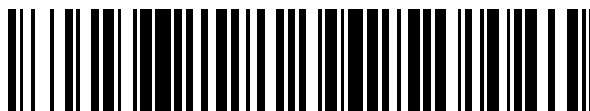


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 504**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2009 E 17158755 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 3199553**

54 Título: **Procedimientos y agentes para el diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular**

30 Prioridad:

29.10.2008 US 197650 P

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

22.11.2019

73 Titular/es:

**CIRCULAR COMMITMENT COMPANY (100.0%)
8F., No. 113, Chung Shan N. Rd., Sec. 2, 104
Taipei City, TW**

72 Inventor/es:

**KAO, KUO-JANG y
HUANG, ANDREW, T.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 732 504 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

Procedimientos y agentes para el diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular

Antecedentes de la invención

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el cáncer primario de hígado más frecuente y es el quinto cáncer más común en los seres humanos en todo el mundo. El CHC también es la cuarta causa más importante de las muertes relacionadas con el cáncer (Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer 2001; 94: 153-156). En 1990, la Organización Mundial de la Salud estimó que había aproximadamente 430.000 nuevos casos de cáncer de hígado en el mundo y que un número similar de pacientes murió ese año como resultado de esta enfermedad.

La patogenia del CHC se ha asociado con las infecciones por virus de la hepatitis B (VHB) y virus de la hepatitis C (VHC) crónicas, así como con las afecciones del hígado ocasionadas por cirrosis (Bruix J, y col. J Hepatol 35: 421-430, 2001; Bruix J, y col. Cancer Cell 5: 215-219, 2004). Por consiguiente, la incidencia del CHC es la más alta en los países del este asiático, tales como China, Hong Kong, Taiwán, Corea y Japón, en donde las infecciones por VHB y VHC son las más predominantes (Bruix J, y col. Cancer Cell 5: 215-219, 2004; Haskell CM. Capítulo 46 Liver: Natural History, Diagnosis and Staging en "Cancer Treatment" 5ª edición, W. B. Saunders Company, Filadelfia, editores: Haskell CM y Berek JS). Sin embargo, la incidencia del CHC en los países occidentales está en constante aumento (Parkin DM, y col. Int J Cancer 94: 153-156, 2001). En los Estados Unidos, a lo largo de la última década el CHC presentó el segundo aumento más alto de incidencia y el aumento más alto de la tasa de mortalidad de todos los cánceres (Ann Int Med 139:817-823, 2003). Por lo tanto, en los Estados Unidos y en todo el mundo el CHC es una causa importante de mortalidad y morbilidad, y una carga económica significativa debido a los costos hospitalarios y a la pérdida de trabajo de las personas con CHC.

El control satisfactorio del CHC requiere un diagnóstico correcto de la enfermedad en una fase temprana de su evolución. Sin embargo, distinguir a los tumores de CHC pequeños de otras enfermedades del hígado malignas y no malignas, incluyendo tumores metastásicos, colangiocarcinoma, hiperplasia nodular focal, nódulos del hígado displásicos y regenerativos, utilizando las técnicas actuales tales como los estudios por formación de imágenes, la biopsia con aguja gruesa y/o la biopsia aspirativa con aguja fina, ha resultado ser un desafío (Ferrell LD, y col. Am J Surg Pathol 17: 1113-1123, 1993; Horigome H, y col. Hepato-Gastroenterology 47: 1659-1662, 2000; Kalar S, y col. Arch Pathol Lab Med 131: 1648-1654, 2007; Seki S, y col. Clin Cancer Res 6: 3460-3473, 2000). Además, los intentos para tratar el CHC de forma terapéutica han sido en buena medida insatisfactorios (Bruix J, y col. J Hepatol 35: 421-430, 2001; Bruix J, y col. Cancer Cell 5: 215-219, 2004; Haskell CM. Capítulo 46 Liver: Natural History, Diagnosis and Staging en "Cancer Treatment" 5ª edición, W. B. Saunders Company, Filadelfia, editores: Haskell CM y Berek JS; Szklaruk J, y col. AJR 180: 441-453, 2003). Como resultado, a pesar de la terapia activa la tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes con CHC en los EE.UU. es solo del 10,5 %, lo que está en segundo lugar en magnitud después del cáncer pancreático (ACS Cancer Facts & Figures (2007)). Por lo tanto, existe una necesidad acuciante de identificar un marcador más fiable para diferenciar al CHC de otras patologías del hígado y facilitar la detección precoz de esta enfermedad. Además, existe una necesidad acuciante de desarrollar agentes terapéuticos nuevos y más eficaces para el tratamiento del CHC.

El documento WO 2008/091781 describe procedimientos y materiales para el uso de inhibidores de la PLVAP (sigla del inglés: *plasmalemma vesicle-associated protein*, proteína asociada a vesículas de membrana plasmática) para reducir el crecimiento tumoral en un mamífero.

Sumario de la invención

El objeto de la invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Lo precedente será evidente a partir de la siguiente descripción más particular de las realizaciones ejemplares de la invención, como se ilustra en los dibujos que adjuntos, en los que los caracteres de referencia similares se refieren a las mismas partes a lo largo de las distintas vistas. Los dibujos no están necesariamente a escala, poniéndose en cambio énfasis en ilustrar las realizaciones de la presente invención.

La FIG. 1 es un diagrama de flujo que representa un algoritmo para la identificación de genes que muestran una expresión diferencial extrema entre tejidos tumorales y no tumorales adyacentes.

La FIG. 2 es un gráfico que representa las intensidades de expresión del gen de PLVAP en muestras (n=18) de tejido de CHC (CHCE) y de hígado no tumoral adyacente (NE) emparejadas, así como de muestras de CHC no emparejadas (n=82), según se determinó mediante la caracterización de transcritos de ARNm utilizando los chips génicos de Affymetrix.

La FIG. 3A es un gráfico que representa las cantidades de expresión relativa de PLVAP en muestras de tejido de CHC (CHCE) y de hígado no tumoral adyacente (NE) emparejadas, según se determinó mediante RT-PCR cuantitativa Taqman. Los niveles de ARNm de PLVAP son significativamente superiores en CHC respecto a los tejidos de hígado no tumorales.

La FIG. 3B es un gráfico que representa las intensidades de expresión génica de PLVAP en 18 muestras de tejido de CHC (CHCE) y de hígado no tumoral adyacente (NE) emparejadas, según se determinó mediante el análisis por micromatriz. Los niveles de transcrito de PLVAP fueron más elevados en CHC que en el tejido de hígado no tumoral adyacente de cada individuo para todos los individuos analizados, excepto uno.

Las FIG. 4A y B muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO:2) de la proteína de fusión recombinante de la proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ humana etiquetada con His utilizada para generar el antisuero policlonal anti PLVAP en ratón.

La FIG. 5 es una imagen de una transferencia de Western que representa la detección de la proteína PLVAP recombinante antes y después de la digestión con trombina para eliminar la etiqueta de His. Las flechas a la izquierda de la transferencia indican los emplazamientos de His-PLVAP y PLVAP en la transferencia. Los números a la izquierda de la transferencia indican las posiciones de los patrones de peso molecular.

La FIG. 6A es un gráfico que representa la presencia de las cantidades relativas significativas del ARNm de PLVAP en células endoteliales de CHC obtenidas mediante microdissección por captura láser de dos muestras de tejido de CHC (Muestra A (negro) y Muestra B (gris)), según se determinó mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real de dos etapas. Las líneas discontinuas representan las señales de RT-PCR cuantitativa Taqman del ARNm de beta actina en las mismas muestras utilizadas para la RT-PCR cuantitativa del ARNm de PLVAP. Los resultados indican la presencia de ARNm de PLVAP medible fácilmente en las células endoteliales extraídas (líneas continuas).

La FIG. 6B es un gráfico que representa la ausencia de cantidades relativas significativas de ARNm de PLVAP en células obtenidas mediante microdissección por captura láser de tejido de hígado no tumoral adyacente con respecto a tejido de CHC, en dos muestras de CHC (Muestra A (negro) y Muestra B (gris)), según se determinó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real Taqman de dos etapas. Los resultados indican ARNm de PLVAP no detectable (línea continua negra) y apenas detectable (línea continua gris) en las células extraídas.

La FIG. 6C es un gráfico que representa las cantidades relativas de ARNm de PLVAP en células tumorales de CHC obtenidas mediante microdissección por captura láser de dos muestras de tejido de CHC (Muestra A (negro) y Muestra B (gris)), según se determinó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real Taqman de dos etapas. Los resultados indican la presencia de cantidades muy pequeñas de ARNm de PLVAP (líneas continuas) en las células de CHC extraídas debido a una contaminación menor inevitable procedente de la porción de células endoteliales vasculares unida a las células de CHC extraídas.

La FIG. 7 es un gráfico que representa el título de anticuerpos anti PLVAP en antisuero de ratón generado frente a la proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ recombinante, según se determinó por ELISA.

Las FIG. 8A-F son imágenes que muestran cortes de tejidos fijados en formalina de CHC (las FIG. 8A, C, E) y de hígado no tumoral adyacente (las FIG. 8B, D, F) emparejados, de tres pacientes con carcinoma hepatocelular, que se tiñeron de forma inmunohistoquímica utilizando antisuero policlonal anti PLVAP para detectar el emplazamiento de la proteína PLVAP. Los tejidos emparejados se muestran en las FIG. 8A,B; las FIG. 8C,D y las FIG. 8E,F. La proteína PLVAP, la cual aparece como una tinción marrón (flechas) en las imágenes de CHC, se detectaron solo en células endoteliales capilares de carcinomas hepatocelulares (las FIG. 8A,C,E). En el tejido de hígado no tumoral no había PLVAP detectable (las FIG. 8B, D, F).

Las FIG. 9A-F son imágenes que muestran cortes fijados con formalina de tejidos de CHC (las FIG. 9A,C,E,F) y de hígado no tumorales (las FIG. 9B,D), de tres pacientes con carcinoma hepatocelular, que se tiñeron de forma inmunohistoquímica utilizando antisuero policlonal anti PLVAP para detectar el emplazamiento de la proteína PLVAP. Las FIG. 9A,B y las FIG. 9C,D muestran muestras de tejido de CHC y de hígado no tumoral adyacente emparejadas. La proteína PLVAP, la que aparece como una tinción marrón (flechas) en las imágenes de CHC, se detectó solo en células endoteliales capilares de carcinomas hepatocelulares (las FIG. 9A,C,E,F). En el tejido de hígado no tumoral no había PLVAP detectable (las FIG. 9B,D).

Las FIG. 10A-F son imágenes que muestran cortes de tejidos fijados con formalina de hiperplasia nodular focal de seis pacientes distintos, que se tiñeron de forma inmunohistoquímica utilizando antisuero policlonal anti PLVAP para detectar el emplazamiento de la proteína PLVAP. La proteína PLVAP no se detectó en células endoteliales que revisten los sinusoides/capilares vasculares de tejidos de hígado no tumorales de hiperplasia nodular focal. Se observó algo de tinción positiva (gris oscuro) en células epiteliales de las vías biliares (las FIG. 10A, 10D y 10F) y en los vasos de los espacios porta (las FIG. 10D y 10F), pero no en las células endoteliales del parénquima hepático. La tinción positiva de las células epiteliales de las vías biliares se debió a la unión de anticuerpos no específicos en el antisuero contra PLVAP.

Las FIG. 11A y 11B son imágenes que muestran cortes de tejido fijados con formalina de dos pacientes con hemangioma hepático, que se tiñeron de forma inmunohistoquímica con antisuero policlonal anti PLVAP. Las células de revestimiento endotelial del hemangioma hepático no mostraron expresión significativa de la proteína PLVAP.

Las FIG. 12A y 12B son imágenes que muestran cortes de tejido fijados con formalina de dos pacientes con hepatitis B crónica activa, que se tiñeron de forma inmunohistoquímica con antisuero policlonal anti PLVAP. La proteína PLVAP no se detectó en células endoteliales que revisten los sinusoides/capilares vasculares de tejidos de hígado no tumorales de pacientes de hepatitis B crónica.

Las FIG. 13A-D son imágenes que muestran cortes de tejido fijados con formalina de tres pacientes distintos con hepatitis C crónica activa, que se tiñeron de forma inmunohistoquímica con antisuero policlonal anti PLVAP. Los cortes de tejido mostrados en las FIG. 13B y 13D son del mismo paciente. La proteína PLVAP no se detectó en células endoteliales que revisten los sinusoides/capilares vasculares de tejidos de hígado no tumorales de pacientes de hepatitis C crónica.

