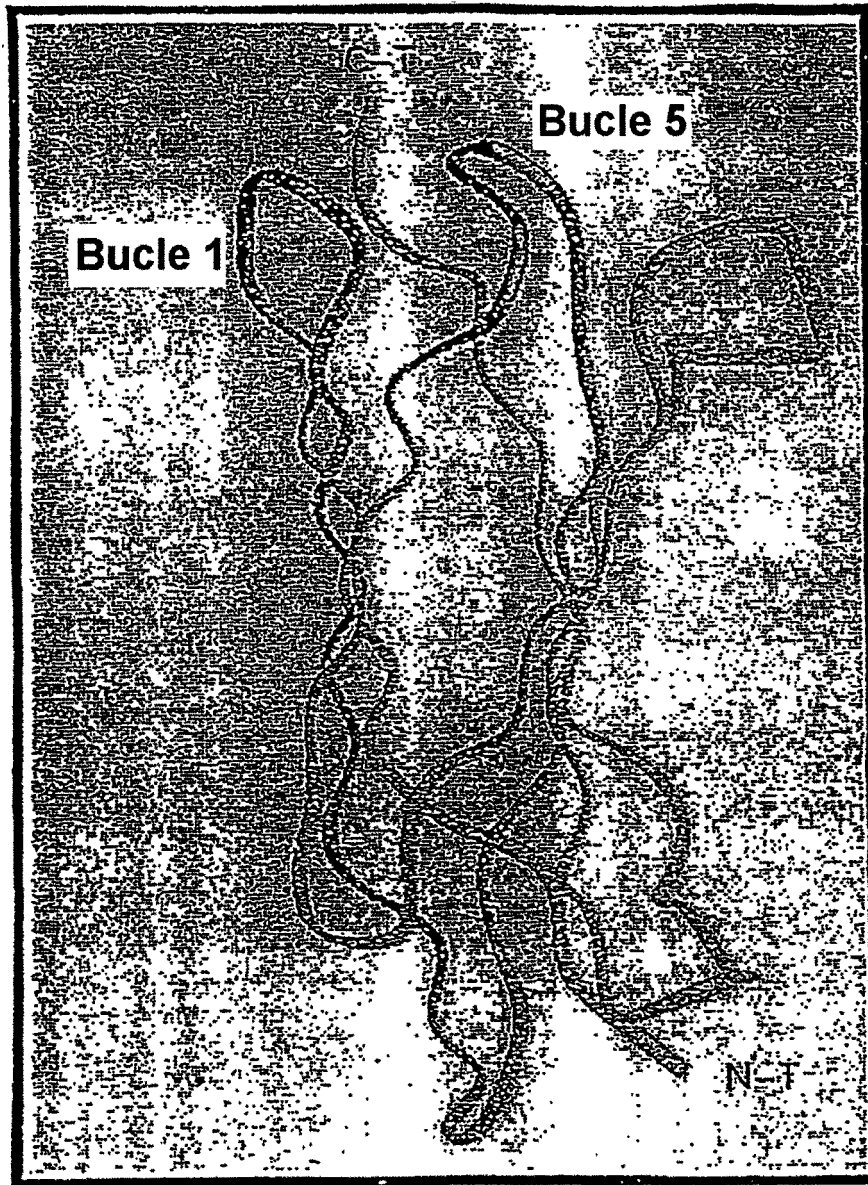


Fig. 8

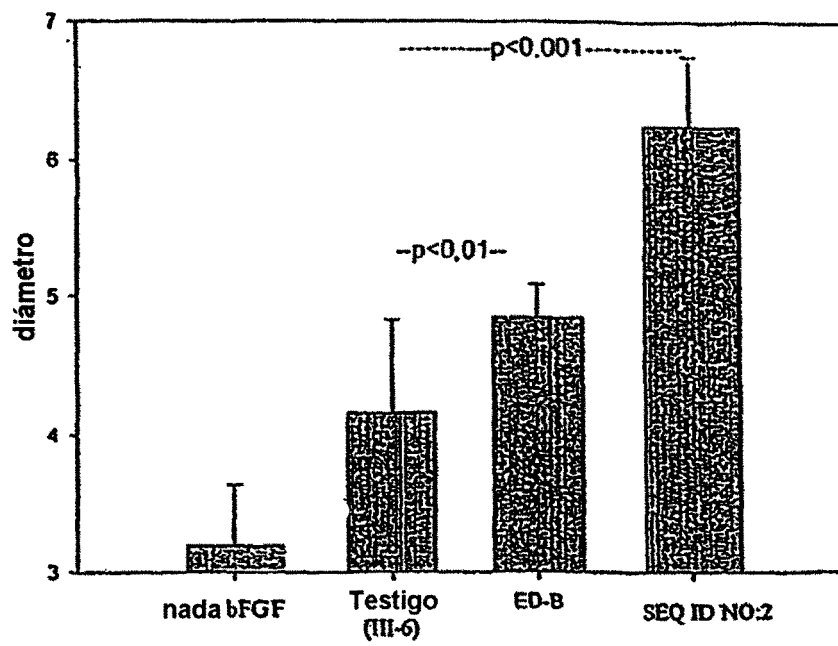


Fig. 9

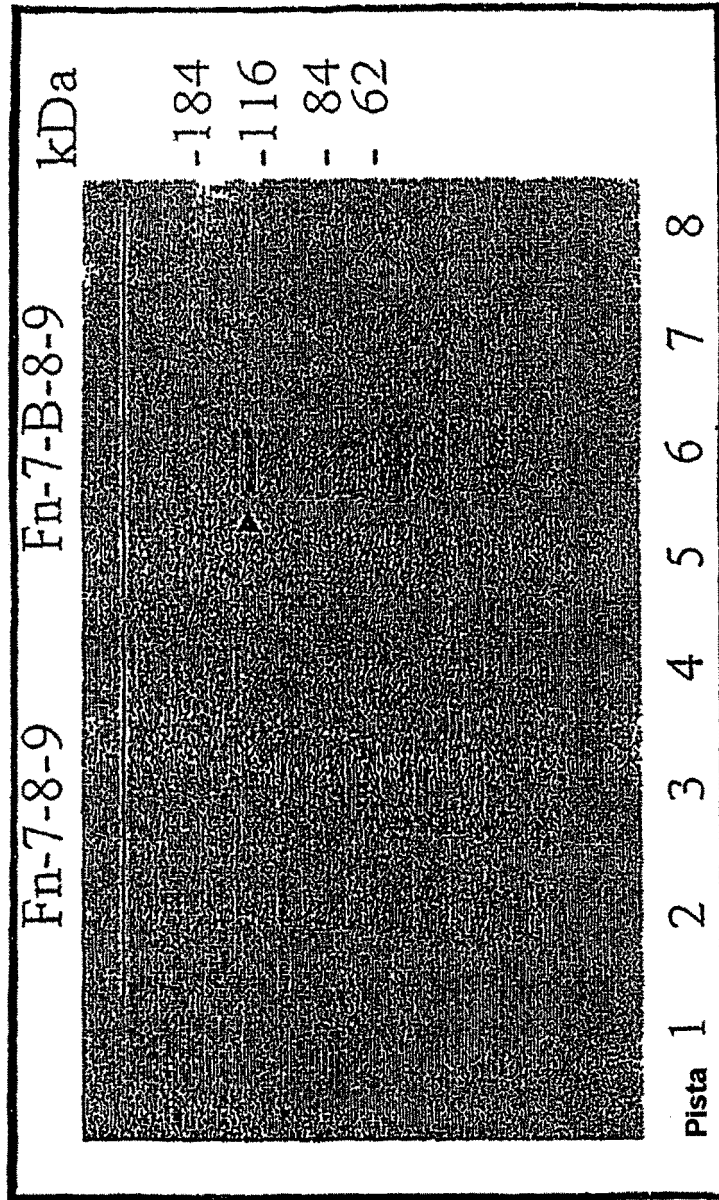


Fig. 10

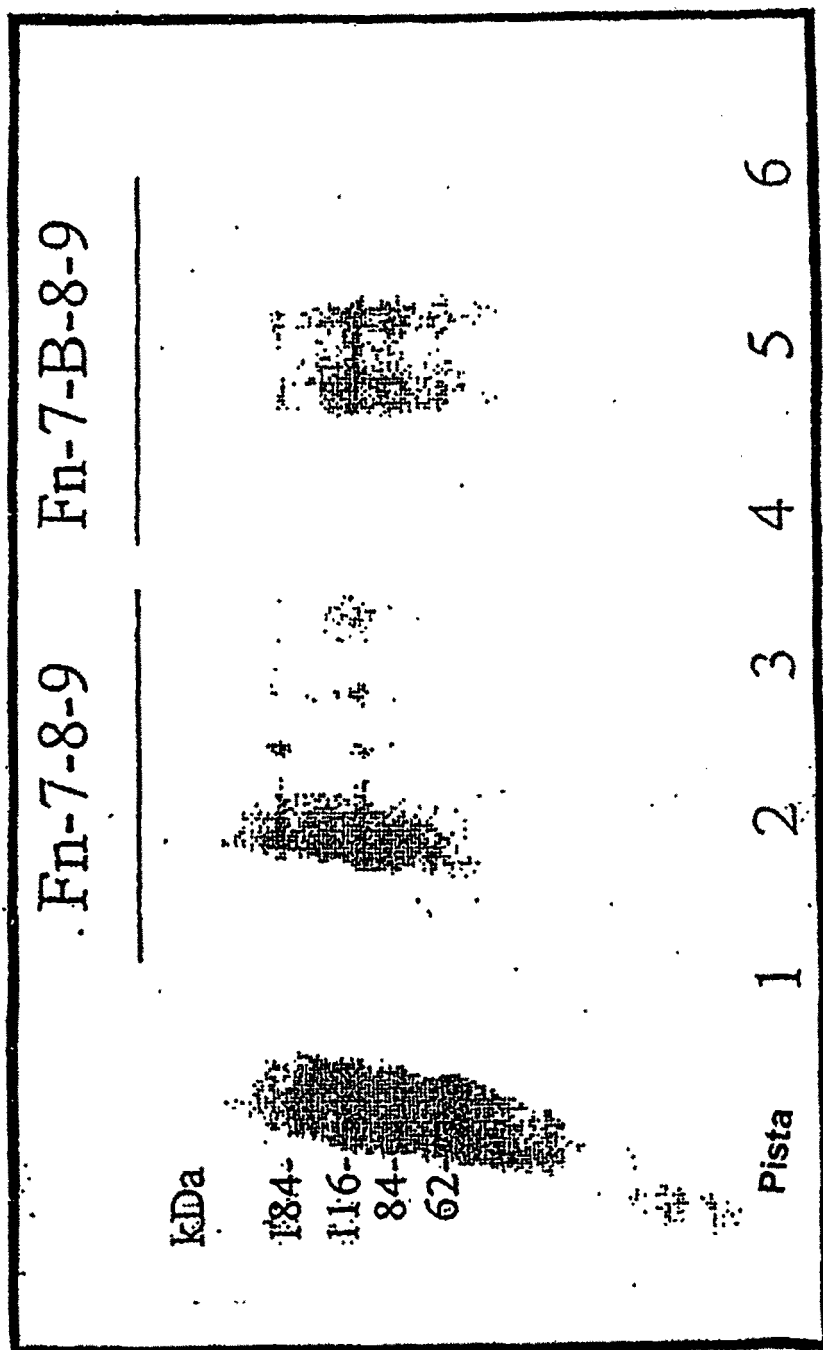


Fig. 11

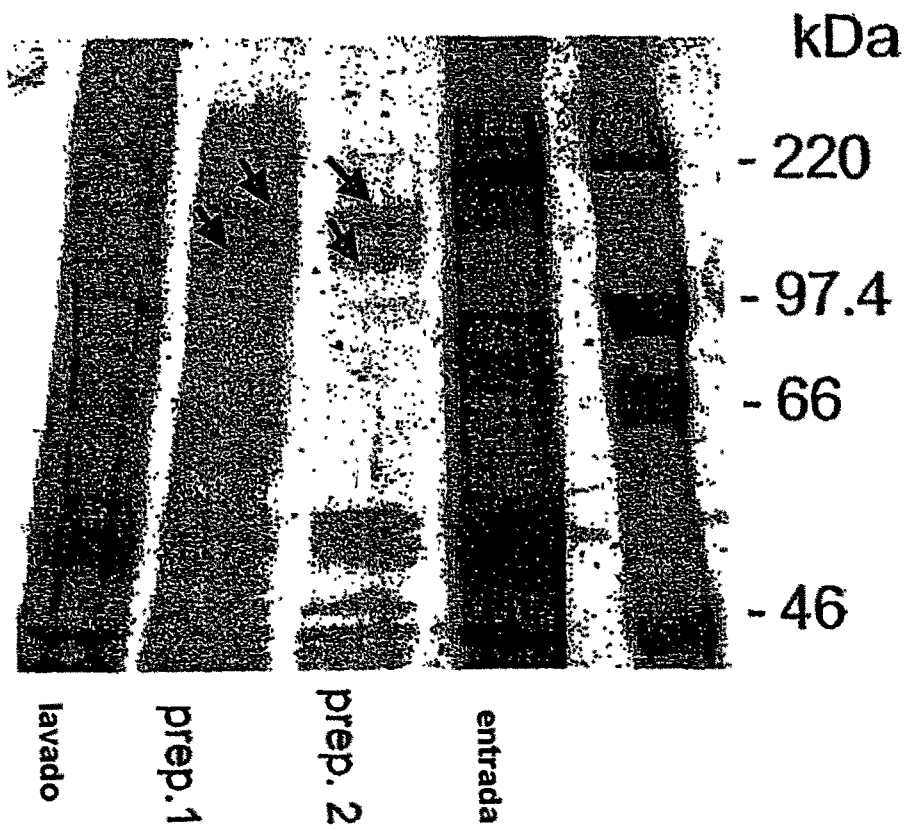


Fig. 12

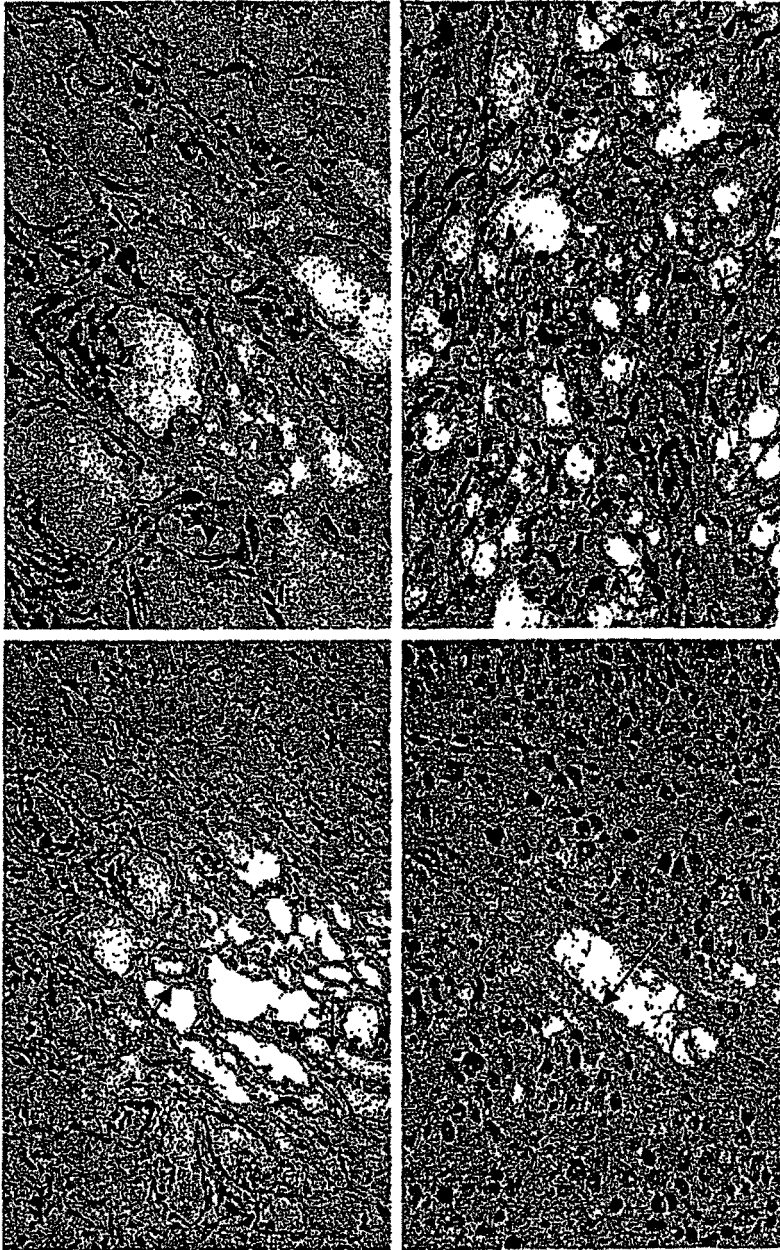


Fig. 13

ES 2 312 478 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Schering AG