Las FIG. 14A-D son imágenes que muestran cortes de tejido fijados con formalina de tres pacientes distintos con

cánceres de hígado metastásicos, que se tiñeron de forma inmunohistoquímica con antisuero policlonal anti PLVAP. Los cortes de tejido son de pacientes con adenocarcinoma colorrectal metastásico (FIG. 14A), colangiocarcinoma intra hepático (las FIG. 14B y C) o carcinoma de ovario metastásico (FIG. 14D). Los cortes de tejido mostrados en las FIG. 14B y 14C son del mismo paciente. La proteína PLVAP no se detectó en las células

endoteliales que revisten los sinusoides/capilares vasculares de los tejidos de cáncer metastásico. La FIG. 15A muestra las secuencias génicas nucleotídicas (parte superior) (SEQ ID NO:3) y de aminoácidos deducida (parte media) (SEQ ID NO:4) del dominio V_H del anticuerpo monoclonal KFCC-GY4. También se indica la secuencia de restos de aminoácidos en los CDR 1 (SEQ ID NO:5), 2 (SEQ ID NO:6) y 3 (SEQ ID NO:7) (parte inferior).

La FIG. 15B muestra las secuencias génica nucleotídica (parte superior) (SEQ ID NO:8) y de aminoácidos deducida (parte media) (SEQ ID NO:9) del dominio V_L del anticuerpo monoclonal KFCC-GY4. También se indica la secuencia de restos de aminoácido en las CDR 1 (SEQ ID NO:10), 2 (SEQ ID NO:11) y 3 (SEQ ID NO:12) (parte inferior).

La FIG. 16A muestra las secuencias génica de nucleótidos (parte superior) (SEQ ID NO:13) y de aminoácidos deducida (parte media) (SEQ ID NO:14) del dominio V_H del anticuerpo monoclonal KFCC-GY5. También se indica la secuencia de restos de aminoácido en las CDR 1 (SEQ ID NO:15), 2 (SEQ ID NO:16) y 3 (SEQ ID NO:17) (parte inferior).

La FIG. 16B muestra las secuencias génica de nucleótidos (parte superior) (SEQ ID NO:18) y de aminoácidos deducida (parte media) (SEQ ID NO:19) del dominio V_L del anticuerpo monoclonal KFCC-GY5. También se indica la secuencia de restos de aminoácido en las CDR 1 (SEQ ID NO:20), 2 (SEQ ID NO:21) y 3 (SEQ ID NO:22) (parte inferior).

La FIG. 17 es un gráfico que representa la unión de los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 (círculos vacíos) y KFCC-GY5 (círculos rellenos) contra la proteína PLVAP recombinante a diversas concentraciones de anticuerpo, según se determinó por ELISA.

La FIG. 18 es una inmunotransferencia que muestra que los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y KFCC-GY5 pueden detectar 5 ng de proteína PLVAP recombinante. Carril 1: patrón de peso molecular; Carril 2: inmunotransferencia con anticuerpo monoclonal KFCC-GY4; Carril 3: inmunotransferencia con anticuerpo monoclonal KFCC-GY5. El peso molecular de la proteína PLVAP recombinante es de 45 kD.

Las FIG. 19A y 19C son geles de acrilamida con SDS teñidos con azul de Coomassie. Carril 1: patrón de peso molecular; Carril 2: proteínas de membrana hidrófobas extraídas con TX-114 de células endoteliales vasculares de cordón umbilical humano que se han estimulado con VEGF (40 ng/ml) durante 72 horas antes de la extracción.

La FIG. 19B es una inmunotransferencia, en la que el extracto mostrado en el Carril 2 de la FIG. 19A se analizó con anticuerpos monoclonales KFCC-GY4. Carril 1: patrón de peso molecular; Carril 2: proteínas de membrana hidrófobas extraídas con TX-114 de células endoteliales vasculares de cordón umbilical humano que se han estimulado con VEGF (40 ng/ml) durante 72 horas antes de la extracción.

La FIG. 19D es una inmunotransferencia en la que el extracto mostrado en el Carril 2 de la FIG. 19C se analizó con anticuerpos monoclonales KFCC-GY-5. Carril 1: patrón de peso molecular; Carril 2: proteínas de membrana hidrófobas extraídas con TX-114 de células endoteliales vasculares de cordón umbilical humano que se han estimulado con VEGF (40 ng/ml) durante 72 horas antes de la extracción.

La FIG. 20A es una microfotografía de fluorescencia que representa la tinción de inmunofluorescencia de células endoteliales vasculares humanas (CEVUH) con IgG de ratón normal de control. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Aumento = 600x.

La FIG. 20B es una microfotografía de fluorescencia que representa la tinción de inmunofluorescencia de células endoteliales vasculares humanas (CEVUH) con anticuerpo monoclonal contra el factor de von Willebrand (FVW). El FVW es un marcador positivo para células endoteliales vasculares humanas. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Aumento = 600x.

La FIG. 20C es una microfotografía de fluorescencia que representa la tinción de inmunofluorescencia de células endoteliales vasculares humanas (CEVUH) con anticuerpo monoclonal KFCC-GY4 contra PLVAP. Los anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY4 reaccionaron de forma positiva con células endoteliales vasculares humanas. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Aumento = 600x.

La FIG. 20D es una microfotografía de fluorescencia que representa la tinción de inmunofluorescencia de células endoteliales vasculares humanas (CEVUH) con anticuerpo monoclonal contra PLVAP KFCC-GY5. Los anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY5 reaccionaron de forma positiva con células endoteliales vasculares humanas. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Aumento = 600x.

La FIG. 21A es una microfotografía óptica de un corte de tejido de hepatoma fijado con formalina incluido en un bloque de parafina, que se tiñó con anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY5. Se detectó una fuerte señal de PLVAP (tinción gris oscura) en células endoteliales vasculares de hepatoma. El aumento es de 100X.

La FIG. 21B es una microfotografía óptica de un corte de tejido de hepatoma fijado con formalina del mismo paciente que la muestra mostrada en la FIG. 21A, que se tiñó con anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY4. Se detectó una señal de PLVAP moderada (tinción gris clara) en células endoteliales vasculares de hepatoma. El aumento es de 100X.

La FIG. 21C es una microfotografía óptica de un corte de tejido de hepatoma fijado con formalina de un paciente distinto que las muestras mostradas en las FIG. 21A y B, que se tiñó con anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY5. Se detectó una señal de PLVAP fuerte (tinción gris oscura) en células endoteliales vasculares. El aumento es de 100X.

La FIG. 21D es una microfotografía óptica de un corte de tejido de hepatoma fijado con formalina del mismo paciente que la muestra mostrada en la FIG. 21C, incluido en un bloque de parafina, el cual se tiñó con anticuerpos

monoclonales anti PLVAP KFCC-GY4. Se detectó una señal de PLVAP moderada (tinción gris clara) en células endoteliales vasculares, lo que indica que los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 se unen al antígeno PLVAP peor que los anticuerpos KFCC-GY5. El aumento es de 100X.

Las FIG. 22A-H son microfotografías ópticas de cortes de tejidos de hepatoma (las FIG. 22A, C, E y G) y de tejidos de hígado no tumorales adyacentes (las FIG. 22B, D, F y H) procedentes de cuatro pacientes con hepatoma distintos seleccionados aleatoriamente. Los cortes se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY5. Se detectó una señal de PLVAP (tinción gris) en células endoteliales vasculares de tejido de hepatoma, pero no en tejido de hígado no tumoral de células endoteliales vasculares. El aumento es de 100X. Las FIG. 22A y B, C y D, E y F, y G y H representan los cuatro conjuntos de tejidos de hepatoma y de hígado no tumorales emparejados.

La FIG. 23A es una microfotografía de fluorescencia que representa células endoteliales vasculares humanas (las CEVUH) que se tiñeron con IgG de ratón de control. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI).

La FIG. 23B es una microfotografía de fluorescencia que representa células endoteliales vasculares humanas (las CEVUH) que se tiñeron con anticuerpo monoclonal KFCC-GY4 contra PLVAP. Los anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY4 reaccionan de forma positiva con las superficies de las células endoteliales vasculares humanas. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI).

La FIG. 23C es una microfotografía de fluorescencia que representa células endoteliales vasculares humanas (las CEVUH) que se tiñeron con anticuerpo monoclonal contra PLVAP KFCC-GY5. Los anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY5 reaccionaron de forma positiva con las superficies de las células endoteliales vasculares humanas. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI).

La FIG. 24 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína PLVAP humana (n.º de Referencia de Genbank NP_112600; SEQ ID NO:23).

Las FIG. 25A y 25B muestran la secuencia de nucleótidos del ADNc de PLVAP humana de longitud completa (n.º de Referencia de Genbank NM_031310; SEQ ID NO:24).

La FIG. 26 es una tabla que indica la expresión de PLVAP en células endoteliales vasculares en diversos tejidos y órganos normales en primates humanos y dos no humanos, según se determinó mediante inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos KFCC-GY4 y Gy5.

Las FIG. 27A-F2 muestran tejidos de ser humano y de mono normales que se tiñeron de forma inmunohistoquímica con los anticuerpos monoclonales (Acm) KFCC-GY4, KFCC-GY5 y anti CD34. Las flechas señalan las células endoteliales capilares que expresan PLVAP en los respectivos tejidos.

La FIG. 27A muestra un corte de tejido de glándula suprarrenal humana que se ha teñido con el Acm KFCC-GY4. La FIG. 27B muestra un corte de tejido de glándula suprarrenal humana que se ha teñido con el Acm anti CD34 humana, que reconoce a CD34, un marcador de células endoteliales. La FIG. 27C muestra un corte de tejido de glándula suprarrenal de mono cinomolgo que se ha teñido con el Acm KFCC-GY4. La FIG. 27D muestra un corte de tejido de glándula suprarrenal de mono rhesus que se ha teñido con el Acm KFCC-GY4.

La FIG. 27E muestra un corte de tejido de glándula suprarrenal humana que se ha teñido con el Acm KFCC-GY5.

La FIG. 27F muestra un corte de tejido de glándula suprarrenal humana que se ha teñido con el Acm anti CD34 humana, que reconoce a CD34, un marcador de células endoteliales. La FIG. 27G muestra un corte de tejido de glándula suprarrenal de mono cinomolgo que se ha teñido con el Acm KFCC-GY5. La FIG. 27H muestra un corte de tejido de glándula suprarrenal de mono rhesus que se ha teñido con el Acm KFCC-GY5.

La FIG. 27I muestra un corte de tejido de riñón humano que se ha teñido con el Acm KFCC-GY4. La FIG. 27J muestra un corte de tejido de riñón humano que se ha teñido con el Acm anti CD34 humana, que reconoce a CD34, un marcador de células endoteliales. La FIG. 27K muestra un corte de tejido de riñón de mono cinomolgo que se ha teñido con el Acm KFCC-GY4. La FIG. 27L muestra un corte de tejido de riñón de mono rhesus que se ha teñido con el Acm KFCC-GY4. El Acm KFCC-GY4 tiñe células endoteliales capilares entre los túbulos renales y no tiñe células endoteliales en los glomérulos. Por el contrario, el anticuerpo anti CD34 tiñe de forma positiva células endoteliales capilares entre los túbulos renales y en los glomérulos.

La FIG. 27M muestra un corte de tejido de riñón humano que se ha teñido con el Acm KFCC-GY5. La FIG. 27N muestra un corte de tejido de riñón humano que se ha teñido con el Acm anti CD34 humana, que reconoce a CD34, un marcador de células endoteliales. La FIG. 27O muestra un corte de tejido de riñón de mono cinomolgo que se ha teñido con el Acm KFCC-GY5. La FIG. 27P muestra un corte de tejido de riñón de mono rhesus que se ha teñido con el Acm KFCC-GY5. Al igual que el Acm KFCC-GY4, el Acm KFCC-GY5 tiñe células endoteliales capilares entre los túbulos renales y no tiñe células endoteliales en los glomérulos. Por el contrario, el anticuerpo anti CD34 tiñe de forma positiva células endoteliales capilares entre los túbulos renales y en los glomérulos.

La FIG. 27Q muestra un corte de tejido de cerebro humano que se ha teñido con el Acm KFCC-GY4. La FIG. 27R muestra un corte de tejido de cerebro humano que se ha teñido con el Acm anti CD34 humana, que reconoce a CD34, un marcador de células endoteliales. Las células endoteliales vasculares del cerebro se tiñen de forma positiva para el marcador endotelial CD34 (flechas). La FIG. 27S muestra un corte de tejido de cerebro de mono cinomolgo que se ha teñido con el Acm KFCC-GY4. La FIG. 27T muestra un corte de tejido de cerebro de mono rhesus que se ha teñido con el Acm KFCC-GY4. Las células endoteliales de cerebro tanto humanas como de mono no expresan PLVAP.

La FIG. 27U muestra un corte de tejido de cerebro humano que se ha teñido con el Acm KFCC-GY5. La FIG. 27V muestra un corte de tejido de cerebro humano que se ha teñido con el Acm anti CD34 humana, que reconoce a CD34, un marcador de células endoteliales. Las células endoteliales vasculares de cerebro se tiñeron de forma positiva para el marcador endotelial CD34 (flechas). La FIG. 27W muestra un corte de tejido de cerebro de mono cinomolgo que se ha teñido con el Acm KFCC-GY5. La FIG. 27X muestra un corte de tejido de cerebro de monos

rhesus que se ha teñido con el Acm KFCC-GY5. Las células endoteliales de cerebro tanto humanas como de mono no expresan PLVAP.

La FIG. 27Y muestra un corte de tejido de hígado humano que se ha teñido con el Acm KFCC-GY4. La FIG. 27Z muestra un corte de tejido de hígado humano que se ha teñido con el Acm anti CD34 humana, que reconoce a CD34, un marcador de células endoteliales. Las células endoteliales vasculares de cerebro se tiñeron de forma positiva para el marcador endotelial CD34 (flechas). La FIG. 27A2 muestra un corte de tejido de hígado de mono cinomolgo que se ha teñido con el Acm KFCC-GY4. La FIG. 27B2 muestra un corte de tejido de hígado de mono rhesus que se ha teñido con el Acm KFCC-GY4. El Acm KFCC-GY4 no reacciona con células endoteliales de sinusoide (flechas finas) y la vena central (flechas gruesas) de hígado en ser humano, mono cinomolgo y mono rhesus.

La FIG. 27C2 muestra un corte de tejido de hígado humano que se ha teñido con el Acm KFCC-GY5. La FIG. 27D2 muestra un corte de tejido de hígado humano que se ha teñido con el Acm anti CD34 humana, que reconoce CD34, un marcador de células endoteliales. Las células endoteliales vasculares de cerebro se tiñeron de forma positiva para el marcador endotelial CD34 (flechas). La FIG. 27E2 muestra un corte de tejido de hígado de mono cinomolgo que se ha teñido con el Acm KFCC-GY4. La FIG. 27F2 muestra un corte de tejido de hígado de mono rhesus que se ha teñido con el Acm KFCC-GY5. El Acm KFCC-GY5 no reacciona con células endoteliales de sinusoide (flechas finas) y vena central (flechas gruesas) de hígado de ser humano, mono cinomolgo y mono rhesus.

La FIG. 28A muestra un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de extracto de proteínas totales de 1×10^8 *E. coli* que expresan PLVAP51-442 etiquetada con His (Carril 1); PLVAP282-442 etiquetada con His (Carril 2); PLVAP51-292 etiquetada con His (Carril 3) o CEACAM6 etiquetada con His (Carril 4). Los patrones de proteína de peso molecular se resuelven en el Carril M.

La FIG. 28B muestra una inmunotransferencia que se analizó con Acm KFCC-GY4 de ratón para detectar las proteínas PLVAP en un extracto de proteínas totales de 1×10^8 *E. coli* que expresan PLVAP51-442 etiquetada con His (Carril 1); PLVAP282-442 etiquetada con His (Carril 2); PLVAP51-292 etiquetada con His (Carril 3) o CEACAM6 etiquetada con His (Carril 4). Los patrones de proteína de peso molecular se resuelven en el Carril M.

La FIG. 28C muestra una inmunotransferencia que se analizó con Acm KFCC-GY5 de ratón para detectar las proteínas PLVAP en un extracto de proteínas totales de 1×10^8 *E. coli* que expresan PLVAP51-442 etiquetada con His (Carril 1); PLVAP282-442 etiquetada con His (Carril 2); PLVAP51-292 etiquetada con His (Carril 3) o CEACAM6 etiquetada con His (Carril 4). Los patrones de proteínas de peso molecular se resuelven en el Carril M.

La FIG. 28D muestra una inmunotransferencia que se analizó con anticuerpo anti etiqueta His, para detectar las proteínas PLVAP etiquetadas con His en el extracto de proteínas totales de 1×10^8 *E. coli* que expresan PLVAP51-442 etiquetada con His (Carril 1); PLVAP282-442 etiquetada con His (Carril 2); PLVAP51-292 etiquetada con His (Carril 3) o CEACAM6 etiquetada con His (Carril 4). Los patrones de proteínas de peso molecular se resuelven en el Carril M.

La FIG. 29 es un gráfico de barras que muestra la unión del anticuerpo monoclonal (Acm) KFCC-GY4 a PLVAP que se capturó en primer lugar mediante el Acm KFCC-GY5. Para este estudio se utilizó ELISA. Cada valor es una media de los duplicados.

La FIG. 30 es un gráfico de barras que representa la unión aditiva de los anticuerpos monoclonales combinados completamente humanizados obtenidos de KFCC-GY4 (CSR01-VH5/VK2) y KFCC-GY5 (CAS02-VH5/VK3) a la proteína PLVAP. Los valores son un promedio de los duplicados.

La FIG. 31 muestra un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, de los anticuerpos KFCC-GY4 y KFCC-GY5 quiméricos purificados por proteína A después de la reducción de los enlaces disulfuro. Carril 1: patrones de proteína Precision plus (Bio-Rad); Carril 2: anticuerpo KFCC-GY4 quimérico 1,0 µg; Carril 3: anticuerpo KFCC-GY5 quimérico 1,0 µg; Carril 4: patrones de proteína Precision plus (Bio-Rad).

Las FIG. 32A-G muestran la secuencia de nucleótidos del vector plasmídico a base de pANT12 que codifica la quimera de VH de KFCC-GY4 y la secuencia de aminoácidos deducida de la quimera.

Las FIG. 33A-D muestran la secuencia de nucleótidos del vector plasmídico a base de pANT13 que codifica la quimera de VK de KFCC-GY4 y la secuencia de aminoácidos deducida de la quimera.

Las FIG. 34A-F muestran la secuencia de nucleótidos del vector plasmídico a base de pANT12 que codifica la quimera de VH de KFCC-GY5 y la secuencia de aminoácidos deducida de la quimera.

Las FIG. 35A-D muestran la secuencia de nucleótidos del vector plasmídico a base de pANT13 que codifica la quimera de VK de KFCC-GY5 y la secuencia de aminoácidos deducida de la quimera.

La FIG. 36 es un gráfico que representa los resultados de un ELISA de competición de anticuerpo KFCC-GY4 en la que se analizaron series de diluciones de los anticuerpos KFCC-GY4 quimérico y murino frente a una concentración fija de GY4 biotinilado, por la unión a PLVAP. La unión del anticuerpo biotinilado disminuye con las cantidades crecientes de anticuerpos quimérico y murino de control.

La FIG. 37 es un gráfico que representa los resultados de un ELISA de competición de anticuerpo KFCC-GY5 en el que se analizaron series de diluciones de anticuerpos KFCC-GY5 quimérico y murino frente a una concentración fija de GY5 biotinilado, por la unión a PLVAP. La unión del anticuerpo biotinilado disminuye con las cantidades crecientes de anticuerpos quimérico y murino de control.

Las FIG. 38A-E muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos humanizados obtenidos del anticuerpo KFCC-GY4 quimérico CSR01. La FIG. 38A muestra las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera kappa CSR01-VK1 (las SEQ ID NO:59 y 60). La FIG. 38B muestra las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera kappa CSR01-VK2 (las SEQ ID NO:61 y 62). La FIG. 38C muestra las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera kappa CSR01-VK3 (las SEQ ID NO:63 y 64). La FIG. 38D muestra las secuencias de nucleótidos y

de aminoácidos de la cadena pesada CSR01-VH4 (las SEQ ID NO:65 y 66). La FIG. 38E muestra las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena pesada CSR01-VH5 (las SEQ ID NO:67 y 68). Las secuencias de aminoácidos de las CDR están subrayadas. Los aminoácidos que están modificados para reducir la posible antigenicidad se muestran en un recuadro.

Las FIG. 39A-D muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos humanizados obtenidos del anticuerpo KFCC-GY5 quimérico CSR02. La FIG. 39A muestra las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera kappa CSR02-VK2 (las SEQ ID NO:69 y 70). La FIG. 39B muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena ligera kappa CSR02-VK3 (las SEQ ID NO:71 y 72). La FIG. 39C muestra las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena pesada CSR02-VH4 (las SEQ ID NO:73 y 74). La FIG. 39E muestra las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena pesada CSR02-VH5 (las SEQ ID NO:75 y 76). Las secuencias de aminoácidos de las CDR están subrayadas. Los aminoácidos que están modificados para reducir la posible antigenicidad se muestran en un recuadro.

La FIG. 40 es un diagrama de flujo que representa la obtención de los anticuerpos monoclonales (Acm) anti PLVAP humana combinados completamente humanizados procedentes de los Acm KFCC-GY4 y KFCC-GY5 murinos.

La FIG. 41A representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VH de la cadena pesada variable de KFCC-GY5 variante 1 (las SEQ ID NO:77 y 78). Las secuencias de nucleótidos y proteica de la CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia de hibridoma original están subrayados.

La FIG. 41B representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VH de la cadena pesada variable de KFCC-GY5 variante 2 (las SEQ ID NO:79 y 80). Las secuencias de nucleótidos y proteica de la CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están subrayados.

La FIG. 41C representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VH de la cadena pesada variable de KFCC-GY5 variante 3 (las SEQ ID NO:81 y 82). Las secuencias de nucleótidos y proteica de las CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están subrayados.

La FIG. 41D representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VH de la cadena pesada variable de KFCC-GY5 variante 4 (las SEQ ID NO:83 y 84). Las secuencias de nucleótidos y proteica de la CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están subrayados.

La FIG. 41E representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VH de la cadena pesada variable de KFCC-GY5 variante 5 (las SEQ ID NO:85 y 86). Las secuencias de nucleótidos y proteica de la CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están subrayados.

La FIG. 42A representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VK de la cadena ligera variable de KFCC-GY5 variante 1 (SEQ ID NO:87 y 88). Las secuencias de nucleótidos y proteica de las CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están subrayados.

La FIG. 42B representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VK de la cadena ligera variable de KFCC-GY5 variante 2 (las SEQ ID NO:89 y 90). Las secuencias de nucleótidos y proteica de la CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están subrayados.

La FIG. 42C representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VK de la cadena ligera variable de KFCC-GY5 variante 3 (las SEQ ID NO:91 y 92). Las secuencias de nucleótidos y proteica de la CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están subrayados.

La FIG. 43A representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VH de la cadena pesada variable de KFCC-GY4 variante 1 (las SEQ ID NO:93 y 94). Las secuencias de nucleótidos y proteica de la CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están subrayados.

La FIG. 43B representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VH de la cadena pesada variable de KFCC-GY4 variante 2 (las SEQ ID NO:95 y 96). Las secuencias de nucleótidos y proteica de la CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están subrayados.

La FIG. 43C representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VH de la cadena pesada variable de KFCC-GY4 variante 3 (las SEQ ID NO:97 y 98). Las secuencias de nucleótidos y proteica de las CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están subrayados.

La FIG. 43D representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VH de la cadena pesada variable de KFCC-GY4 variante 4 (las SEQ ID NO:99 y 100). Las secuencias de nucleótidos y proteica de la CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están subrayados.

La FIG. 43E representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VH de la cadena pesada variable de KFCC-GY4 variante 4 (las SEQ ID NO:101 y 102). Las secuencias de nucleótidos y proteica de la CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están

subrayados.

La FIG. 44A representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VK de la cadena ligera variable de KFCC-GY4 variante 1 (SEQ ID NO:103 y 104). Las secuencias de nucleótidos y proteica de la CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están

subrayados. La FIG. 44B representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VK de la cadena ligera variable de KFCC-GY4 variante 2 (las SEQ ID NO:105 y 106). Las secuencias de nucleótidos y proteica de la CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están

subrayados. La FIG. 44C representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida del VK de la cadena ligera variable de KFCC-GY4 variante 3 (las SEQ ID NO:107 y 108). Las secuencias de nucleótidos y proteica de la CDR están ligeramente sombreadas. Los aminoácidos variantes cambiados de la secuencia del hibridoma original están

subrayados. Las FIG. 45A-B muestran un alineamiento de las secuencias del dominio variable de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras Kappa variantes del anticuerpo KFCC-GY4 humanizado.

Las FIG. 46A-B muestran un alineamiento de las secuencias del dominio variable de las cadenas pesadas y cadenas ligeras Kappa variantes del anticuerpo KFCC-GY5 humanizado.