- 5 <120> Receptor del dominio ED_b de fibronectina
- <130> s5495
- 10 <140>
<141>
- <160> 4
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- 20 <211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia de enlace N° I para el receptor de EDB putativo en la molécula de EDB
- 25 <400> 1
- Val Asp Ile Thr Asp Ser Ser Ile Gly Leu Arg Trp Thr Pro Leu
- 1 5 10 15
- 30
- <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia de enlace N° II para el receptor de EDB putativo en la molécula de EDB
- 35 <400> 2
- 40 Gly Tyr Tyr Thr Val Thr Gly Leu Glu Pro Gly Ile Asp Tyr Asp
- 1 5 10 15
- 45 <210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia de enlace N° III para el receptor de EDB putativo en la molécula de EDB
- 50 <400> 3
- Thr Gly Leu Glu Pro Gly Ile Asp Tyr Asp Ile Ser Val Ile Thr
- 55 1 5 10 15
- <210> 4
<211> 91
<212> PRT
<213> *homo sapiens*
- 65

ES 2 312 478 T3

<400> 4

Glu Val Pro Gln Leu Thr Asp Leu Ser Phe Val Asp Ile Thr Asp Ser

5 1 5 10 15

Ser Ile Gly Leu Arg Trp Thr Pro Leu Asn Ser Ser Thr Ile Ile Gly

10 20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Val Val Ala Ala Gly Glu Gly Ile Pro Ile Phe Glu

15 35 40 45

Asp Phe Val Asp Ser Ser Val Gly Tyr Tyr Thr Val Thr Gly Leu Glu

20 50 55 60

Pro Gly Ile Asp Tyr Asp Ile Ser Val Ile Thr Leu Ile Asn Gly Gly

25 65 70 75 80

Glu Ser Ala Pro Thr Thr Leu Thr Gln Gln Thr

30 85 90

40

45

50

55

60

65