La FIG. 47A muestra un gel SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie de los anticuerpos KFCC-GY4 humanizados purificados después de la reducción de los enlaces disulfuro. Carril 1, marcador Precision Plus (Biorad); Carril 2, IgG4 VH4/VK2 1,0 µg; Carril 3, IgG4 VH4/VK3 1,0 µg; Carril 4, IgG4 VH5/VK1 1,0 µg; Carril 5, IgG4 VH5/VK2 1,0 µg; Carril 6, IgG4 VH5/VK3 1,0 µg; Carril 7, marcador Precision Plus.

La FIG. 47B muestra un gel de SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie de anticuerpos KFCC-GY5 humanizados purificados después de la reducción de los enlaces disulfuro. Carril 1, marcador Precision Plus; Carril 2, IgG4 VH4/VK2 1,0 µg; Carril 3, IgG4 VH4/VK3 1,0 µg; Carril 4, IgG4 VH5/VK2 1,0 µg; Carril 5, IgG4 VH5/VK3 1,0 µg; Carril 6, marcador Precision Plus.

La FIG. 48 es un gráfico que representa los resultados de un ELISA de competición de PLVAP que ilustra la unión de los anticuerpos humanizados KFCC-GY4 variantes purificados, que se mezclaron con una concentración fija de anticuerpo KFCC-GY4 murino biotinilado competidor, a la proteína PLVAP a concentraciones variables.

La FIG. 49 es un gráfico que representa los resultados de un ELISA de competición de PLVAP que ilustra la unión de anticuerpos humanizados KFCC-GY5 variantes purificados, que se mezclaron con una concentración fija de anticuerpo KFCC-GY5 competidor, a la proteína PLVAP a concentraciones variables.

La FIG. 50 representa una curva de titulación que ilustra la unión tanto del anticuerpo monoclonal anti PLVAP quimérico como del completamente humanizado a PLVAP, como se determinó mediante ELISA.

Las FIG. 51A-C son imágenes de células endoteliales vasculares del cordón umbilical humano que se han teñido con los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y KFCC-GY5 murinos en estudios de inmunofluorescencia. La FIG. 51A muestra la tinción por inmunofluorescencia de células endoteliales vasculares de cordón umbilical humanas con los Acm KFCC-GY4 murinos. La FIG. 51B muestra la tinción por inmunofluorescencia de células endoteliales vasculares de cordón umbilical humanas con los Acm KFCC-GY5 murinos. La FIG. 51C muestra la tinción por inmunofluorescencia de células endoteliales vasculares de cordón umbilical humanas con IgG de ratón como un control negativo.

Las FIG. 52A-G son imágenes de células endoteliales vasculares de cordón umbilical humanas que se han teñido con anticuerpos KFCC-GY4 (CSR01) quiméricos o humanizados en estudios de inmunofluorescencia. FIG. 52A: Acm KFCC-GY4 quimérico; FIG. 52B: CSR01-VH4/VK2; FIG. 52C: CSR01-VH4/VK3; FIG. 52D: CSR01-VH5/VK1; FIG. 52E: CSR01-VH5/VK2; FIG. 52F: CSR01-VH5/VK3; FIG. 52G: IgG humana.

Las FIG. 53A-F son imágenes de células endoteliales vasculares de cordón umbilical humanas que se han teñido con anticuerpos KFCC-GY5 quiméricos o humanizados en estudios de inmunofluorescencia. FIG. 53A: Acm KFCC-GY5 (CSR02) quimérico; FIG. 53B: CSR02-VH4/VK2; FIG. 53C: CSR02-VH4/VK3; FIG. 53D: CSR02-VH5/VK2; FIG. 53E: CSR02-VH5/VK3; FIG. 53F: IgG humana.

La FIG. 54 es un gráfico que representa la detección de la proteína PLVAP en dos muestras de suero de pacientes de CHC y en patrones de PLVAP diluidos en serie (1000 ng/ml a 10 ng/ml). No se detectó PLVAP en dos muestras de suero normales. Las muestras de suero se obtuvieron de dos pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC-63 y CHC-82) y dos adultos normales (Normal-13 y Normal-14). Las muestras de suero se ensayaron en diluciones de 2 veces y 4 veces.

Descripción detallada de la invención

Sigue una descripción de las realizaciones ejemplares de la invención.

Definiciones

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "Proteína Asociada a Vesículas de Membrana Plasmática", "PLVAP" y "PV-1" se refieren a una proteína PLVAP (por ejemplo, de mamífero, humana) de origen natural o endógena, y las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es la misma o sustancialmente la misma que la de la proteína PLVAP de origen natural o endógena (por ejemplo, proteínas recombinantes, proteínas sintéticas). Por consiguiente, las expresiones "Proteína Asociada a Vesículas de Membrana Plasmática", "PLVAP" y "PV-1", que se utilizan indistintamente en el presente documento, incluyen variantes polimórficas o alélicas y otras isoformas de una proteína PLVAP producida mediante, por ejemplo, corte y empalme alternativo u otros procesos celulares, que se

producen de forma natural en mamíferos (por ejemplo, seres humanos). Preferentemente, la proteína PLVAP es una proteína humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23 (véase, n.º de Referencia de Genbank NP_112600 y la FIG. 24).

Como se define en el presente documento, un "antagonista de PLVAP" es un anticuerpo que, en una realización, inhibe (por ejemplo, reduce, previene) una actividad de una proteína PLVAP o, en otra realización, inhibe (por ejemplo, reduce, previene) la expresión de un gen y/o producto génico de PLVAP. Las actividades de una proteína de PLVAP que pueden inhibirse mediante un antagonista de la invención incluyen, pero sin limitación, la formación, el crecimiento, la vascularización y/o la evolución de un tumor de carcinoma hepatocelular. En una realización particular el antagonista de PLVAP se une de forma específica a la proteína PLVAP de mamífero (por ejemplo, ser humano) e inhibe una actividad de la proteína PLVAP.

Como se utiliza en el presente documento "se une de forma específica" se refiere a la unión de un anticuerpo a un producto del gen de PLVAP (por ejemplo, ARN, proteína) con una afinidad (por ejemplo, una afinidad de unión) que es al menos de aproximadamente 5 veces, preferentemente al menos de aproximadamente 10 veces, mayor que la afinidad con la que el antagonista de PLVAP se une a una proteína que no es PLVAP.

Como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y no a una longitud específica. Por lo tanto, "polipéptido" abarca proteínas, péptidos y oligopéptidos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que tiene afinidad por una diana, antígeno o epítipo, e incluye anticuerpos tanto de origen natural como modificados por ingeniería genética. El término "anticuerpo" abarca anticuerpos humanizados así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fv, Fc, Fd, Fab, Fab', F(ab)', scFv, scFab, dAb). (Véase, por ejemplo, Harlow y col., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

La expresión "región variable de anticuerpo" se refiere a la región de un anticuerpo que se une de forma específica a un epítipo (por ejemplo, V_H , V_{HH} , V_L), ya sea de forma independiente o cuando se combina con otras regiones variables de anticuerpo (por ejemplo, una pareja V_H/V_L).

El término "epítipo" se refiere a una unidad de estructura a la que una pareja V_H/V_L de anticuerpo se une de forma convencional. Un epítipo define el sitio de unión mínimo para un anticuerpo y, por lo tanto, representa la diana de especificidad de un anticuerpo.

La expresión "región determinante de complementariedad" o "CDR" se refiere a una región hipervariable de una región variable de anticuerpo de una cadena pesada o cadena ligera, que contiene secuencias de aminoácidos que tienen la capacidad de unirse de forma específica a una diana antigénica (por ejemplo, epítipo). Una cadena pesada o ligera típica tendrá las tres CDR (CDR1, CDR2, CDR3), que explica la especificidad de anticuerpo por un epítipo particular.

Como se define en el presente documento, la expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una parte de un anticuerpo que contiene una o más de las CDR y tiene afinidad por un determinante antigénico por sí misma. Los ejemplos no limitativos incluyen fragmentos Fab, fragmentos $F(ab)'_2$, dímeros de cadena pesada-ligera y estructuras monocaténarias, tales como una cadena ligera completa o una cadena pesada completa.

Como se utiliza en el presente documento, el término "especificidad" se refiere a la capacidad de un anticuerpo de unirse de forma preferencial a un epítipo y no implica necesariamente una alta afinidad.

El término "afinidad" se refiere a una medida de la fuerza de unión entre un anticuerpo y un determinante antigénico. La afinidad depende de varios factores, incluyendo la estrechez del ajuste estereoquímico entre el anticuerpo y el determinante antigénico, el tamaño del área de contacto entre ellos y la distribución de los grupos cargados e hidrófobos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "constante de afinidad" o " K_d " se refiere a una constante de disociación utilizada para medir la afinidad de un anticuerpo por un antígeno. Cuanto menor es la constante de afinidad, mayor es la afinidad de la inmunoglobulina por el antígeno o el determinante antigénico, y viceversa. Tal constante se calcula fácilmente a partir de las constantes de velocidad para las reacciones de asociación-disociación según se mide mediante la metodología de cinética convencional para reacciones de anticuerpos.

Como se denomina en el presente documento, el término "compite" significa que la unión de un primer polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) a un antígeno diana se inhibe por la unión de un segundo polipéptido (por ejemplo, anticuerpo). Por ejemplo, la unión puede inhibirse de forma estérica, por ejemplo mediante el bloqueo físico de un dominio de unión, o mediante la alteración de la estructura o del entorno de un dominio de unión, de forma que su afinidad o avidez por una diana se reduce.

Como se utiliza en el presente documento, el término "péptido" se refiere a un compuesto que consiste en de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 restos de aminoácido, en el que el grupo amino de un aminoácido está ligado al grupo carboxilo de otro aminoácido mediante un enlace peptídico. Tales péptidos habitualmente son de menos de aproximadamente 100 restos de aminoácidos de longitud y preferentemente son de aproximadamente 10,

aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40 o aproximadamente 50 restos.

Las expresiones "carcinoma hepatocelular", "CHC" y "hepatoma" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse al cáncer que surge en los hepatocitos, el tipo celular principal del hígado.

5 Como se define en el presente documento, "terapia" es la administración de un agente terapéutico o profiláctico particular a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, un ser humano), que como resultado da un beneficio terapéutico o profiláctico deseado en el sujeto.

10 Como se define en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado en las condiciones de administración, tal como una cantidad suficiente para inhibir (por ejemplo, reducir, prevenir) la formación tumoral, el crecimiento tumoral (proliferación, tamaño), la vascularización tumoral y/o la evolución tumoral (invasión, metástasis) en el hígado de un paciente con CHC. La eficacia de una terapia (por ejemplo, la reducción/eliminación de un tumor y/o la prevención del crecimiento tumoral) puede determinarse mediante cualquier procedimiento adecuado (por ejemplo, inmunohistoquímica *in situ*, formación de imágenes (ultrasonido, tomografía computarizada, MRI, NMR), incorporación de ³H-timidina).

15 Como se define en el presente documento, un "régimen de tratamiento" es un régimen en el que se administran uno o más agentes terapéuticos o profilácticos a un sujeto mamífero a una dosis particular (por ejemplo, concentración, cantidad) y en un programa particular o a intervalos particulares (por ejemplo, minutos, días, semanas, meses).

20 Como se utiliza en el presente documento, un "sujeto" se refiere a un sujeto mamífero. La expresión "sujeto mamífero" se define en el presente documento para incluir mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, de roedor o murinas. Los ejemplos de sujetos adecuados incluyen, pero sin limitación, pacientes humanos que tienen, o están en riesgo de desarrollar, CHC. Los ejemplos de grupos de alto riesgo para el desarrollo de CHC incluyen individuos con infección por hepatitis crónica (hepatitis B, hepatitis C) e individuos que tienen cirrosis del hígado o afecciones hepáticas relacionadas.

25 Los términos "prevenir", "que previene" o "prevención", como se utilizan en el presente documento, significan reducir la probabilidad/verosimilitud o el riesgo de formación o evolución de un tumor de CHC en un sujeto, el retraso del inicio de una afección relacionada con el CHC en un sujeto, la reducción de la gravedad de uno o más síntomas de una afección relacionada con CHC en el sujeto o cualquier combinación de los mismos. En general, el sujeto de un régimen preventivo muy probablemente será categorizado como que está "en riesgo", por ejemplo, el riesgo del sujeto de desarrollar CHC es mayor que el riesgo de un sujeto representado por la población de referencia relevante.

30 Como se utiliza en el presente documento, los términos "trata", "que trata" o "tratamiento" significan contrarrestar una afección médica (por ejemplo, una afección relacionada con el CHC) hasta el punto en que se mejora la afección médica de acuerdo con un pauta clínicamente aceptable (por ejemplo, número y/o tamaño reducido de tumores de CHC en el hígado de un sujeto).

35 Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "rigurosidad baja", "rigurosidad media", "rigurosidad alta" o "condiciones de rigurosidad muy alta" describen condiciones para la hibridación y el lavado de ácidos nucleicos. La directriz para realizar reacciones de hibridación puede encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

40 En esa referencia se describen procedimientos acuosos y no acuosos, y puede utilizarse cualquiera. Las condiciones de hibridación específicas a las que se hace referencia en el presente documento son como sigue: (1) condiciones de hibridación de rigurosidad baja en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6X a aproximadamente 45 °C, seguido de dos lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1 % al menos a 50 °C (la temperatura de los lavados puede aumentarse hasta 55 °C para las condiciones de rigurosidad baja); (2) condiciones de hibridación de rigurosidad media en SSC 6X a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1 % a 60 °C; (3) condiciones de hibridación de rigurosidad alta en SSC 6X a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1 % a 65 °C y, preferentemente, (4) las condiciones de hibridación de rigurosidad muy alta son fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7 % a 65 °C, seguido de uno o más lavados con SSC 0,2X, SDS al 1 % a 65 °C. Las condiciones de rigurosidad muy alta (4) son las condiciones preferentes y las que deberían utilizarse a menos que se especifique otra cosa.

50 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado, como entiende habitualmente un experto en la materia (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Para los procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase, en general, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel y col. Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª Ed, John Wiley y Sons, Inc.), y para los procedimientos químicos, se utilizan las técnicas convencionales.

PLVAP

La proteína asociada a vesículas de membrana plasmática (PLVAP), también conocida como PV1, es un tipo de

glicoproteína integral de membrana de tipo II cuya expresión se restringe a determinadas células endoteliales vasculares (Mol Biol Cell 15: 3615-3630 (2004)). La PLVAP ha mostrado ser un componente estructural clave de los diafragmas fenestrados y estomáticos del endotelio fenestrado, en la referencia anterior. Además, la expresión de PLVAP es necesaria para la formación de los diafragmas fenestrados endoteliales y puede estar implicada en la modulación de la permeabilidad y el transporte endoteliales (Am J Physiol Heart Circ Physiol 286: H1347-1353, 2004). Se ha descrito la organización genómica del gen de PLVAP humano (Stan RV, Arden KC, Palade GE. cDNA and protein sequence, genomic organization, and analysis of cis regulatory elements of mouse and human PLVAP genes. Genomics 72: 304-313, 2001).

Como se describe en el presente documento, los inventores han demostrado que la expresión génica de PLVAP es significativamente elevada en tejidos de carcinoma hepatocelular, con respecto a los tejidos no tumorales adyacentes en el hígado de pacientes humanos con CHC. Además, los presentes inventores han determinado que la proteína PLVAP se expresa principalmente en, y se emplaza en, células endoteliales vasculares que rodean a o dentro de los tumores de CHC, pero que no se expresan en, o se emplazan en, células asociadas con otras patologías del hígado. Por consiguiente, PLVAP representa una nueva diana para el diagnóstico y el tratamiento del CHC

Terapia

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del carcinoma hepatocelular (CHC) en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, en el que el anticuerpo inhibe la formación, el crecimiento, la vascularización y/o la evolución de uno o más tumores de CHC en el hígado del sujeto.

Puede administrarse a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de PLVAP, para inhibir el crecimiento tumoral y destruir células tumorales. Por ejemplo, los agentes que inhiben de forma directa el crecimiento tumoral (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos) se administran de forma convencional en un programa de dosificación y una concentración particulares para lograr la terapia más eficaz (por ejemplo, para destruir mejor a las células tumorales). En general, se administra aproximadamente la dosis máxima tolerada durante un período de tratamiento relativamente corto (por ejemplo, uno a varios días), lo que está seguido de un período sin terapia. En un ejemplo particular se administran tres dosis de ciclofosfamida quimioterapéutica a una dosis máxima tolerada de 150 mg/kg en días alternos, con un segundo ciclo proporcionado 21 días después del primer ciclo. (Browder y col., Can Res 60: 1878-1888, 2000).

Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de PLVAP (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes), por ejemplo en un primer ciclo en el que aproximadamente la dosis máxima tolerada del antagonista se administra en un intervalo/dosis, o en varios intervalos espaciados de forma estrecha (minutos, horas, días), con otro/un segundo ciclo administrado después de un periodo sin terapia adecuado (por ejemplo, una o más semanas). Un médico clínico con la experiencia habitual puede determinar fácilmente los programas de dosificación y cantidades adecuados para un antagonista de PLVAP. La toxicidad disminuida de un antagonista de PLVAP particular, en comparación con los agentes quimioterapéuticos, puede permitir que el tiempo entre los ciclos de administración sea más corto. Cuando se utiliza como una terapia adyuvante (con, por ejemplo, cirugía, radioterapia, otras terapias primarias), se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de PLVAP preferentemente en un programa de dosificación que es similar al de otra terapia para el cáncer (por ejemplo, quimioterapéuticos), o en un programa de dosificación que determina el médico clínico experto como más/el más eficaz en la inhibición (reducción, prevención) del crecimiento tumoral. Un régimen de tratamiento para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de PLVAP puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal por tratamiento, y preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg cada 1 a 7 días, durante de un periodo de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 meses.

Un antagonista de PLVAP puede administrarse en un régimen de dosificación metronómico, mediante el cual se administra una dosis más baja de forma más frecuente con respecto a la dosificación máxima tolerada. Varios estudios preclínicos han demostrado la eficacia antitumoral superior, efectos antiangiogénicos potentes, y toxicidad y efectos secundarios reducidos (por ejemplo, mielosupresión) de los regímenes metronómicos en comparación con las contrapartes de dosis máxima tolerada (DMT) (Bocci, y col., Cancer Res, 62: 6938-6943, (2002); Bocci, y col., Proc. Natl Acad. Sci, 100(22): 12917-12922, (2003) y Bertolini, y col., Cancer Res, 63(15): 4342-4346, (2003)). La quimioterapia metronómica parece ser eficaz en la superación de algunas de las limitaciones asociadas a la quimioterapia.

Un antagonista de PLVAP puede administrarse en un régimen de dosificación metronómico para inhibir (reducir, prevenir) la angiogénesis en un paciente que lo necesite, como parte de una terapia antiangiogénica. Tal terapia antiangiogénica puede afectar de forma indirecta (inhibir, reducir) el crecimiento tumoral, bloqueando la formación de nuevos vasos sanguíneos que suministran a los tumores los nutrientes necesarios para sustentar el crecimiento tumoral y permiten que los tumores metastaticen. Restringir el suministro de nutrientes y de sangre al tumor de esta manera puede provocar, eventualmente, que las células del tumor mueran por necrosis y/o apoptosis. Trabajos anteriores han indicado que los resultados clínicos (la inhibición de la angiogénesis tumoral mediada por células

endoteliales y del crecimiento tumoral) de las terapias contra el cáncer que implican el bloqueo de factores angiogénicos (por ejemplo, VEGF, bFGF, TGF- α , IL-8, PDGF) o su señalización han sido más eficaces cuando se administran de forma más frecuente niveles de dosificación más bajos, proporcionando una concentración sanguínea continua del agente antiangiogénico. (Véase, Browder y col., Can. Res. 60: 1878 - 1888, Folkman J., Sem. Can. Biol., 13: 159-167, 2003). Se ha utilizado un régimen de tratamiento antiangiogénico con un inhibidor de angiogénesis dirigido (trombospondina 1 y factor de crecimiento plaquetario 4 (TNP-470)) y el agente quimioterapéutico ciclofosfamida. Cada 6 días se administró TNP-470 a una dosis inferior a la dosis máxima tolerada y la ciclofosfamida se administró a una dosis de 170 mg/kg. En la referencia anterior. Este régimen de tratamiento dio como resultado una remisión completa de los tumores. En la referencia anterior. De hecho, los tratamientos antiangiogénicos son más eficaces cuando se administran junto con otros agentes terapéuticos antineoplásicos, por ejemplo, los agentes que inhiben de forma directa el crecimiento tumoral (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos). En la referencia anterior.

Los usos terapéuticos descritos en el presente documento comprenden la administración a un sujeto de un antagonista de PLVAP, el cual es el anticuerpo definido. El antagonista de PLVAP puede administrarse al individuo que lo necesite como una terapia primaria (por ejemplo, como el agente terapéutico principal en una terapia o régimen de tratamiento); como una terapia complementaria (por ejemplo, como un agente terapéutico utilizado junto con otro agente terapéutico en una terapia o régimen de tratamiento, en el que la combinación de agentes terapéuticos proporciona el tratamiento deseado; "terapia complementaria" también se denomina como "terapia auxiliar"); en combinación con una terapia complementaria, como una terapia adyuvante (por ejemplo, como un agente terapéutico que se proporciona al sujeto que lo necesite después de que se haya proporcionado el agente terapéutico primario en una terapia o régimen de tratamiento) o en combinación con una terapia adyuvante (por ejemplo, quimioterapia (por ejemplo, tamoxifeno, cisplatino, mitomicina, 5-fluorouracilo, doxorubicina, sorafenib, octreotide, dacarbazina (DTIC), cis-platino, cimetidina, ciclofosfamida), radioterapia (por ejemplo, terapia de protones), terapia hormonal (por ejemplo, terapia antiestrogénica, terapia de privación de andrógenos (TPA), agonistas de la hormona de liberación de la hormona luteinizante (LH-RH), inhibidores de la aromatasa (los IA, tal como anastrozol, exemestano, letrozol), moduladores de los receptores de estrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, toremifeno)), o terapia biológica). Durante el régimen de tratamiento del cáncer también pueden administrarse numerosas otras terapias para mitigar los efectos de la enfermedad y/o los efectos secundarios del tratamiento para el cáncer, que incluyen terapias para tratar el dolor (narcóticos, acupuntura), molestias gástricas (antiácidos), mareos (medicaciones anti vértigo), náuseas, (medicamentos anti náuseas), infección (por ejemplo, medicamentos para aumentar el recuento de glóbulos rojos/leucocitos) y similares, todo lo cual valorará fácilmente el experto en la materia.

Por lo tanto, un antagonista de PLVAP puede administrarse como una terapia adyuvante (por ejemplo, con otra terapia o tratamiento primario del cáncer). Como terapia adyuvante, el antagonista de PLVAP puede administrarse antes, después o de forma conjunta con una terapia primaria como radiación y/o la extirpación quirúrgica de un tumor (o tumores). En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de PLVAP y una o más de otras terapias (por ejemplo, terapias adyuvantes, otras terapias dirigidas). Una terapia adyuvante (por ejemplo, un agente quimioterapéutico) y/o la una o más de otras terapias dirigidas para el CHC, y el antagonista de PLVAP, pueden coadministrarse de forma simultánea (por ejemplo, de forma conjunta) ya sea como formulaciones separadas o como una formulación conjunta. Como alternativa, las terapias pueden administrarse de forma secuencial, como composiciones distintas, dentro de un periodo de tiempo apropiado (por ejemplo, una sesión de tratamiento para el cáncer/intervalo, tal como 1,5 a 5 horas) según lo determinado por el experto clínico (por ejemplo, un tiempo suficiente para permitir un solapamiento de los efectos farmacéuticos de las terapias). La terapia adyuvante y/o una o más de otras terapias dirigidas para el CHC y el antagonista de PLVAP pueden administrarse en una dosis única o en múltiples dosis en un orden y en un esquema adecuados para lograr un efecto terapéutico deseado (por ejemplo, la inhibición del crecimiento tumoral, la inhibición de la angiogénesis y/o la inhibición de la metástasis del cáncer).

Pueden administrarse uno o más anticuerpos que son antagonistas de PLVAP en dosis únicas o múltiples. Un médico clínico puede determinar la dosificación y los regímenes de administración adecuados, y dependen del agente (o agentes) elegido, la formulación farmacéutica y la vía de administración, de diversos factores del paciente y de otras consideraciones. Con respecto a la administración de un antagonista de PLVAP con una o más de otras terapias o tratamientos (adyuvante, dirigido, asociado al tratamiento para el cáncer y similares), el antagonista de PLVAP se administra normalmente como una dosis única (mediante, por ejemplo, inyección, infusión, vía oral), seguido de dosis repetidas a intervalos particulares (por ejemplo, una o más horas) si se desea o indica.

La cantidad de antagonista de PLVAP a administrar (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz) puede determinarla un médico clínico utilizando la directriz proporcionada en el presente documento y otros procedimientos conocidos en la técnica, y depende de varios factores que incluyen, por ejemplo, el agente particular elegido, la edad del sujeto, la sensibilidad, la tolerancia a fármacos y el bienestar global. Las dosificaciones adecuadas de los anticuerpos puede ser de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal por tratamiento y preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por tratamiento. La determinación de la dosificación para un agente, paciente y cáncer particulares está dentro de las capacidades de un experto en la materia. Preferentemente, la dosificación no provoca o produce efectos secundarios adversos mínimos (por ejemplo, respuesta inmunogénica, náuseas, mareos, desorden gástrico, síndromes de hiperviscosidad, insuficiencia cardíaca congestiva, ictus, edema pulmonar).

Procedimientos de administración

Para tratar el CHC se administra a un sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, tal como un anticuerpo marcado con un isótopo radiactivo.

Puede utilizarse una diversidad de vías de administración que incluyen, por ejemplo, las vías de administración oral, alimentaria, tópica, transdérmica, rectal, parenteral (por ejemplo, intrarterial, intravenosa, intramuscular, inyección subcutánea, inyección intradérmica), infusión intravenosa e inhalación (por ejemplo, inhalación intrabronquial, intranasal u oral, gotas intranasales), dependiendo del agente y del cáncer particular a tratar. La administración puede ser local o sistémica según se indique. El modo preferente de administración puede variar dependiendo del agente particular elegido; sin embargo, para tratar el carcinoma hepatocelular en general es preferente la administración intrarterial (por ejemplo, infusión arterial hepática, quimioembolización transarterial (QET)) para administrar anticuerpos de acuerdo con la invención, tales como anticuerpos de la invención marcados con un isótopo radiactivo.

Por ejemplo, utilizando la infusión arterial hepática, los anticuerpos contra PLVAP, tales como anticuerpos contra PLVAP marcados con isótopo radiactivo

pueden administrarse de forma directa a un tumor de CHC a través de la arteria hepática, por ejemplo, durante el tratamiento del CHC habitual por QET (Camma, y col. *Radiology* 224: 47-54, 2002; Befeler, y col. *Clinics in Liver Disease* 9: 287-300, 2005; Abou-Alfa *JAMA* 299: 1716-1718, 2008). Este procedimiento se realiza con la ayuda de la formación de imágenes por radioscopia (un tipo de rayos x). Brevemente, se inserta un catéter en la arteria femoral de la ingle y se introduce en la aorta. Desde la aorta el catéter se hace avanzar en la arteria hepática o sus ramas. Una vez que las ramas de la arteria hepática que alimentan al cáncer de hígado se identifican, se infunde la quimioterapia. Un radiólogo intervencionista, quien habitualmente lleva a cabo este procedimiento, puede determinar la cantidad de quimioterapia que un paciente recibe en cada sesión. Algunos pacientes pueden someterse a sesiones repetidas a intervalos de 6 a 12 semanas. Los estudios de formación de imágenes del hígado se repiten a las seis a 12 semanas para evaluar el tamaño del tumor en respuesta al tratamiento.

Como alternativa, puede utilizarse para administrar anticuerpos a un sujeto que lo necesite la quimioembolización transarterial (QET), un procedimiento que es similar a la infusión intrarterial. En la QET, la infusión intrarterial de un agente terapéutico se combina con la etapa adicional de bloqueo (es decir, embolización) de los vasos sanguíneos pequeños con compuestos bloqueantes, tales como gelfoam, emulsión oleosa o incluso pequeños espirales metálicos. Por lo tanto, la QET tiene las posibles ventajas de exponer el tumor a altas concentraciones de quimioterapia y de confinar los agentes de forma local para prevenir o reducir que el torrente sanguíneo los arrastre. Al mismo tiempo, la QET priva al tumor del necesario suministro sanguíneo, lo que puede dar como resultado el daño o la muerte de las células tumorales.

Para la administración intrarterial de anticuerpos contra PLVAP, es preferente utilizar anticuerpos que tengan altas afinidades por PLVAP (por ejemplo, una K_d menor que 10^{-7} M), de forma que los anticuerpos infundidos se concentren en los vasos sanguíneos del CHC. Se espera que los anticuerpos quiméricos y humanizados tengan semividas en la circulación de hasta cuatro y hasta 14-21 días, respectivamente. En una realización particular, la alta afinidad de los anticuerpos contra PLVAP (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno, anticuerpos monocatenarios) con semividas en circulación cortas (por ejemplo, aproximadamente 1 día a aproximadamente 5 días, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 días) se administran a un paciente para reducir cualquier toxicidad y otros efectos secundarios adversos que resulten de su administración. En otra realización, los anticuerpos contra PLVAP de alta afinidad con semividas en circulación prolongadas (por ejemplo, aproximadamente 5 días a aproximadamente 24 días) se administran a un paciente para tratar el CHC.

En muchos casos, será preferente administrar una dosis de carga grande seguida de dosis de mantenimiento periódicas (por ejemplo, de forma semanal) a lo largo del período de tratamiento. Los anticuerpos también pueden entregarse mediante sistemas de entrega de liberación retardada, bombas y otros sistemas de entrega conocidos para la infusión continua en el CHC. Los regímenes de dosificación pueden variarse para proporcionar las concentraciones deseadas en la circulación de un anticuerpo particular, a base de su farmacocinética. Por lo tanto, las dosis se calcularán de forma que la concentración terapéutica deseado se mantenga.

El médico determinará la dosis y el régimen de tratamiento reales, teniendo en cuenta la naturaleza del cáncer (primario o metastásico), el número y el tamaño de los tumores, las otras terapias y las características del paciente. En vista de la naturaleza potencialmente mortal del carcinoma hepatocelular, pueden emplearse dosis grandes con efectos secundarios significativos. Además, también puede incorporarse un ácido nucleico que codifica el polipéptido en vectores retrovíricos, adenovíricos u otros vectores adecuados para el suministro (preferentemente, un vector infeccioso deficiente en la replicación), o puede introducirse en una célula hospedadora transfectada o transformada capaz de expresar el polipéptido para el suministro. En la última realización, las células pueden implantarse (solas o en un dispositivo de barrera), inyectarse o introducirse de otra manera en una cantidad eficaz para expresar el polipéptido en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Usos diagnósticos y pronósticos

Se describen usos diagnósticos y pronósticos que comprenden la evaluación de la expresión de PLVAP en una

muestra (por ejemplo, biopsia de hígado, muestra de biopsia aspirativa con aguja fina) de un sujeto mamífero (por ejemplo, un sujeto mamífero que tiene un tumor de hígado). Para los usos diagnósticos de la invención, la expresión de PLVAP en la muestra o la expresión aumentada de PLVAP en la muestra con respecto a un control adecuado, indica que el sujeto tiene CHC y/o que el sujeto es candidato para una terapia antineoplásica utilizando un antagonista de PLVAP.

Para procedimientos pronósticos, la expresión de PLVAP en una muestra de un sujeto o la expresión aumentada de PLVAP en una muestra con respecto a un control adecuado, indica un mal pronóstico. El pronóstico puede ser un pronóstico de supervivencia del paciente, un pronóstico de riesgo de metástasis y/o un pronóstico de riesgo de recaída.

Las muestras adecuadas para estos procedimientos incluyen una muestra de tejido, una muestra de fluido biológico, una muestra de una célula (o células) (por ejemplo una célula tumoral) y similares. Puede utilizarse para obtener una muestra de un sujeto cualquier medio de muestreo, por ejemplo, mediante extracción de sangre, punción lumbar, frotis o raspado de tejidos, o biopsia de tejidos. Por lo tanto, la muestra puede ser una pieza de biopsia (por ejemplo, tumor, pólipo, masa (sólida, celular)), muestra de aspiración, frotis o de sangre. La muestra puede ser un tejido de un hígado que tiene un tumor (por ejemplo, crecimiento canceroso) y/o células tumorales, o que se sospecha que tiene un tumor y/o células tumorales. Por ejemplo, puede obtenerse una biopsia de tumor en una biopsia abierta, un procedimiento en el cual se extrae una masa completa (biopsia por escisión) o parcial (biopsia por incisión) de un área diana. Como alternativa, puede obtenerse una muestra de tumor a través de una biopsia por punción, un procedimiento realizado con un instrumento similar a una aguja a través de una pequeña incisión o punción (con o sin la ayuda de un dispositivo de formación de imágenes) para obtener células individuales o grupos de células (por ejemplo, aspiración con aguja fina (AAF)), o el cuerpo o un fragmento de tejidos (biopsia con aguja gruesa). Las muestras de biopsia pueden examinarse de forma citológica (por ejemplo, frotis), de forma histológica (por ejemplo, cortes congelados o de parafina) o utilizando cualquier otro procedimiento adecuado (por ejemplo, procedimientos de diagnóstico molecular). También puede obtenerse una muestra de tumor mediante la recogida *in vitro* de células humanas cultivadas obtenidas del tejido de un individuo. Las muestras de tumor pueden, si se desea, almacenarse antes del análisis mediante medios de almacenamiento adecuados que conserven las proteínas y/o los ácidos nucleicos de la muestra en un estado que permita el análisis, tal como la congelación rápida o un régimen de congelación controlado. Si se desea, puede realizarse la congelación en presencia de un crioprotector, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol o propanodiol-sacarosa. Antes o después del almacenamiento las muestras de tumor pueden agruparse, según sea apropiado, para fines de análisis. La muestra de tumor puede ser de un paciente que tiene un cáncer de hígado, por ejemplo, carcinoma hepatocelular.

Los ensayos adecuados que pueden utilizarse para evaluar la presencia o cantidad de PLVAP en una muestra (por ejemplo, muestra biológica) son conocidos por los expertos en la materia. Los procedimientos para detectar una proteína o péptido PLVAP incluyen procedimientos inmunológicos e immunoquímicos como citometría de flujo (por ejemplo análisis por FACS), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), incluyendo ensayos de quimioluminiscencia, radioinmunoensayo, inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia de Western), inmunohistoquímica (IHQ) y otros procedimientos cuantitativos basados en anticuerpos (por ejemplo, ensayos basados en perlas Luminex®). Otros procedimientos adecuados incluyen, por ejemplo, espectroscopía de masas. Por ejemplo, los anticuerpos contra PLVAP pueden utilizarse para determinar la presencia y/o el nivel de expresión de PLVAP en una muestra de forma directa o indirecta utilizando, por ejemplo, inmunohistoquímica (IHQ). Por ejemplo, pueden tomarse cortes de parafina de una biopsia, fijarlos en un portaobjetos y combinarlos con uno o más anticuerpos mediante procedimientos adecuados. En una realización particular, la detección de la proteína PLVAP en células endoteliales vasculares que rodean a hepatocitos en una muestra es indicativa de CHC.

En el Ejemplo 9 en el presente documento se describe un ensayo de ELISA ejemplar para su uso en las aplicaciones diagnósticas y pronósticas de la invención.

Los procedimientos para detectar la expresión génica de PLVAP incluyen la amplificación y/o visualización de ácidos nucleicos de PLVAP. Para detectar la expresión génica de PLVAP, puede aislarse un ácido nucleico de un individuo mediante procedimientos adecuados que son habituales en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989). Después puede amplificarse el ácido nucleico aislado (mediante, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (por ejemplo, PCR directa, PCR en tiempo real cuantitativa, transcripción inversa-PCR), reacción en cadena de la ligasa, autorreplicación de secuencia, sistema de amplificación transcripcional, Replicasa Q-Beta o similar) y visualizarse (mediante por ejemplo, marcaje del ácido nucleico durante la amplificación, exposición a compuestos intercalantes/colorantes, sondas). También puede detectarse el ARN de PLVAP (por ejemplo, el ARNm) o la expresión del mismo utilizando una sonda de ácido nucleico, por ejemplo una sonda de ácido nucleico marcada (por ejemplo, hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)), de forma directa en un corte de parafina o una muestra de tejido tomada de, por ejemplo, una biopsia de tumor, o utilizando otros procedimientos adecuados. La expresión génica de PLVAP de la misma también puede evaluarse mediante transferencia de Southern o en solución (por ejemplo, colorantes, sondas). Adicionalmente, puede utilizarse para detectar la expresión y/o la expresión diferencial de un producto del gen de PLVAP un chip génico, una micromatriz, una sonda (por ejemplo, puntos cuánticos) u otro dispositivo de este tipo (por ejemplo, sensor, nanosensor/detector).

Un carcinoma hepatocelular puede diagnosticarse detectando la expresión de un producto del gen de PLVAP (por ejemplo, ARNm de PLVAP, proteína PLVAP) en una muestra de un paciente. Por lo tanto, el procedimiento no requiere

que la expresión de PLVAP en la muestra del paciente se compare con la expresión de PLVAP en un control. La presencia o ausencia de PLVAP puede determinarse mediante los procedimientos descritos en el presente documento u otros ensayos adecuados. Un aumento de la expresión de PLVAP puede determinarse mediante la comparación de la expresión de PLVAP en la muestra con la de un control adecuado. Los controles adecuados incluyen, por ejemplo, una muestra de tejido no neoplásico del individuo, células no cancerosas, células cancerosas no metastásicas, células no malignas (benignas) o similar, o un patrón de referencia conocido o determinado adecuado. El patrón de referencia puede ser un intervalo o nivel típico, normal o normalizado de expresión de una proteína o ARN de PLVAP (por ejemplo, un patrón de expresión). Por lo tanto, los procedimientos no requieren que la expresión del gen/proteína sea evaluada en un control adecuado.

Un carcinoma hepatocelular puede diagnosticarse detectando el número de copias del gen de PLVAP en una muestra de un paciente. Por ejemplo, un número de copias del gen de PLVAP que es mayor que dos (por ejemplo, un número de copias del gen de 3 o 4) puede ser diagnóstico de CHC. Normalmente, una célula humana normal tendrá un número de copias del gen de PLVAP de dos. Por lo tanto, un diagnóstico a base del número de copias del gen de PLVAP no requiere la detección del número de copias del gen de PLVAP en una muestra de control del paciente, aunque puede utilizarse un control. Los controles adecuados incluyen, por ejemplo, una muestra de tejido no neoplásico procedente del individuo, células no cancerosas, células cancerosas no metastásicas, células no malignas (benignas) o similar, o un patrón de referencia conocido o determinado adecuado (por ejemplo, un número de copias del gen de PLVAP de dos). El número de copias del gen de PLVAP en una muestra de un paciente puede determinarse mediante técnicas adecuadas, tales como, por ejemplo, hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH).

Anticuerpos contra PLVAP

Como se describe en el presente documento, los anticuerpos que se unen a PLVAP tienen utilidad en el diagnóstico y el tratamiento del CHC en sujetos humanos. Por ejemplo, pueden utilizarse los anticuerpos que se unen de forma específica a PLVAP para detectar la presencia de PLVAP en células endoteliales capilares de carcinoma hepatocelular en muestras de ensayo de biopsias con aguja gruesa de hígado o de aspirados con aguja fina mediante tinción inmunohistoquímica (IHQ). Además, los anticuerpos humanizados contra PLVAP pueden marcarse con un indicador apropiado (por ejemplo, radioisótopo) para inmunotomografía por emisión de positrones (inmuno-PET) (Clin Cancer Res 12: 1958-1960, 2006; Clin Cancer Res. 12: 2133-2140, 2006) para determinar si una lesión (o lesiones) que ocupa espacio en el hígado de un sujeto es carcinoma hepatocelular. Los anticuerpos anti PLVAP que son anticuerpos humanizados también pueden marcarse con un agente citotóxico (radioactivo o no radioactivo) para fines terapéuticos (Weiner LM, Adams GP, Von Mehren M. Therapeutic monoclonal antibodies: General principles. En: Cancer: Principles & Practice of Oncology. 6ª ed. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Filadelfia: Lippincott Williams y Wilkins; 2001: 495-508; Levinson W, Jawetz E. Medical Microbiology & Immunology. 4ª ed. Stamford: Appleton y Lange; 1996: 307-47; Scheinberg DA, Sgouros G, Junghans RP. Antibody-based immunotherapies for cancer. En: Cancer Chemotherapy & Biotherapy: Principles and Practice. 3ª ed. Chabner BA, Longo DL, eds. Filadelfia: Lippincott Williams y Wilkins; 2001: 850-82).

Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo que se une de forma específica a una proteína PLVAP que es una proteína PLVAP humana (SEQ ID NO:23). Los anticuerpos que se unen de forma específica a una proteína PLVAP son humanizados, así como los fragmentos de tales anticuerpos (por ejemplo, Fv, Fc, Fd, Fab, Fab', F(ab'), scFv, scFab, dAb), entre otros. (Véase, por ejemplo, Harlow y col., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos que se unen de forma específica a una proteína PLVAP pueden producirse, construirse, modificarse por ingeniería genética y/o aislarse mediante procedimientos convencionales u otras técnicas adecuadas. Por ejemplo, los anticuerpos que son específicos para una proteína PLVAP pueden generarse frente a un inmunógeno apropiado, tal como una proteína PLVAP de mamífero recombinante (por ejemplo, humana) (por ejemplo, SEQ ID NO:23) o una parte de la misma (por ejemplo, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40) (incluyendo moléculas sintéticas, por ejemplo, péptidos sintéticos). Se han descrito una diversidad de tales procedimientos de inmunización (véase, por ejemplo, Kohler y col., Nature, 256: 495-497 (1975) y Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976); Milstein y col., Nature 266: 550-552 (1977); Koprowski y col., Patente de Estados Unidos n.º 4.172.124; Harlow, E. y D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2 (Suplemento 27, Verano de 1994), Ausubel, F. M. y col., Eds., (John Wiley y Sons: Nueva York, NY), Capítulo 11, (1991)). Los anticuerpos también pueden generarse inmunizando un hospedador adecuado (por ejemplo, ratón) con células que expresan PLVAP (por ejemplo, células/líneas celulares cancerosas) o células modificadas por ingeniería genética para expresar PLVAP (por ejemplo, células transfectadas). (Véase, por ejemplo, Chuntharapai y col., J. Immunol., 152: 1783-1789 (1994), Chuntharapai y col., Patente de Estados Unidos n.º 5.440.021).

En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando el título de anticuerpos es el más alto, pueden obtenerse del animal inmunizado células que producen anticuerpos y utilizarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, tales como la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497, 1975), la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor y col., Immunol. Today 4: 72, 1983), la técnica del hibridoma de VEB (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96, 1985) o las técnicas del trioma. La tecnología de producción de hibridomas es bien conocida (véase en general, Current Protocols in Immunology, Coligan y col., (Eds.) John Wiley y Sons, Inc., Nueva York, NY, 1994). Brevemente, se fusiona una línea celular celular inmortal (normalmente un mieloma) con linfocitos (normalmente

esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno, como se describe anteriormente, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se exploran para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a un polipéptido descrito en el presente documento.

Pueden aplicarse para el fin de la generar un anticuerpo monoclonal contra un polipéptido de la invención cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos utilizados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, citado anteriormente; Galfre y col., *Nature*, 266: 55052, 1977, RH Kenneth, in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyse*, Plenum Publishing Corp., Nueva York, Nueva York, 1980 y Lerner, *Yale J. Biol. Med.* 54: 387-402, 1981). Además, el técnico con la experiencia habitual apreciará que existen muchas variaciones de tales procedimientos que también pueden ser útiles.

En una alternativa para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, puede identificarse un anticuerpo monoclonal contra una proteína PLVAP y aislarse mediante exploración de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación de anticuerpos en fagos) con el polipéptido diana para, de este modo, aislar los miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen al polipéptido. Están disponibles de forma comercial kits para generar y explorar bibliotecas de presentación en fagos (por ejemplo, el sistema Pharmacia Recombinant Phage Antibody, n.º de Catálogo 27-9400-01 y el Kit de Stratagene SurfZAP™ Phage Display, n.º de Catálogo 240612). De forma adicional, los ejemplos de procedimientos y reactivos particularmente susceptibles de uso en la generación y exploración de bibliotecas de presentación de anticuerpos pueden encontrarse en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.223.409; la Publicación PCT n.º WO 92/18619; la Publicación PCT n.º WO 91/17271; la Publicación PCT n.º WO 92/20791; la Publicación PCT n.º WO 92/15679; la Publicación PCT n.º WO 93/01288; la Publicación PCT n.º WO 92/01047; la Publicación PCT n.º WO 92/09690; la Publicación PCT n.º WO 90/02809; Fuchs y col., *Bio/Technology* 9: 1370-1372, 1991; Hay y col., *Hum. Anticuerpos Hybridomas* 3: 81-85, 1992; Huse y col., *Science* 246: 1275-1281, 1989 y Griffiths y col., *EMBO J.* 12: 725-734, 1993.

Los fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) pueden producirse por escisión enzimática o por técnicas recombinantes. Por ejemplo, la escisión con papaína o pepsina puede generar fragmentos respectivamente Fab o F(ab')₂. También pueden utilizarse para generar fragmentos Fab o F(ab')₂ otras proteasas, con el requisito de la especificidad de sustrato.

También pueden producirse anticuerpos en una diversidad de formas truncadas utilizando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de terminación cadena arriba del sitio de terminación natural. Por ejemplo, puede diseñarse un gen quimérico que codifica una parte de la cadena pesada de F(ab')₂ para que incluya secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena pesada.

Los anticuerpos humanizados están abarcados por el término "anticuerpo". Las diversas partes de estos anticuerpos pueden unirse de forma química mediante técnicas convencionales o pueden prepararse como proteínas contiguas utilizando técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, pueden expresarse ácidos nucleicos que codifican una cadena humanizada para producir una proteína contigua. Véase, por ejemplo, Cabilly y col., Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Cabilly y col., Patente Europea n.º 0.125.023 B1; Boss y col., Patente de Estados Unidos n.º 4.816.397; Boss y col., Patente Europea n.º 0.120.694 B1; Neuberger, M. S. y col., documento WO 86/01533; Neuberger, M. S. y col., Patente Europea n.º 0.194.276 B1; Winter, Patente de Estados Unidos n.º 5.225.539; Winter, Patente Europea n.º 0.239.400 B1; Queen y col., Patente Europea n.º 0 451 216 B1 y Padlan, E. A. y col., documento EP 0 519 596 A1. Véase también Newman, R. y col., *BioTechnology*, 10: 1455-1460 (1992), con respecto al anticuerpo primatizado, y Ladner y col., Patente de Estados Unidos n.º 4.946.778 y Bird, R. E. y col., *Science*, 242: 423-426 (1988)), con respecto a anticuerpos monocatenarios.

La invención se refiere a anticuerpos humanizados que se unen de forma específica a PLVAP, la cual es una proteína PLVAP humana que comprende la SEQ ID NO:23. Dichos anticuerpos humanizados comprenden al menos una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84 y SEQ ID NO:86, y al menos una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90 y SEQ ID NO:92

Los anticuerpos humanizados pueden producirse utilizando la tecnología de ADN sintético o recombinante utilizando procedimientos convencionales y otras técnicas adecuadas. Las secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ADNc) que codifican las regiones variables humanizadas también pueden construirse utilizando procedimientos de mutagénesis por PCR, para modificar las secuencias de ADN que codifican una cadena humana o humanizada, tal como un molde de ADN de una región variable previamente humanizada (véase, por ejemplo, Kamman, M. y col., *Nucl. Acids Res.*, 17: 5404 (1989)); Sato, K., y col., *Cancer Research*, 53: 851-856 (1993); Daugherty, B. L. y col., *Nucleic Acids Res.*, 19(9): 2471-2476 (1991) y Lewis, A. P. y J. S. Crowe, *Gene*, 101: 297-302 (1991)). También pueden producirse fácilmente variantes utilizando estos y otros procedimientos adecuados. En una realización pueden mutarse las regiones variables clonadas (por ejemplo, los dAb) y pueden seleccionarse las secuencias que codifican variantes con la especificidad deseada (por ejemplo, a partir de una biblioteca en fagos; véase, por ejemplo, Krebber y col., documento U.S. 5.514.548; Hoogenboom y col., documento WO 93/06213, publicado el 1 de abril de 1993).

Los anticuerpos humanizados también pueden producirse mediante, y/u obtenerse de, fuentes comerciales

incluyendo, por ejemplo, Antitope Limited (Cambridge, RU). En el Ejemplo 8 en el presente documento se describe un procedimiento ejemplar de producción de anticuerpos humanizados, el cual es a base de la tecnología Composite Human Antibody™ de Antitope Limited.

Pueden utilizarse otros procedimientos adecuados de producción o aislamiento de anticuerpos de la especificidad requerida, incluyendo, por ejemplo, procedimientos que seleccionan un anticuerpo recombinante o fragmento de unión a anticuerpo (por ejemplo, los dAb) a partir de una biblioteca (por ejemplo, una biblioteca de presentación en fagos), o que dependen de la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones). Los animales transgénicos que tienen la capacidad de producir un repertorio de anticuerpos humanos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Xenomouse® (Abgenix, Fremont, CA)) y pueden producirse utilizando procedimientos adecuados (véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555 (1993), Jakobovits y col., Nature, 362: 255-258 (1993), Lonberg y col., Patente de Estados Unidos n.º 5.545.806; Surani y col., Patente de Estados Unidos n.º 5.545.807; Lonberg y col., documento WO 97/13852).

Una vez producido, un anticuerpo específico para PLVAP puede identificarse fácilmente utilizando procedimientos de exploración y aislamiento de anticuerpos específicos que son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Paul (ed.), Fundamental Immunology, Raven Press, 1993; Getzoff y col., Adv. en Immunol. 43: 1-98, 1988; Goding (ed.), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Ltd., 1996; Benjamin y col., Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984. Pueden utilizarse una diversidad de ensayos para detectar anticuerpos que se unen de forma específica a las proteínas PLVAP. Los ensayos ejemplares se describen en detalle en Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los ejemplos representativos de tales ensayos incluyen: inmunolectroforesis simultánea, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencia puntual o ensayos de transferencia de Western, ensayos de inhibición o competición y ensayos de tipo sándwich.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos tienen una alta afinidad de unión por PLVAP. Tales anticuerpos preferentemente tendrán una afinidad (por ejemplo, afinidad de unión) por PLVAP, expresada como K_d , de al menos aproximadamente de 10^{-7} M (por ejemplo, aproximadamente de $0,4 \times 10^{-7}$ M, aproximadamente de $0,6 \times 10^{-7}$ M, aproximadamente de $4,06 \times 10^{-7}$ M, aproximadamente de $4,64 \times 10^{-7}$ M), o más alta, por ejemplo, al menos aproximadamente de 10^{-8} M (por ejemplo, aproximadamente de $5,98 \times 10^{-8}$ M), al menos aproximadamente de 10^{-9} M o al menos aproximadamente de 10^{-10} M (por ejemplo, aproximadamente de $9,78 \times 10^{-10}$ M), tal como aproximadamente de $9,78 \times 10^{-10}$ M. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la afinidad de unión de un anticuerpo, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard (Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949). La afinidad de unión también puede determinarse utilizando un instrumento biosensor disponible de forma comercial (BIACORE, Pharmacia Biosensor, Piscataway, N. J.), en el que se inmoviliza proteína en la superficie de un chip receptor. Véase, Karlsson, J. Immunol. Methods 145: 229-240, 1991 y Cunningham y Wells, J. Mol. Biol. 234: 554-563, 1993. Este sistema permite la determinación de las velocidades de asociación y disociación, a partir de las que puede calcularse la afinidad de unión, y la evaluación de la estequiometría de la unión.

Los anticuerpos pueden incluir un marcador, tal como, por ejemplo, un marcador detectable que permita la detección del anticuerpo y de las proteínas unidas por el anticuerpo (por ejemplo, PLVAP) en una muestra biológica. Un marcador detectable es particularmente adecuado para aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo, un anticuerpo contra PLVAP puede marcarse con un isótopo radiactivo (radioisótopo), que un experto en la materia puede detectar utilizando un contador gamma, un contador de centelleo o una autorradiografía, u otros medios adecuados. Los isótopos que son útiles para los fines de la presente invención incluyen, pero sin limitación: ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{36}Cl , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe y ^{75}Se .

Los anticuerpos también pueden marcarse con un compuesto fluorescente (por ejemplo, colorantes). Cuando el anticuerpo marcado de forma fluorescente se expone a la luz de la longitud de onda apropiada, su presencia puede entonces detectarse debido a la fluorescencia del compuesto. Entre los marcadores fluorescentes más habitualmente utilizados están el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la ficoeritrina, la ficocianina, la alofococianina, el o-ftaldehído y la fluorescamina. Los anticuerpos también pueden marcarse utilizando metales que emiten fluorescencia, tales como ^{152}Eu , u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales también pueden unirse a la molécula de anticuerpo utilizando tales grupos quelantes de metales como el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido tetraaza-ciclododecanotetraacético (DOTA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Los anticuerpos también pueden acoplarse a un compuesto quimioluminiscente. Los ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente útiles son el luminol, el isoluminol, el éster de acridinio teromático, el imidazol, las sales de acridinio y el éster de oxalato.

Asimismo, para marcar el anticuerpo de la presente invención puede utilizarse un compuesto bioluminiscente. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrada en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes útiles para el fin de marcar anticuerpos son la luciferina, la luciferasa y aequorina.

La detección de los anticuerpos marcados puede llevarse a cabo mediante un contador de centelleo, por ejemplo, si

el marcador detectable es un radioactivo emisor de rayos gamma, o mediante un fluorómetro, por ejemplo, si el marcador es un material fluorescente. En el caso de un marcador enzimático, la detección puede llevarse a cabo mediante procedimientos colorimétricos que emplean un sustrato para la enzima. La detección también puede llevarse a cabo mediante comparación visual del grado de la reacción enzimática de un sustrato con respecto a patrones preparados de forma similar.

Por consiguiente, los anticuerpos también pueden utilizarse como una tinción para cortes de tejidos. Por ejemplo, un anticuerpo marcado que se une a PLVAP puede ponerse en contacto con una muestra de tejido, por ejemplo, una biopsia de tejido hepático o un aspirado con aguja fina de un paciente. Después, este corte puede lavarse y detectarse el marcador utilizando un medio apropiado.

Para el fin de tratar el CHC, los anticuerpos contra PLVAP incluyen un radiomarcador u otro agente terapéutico que potencie la destrucción de las células que expresan PLVAP (por ejemplo, células endoteliales vasculares que rodean las células de CHC). Los ejemplos de marcadores radioisotópicos adecuados para su uso en la terapia del CHC incluyen, pero sin limitación, ^{251}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{217}Bi , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{111}In y ^{188}Re . De forma opcional, puede utilizarse como un marcador para los anticuerpos contra PLVAP terapéuticos un marcador que emite partículas α y β durante el bombardeo con radiación por neutrones, tales como boro.

Los anticuerpos terapéuticos también pueden incluir un agente citotóxico que tenga la capacidad de destruir de forma selectiva células que expresan PLVAP. Por ejemplo, pueden utilizarse toxinas bacterianas tales como la toxina diftérica o la ricina. Los procedimientos para la producción de anticuerpos que comprenden el fragmento A de la toxina diftérica se enseñan en la Patente de Estados Unidos n.º 4.675.382 (1987). La toxina diftérica contiene dos cadenas polipeptídicas. La cadena B une la toxina a un receptor sobre la superficie celular. La cadena A es la que entra realmente en el citoplasma e inhibe la síntesis de proteínas inactivando el factor de elongación 2, el factor que transloca los ribosomas a lo largo del ARNm de forma simultánea con la hidrólisis de ETP. Véase Darnell, J. y col., en *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, Inc., página 662 (1986). Como alternativa, puede prepararse un anticuerpo que comprende ricina, una lectina tóxica. Los expertos en la materia conocen otros agentes citotóxicos adecuados.

Para la detección *in vivo*, los anticuerpos contra PLVAP pueden conjugarse a radionúclidos de forma directa o utilizando un grupo funcional intermediario. Un grupo intermediario que a menudo se utiliza para unir a anticuerpos radioisótopos que existen como cationes metálicos es el ácido dietilentriaminopentaacético (DOTA) o el ácido tetraazaciclododecano-tetraacético (DOTA). Los ejemplos típicos de cationes metálicos que se unen de esta forma son ^{99}Tc , ^{123}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{97}Ru , ^{67}Cu , ^{67}Ga y ^{68}Ga .

Además, los anticuerpos pueden etiquetarse con un agente de formación de imágenes por NMR que incluya átomos paramagnéticos. El uso de un agente de formación de imágenes por NMR permite el diagnóstico *in vivo* de la presencia de y el grado del CHC en un paciente utilizando técnicas de NMR. Los elementos que son particularmente útiles de esta manera son ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Cr y ^{56}Fe .

Identificación de los antagonistas de PLVAP

Los agentes que tienen especificidad de unión por los productos del gen de PLVAP pueden identificarse en una exploración, por ejemplo, una exploración de alto rendimiento de compuestos químicos y/o de bibliotecas (por ejemplo, bibliotecas químicas, peptídicas o de ácidos nucleicos).

Los anticuerpos que se unen de forma específica a PLVAP humana pueden identificarse, por ejemplo, explorando bibliotecas de anticuerpos combinatorias disponibles de forma comercial (Dyax Corp., MorphoSys AG). Las bibliotecas de anticuerpos combinatorias adecuadas y los procedimientos convencionales de exploración de estas bibliotecas se describen en Hoet y col., *Nature Biotechnology* 25(3): 344-348 (2005) y Rauchenberger y col., *J Biol. Chem.* 278(40): 38194-38205 (2003). Tales bibliotecas o colecciones de moléculas también pueden prepararse utilizando procedimientos químicos bien conocidos.

Como alternativa, los anticuerpos murinos que se unen de forma específica a PLVAP humana pueden identificarse, por ejemplo, inmunizando ratones con proteínas, fragmentos de proteína o péptidos PLVAP, junto con un adyuvante para romper la tolerancia al antígeno. Pueden explorarse la especificidad y la actividad deseadas de estos anticuerpos y, después, pueden humanizarse utilizando técnicas conocidas para crear agentes adecuados para el tratamiento de una enfermedad humana.

Los agentes que se unen a PLVAP pueden evaluarse adicionalmente por la actividad antagonista de PLVAP. Por ejemplo, una composición que comprende una proteína PLVAP puede utilizarse en una exploración o ensayo de unión para detectar y/o identificar agentes que se unen a y antagonizan la proteína PLVAP. Las composiciones adecuadas para su uso incluyen, por ejemplo, células que expresan de forma natural una proteína PLVAP (por ejemplo, células endoteliales vasculares de hígado), extractos de tales células y proteína PLVAP recombinante.

Un agente que se une a una proteína PLVAP puede identificarse en un ensayo de unión competitiva, por ejemplo, en el que se evalúa la capacidad de un agente de prueba para inhibir la unión de PLVAP a un agente de referencia. El agente de referencia puede ser una proteína PLVAP de longitud completa o una parte de la misma. El agente de referencia también puede marcarse con un marcador adecuado (por ejemplo, radioisótopo, marcador epitópico,

marcador de afinidad (por ejemplo, biotina y avidina o estreptavidina), marcador spin, enzima, grupo fluorescente, grupo quimioluminiscente, colorante, metal (por ejemplo, oro, plata), perlas magnéticas) y puede determinarse la cantidad de agente de referencia marcado necesaria para saturar en el ensayo la proteína PLVAP. La especificidad de la formación del complejo entre la proteína PLVAP y el agente de prueba puede determinarse utilizando un control adecuado (por ejemplo, agente no marcado, marcador solo).

La capacidad de un agente de prueba para inhibir la formación de un complejo entre el agente de referencia y una proteína PLVAP puede determinarse como la concentración de agente de prueba necesaria para inhibir el 50 % (valor de CI_{50}) de la unión específica del agente de referencia marcado. La unión específica se define preferentemente como la unión total (por ejemplo, marcador total formando complejo) menos la unión no específica. La unión no específica preferentemente se define como la cantidad de marcador que todavía se detecta en complejos formados en presencia de un exceso de agente de referencia no marcado. Los agentes de referencia adecuados para su uso en el procedimiento son anticuerpos que se unen a PLVAP.

Un agente que antagoniza una proteína PLVAP puede ser identificarse explorando para encontrar agentes que tengan capacidad de antagonizar (reducir, prevenir, inhibir) una o más actividades de PLVAP, tales como, por ejemplo, la vascularización tumoral. Un experto en la materia puede evaluar tales actividades utilizando cualquier ensayo *in vitro* o *in vivo* apropiado.

Composiciones farmacéuticas

Puede administrarse a un sujeto mamífero en anticuerpo humanizado como parte de una composición farmacéutica o fisiológica, por ejemplo, como parte de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones o composiciones que comprenden un anticuerpo que se une de forma específica a PLVAP o las composiciones que comprenden el anticuerpo y uno o más de otros agentes terapéuticos (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, por ejemplo, doxorubicina, 5-fluorouracilo, tamoxifeno, octreotide) variarán de acuerdo con la vía de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión o cápsula). Los vehículos farmacéuticos adecuados pueden contener ingredientes inertes que no interactúan con el antagonista de PLVAP. Pueden emplearse técnicas de formulación farmacéutica convencionales, tales como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Los vehículos farmacéuticos adecuados para la administración parenteral incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica, solución salina bacterioestática (solución salina que contiene aproximadamente el 0,9 % mg/ml de alcohol bencílico), solución salina tamponada con fosfato, solución de Hank, lactato de Ringer y similares. Las formulaciones también pueden incluir cantidades pequeñas de sustancias que potencian la eficacia del principio activo (por ejemplo, agentes emulsionantes, de solubilización, tamponadores de pH, de humectación). Los procedimientos de encapsulación de composiciones (tales como en un recubrimiento de gelatina dura o ciclodextrano) son conocidos en la técnica. Para la inhalación, el agente puede solubilizarse y cargarse en un dosificador adecuado para la administración (por ejemplo, un atomizador o nebulizador, o un dosificador en aerosol presurizado).

La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes Ejemplos, los que no pretenden en modo alguno ser limitantes.

Ejemplificación

Ejemplo 1: La expresión de PLVAP es elevada en tejidos de hígado de CHC con respecto a los tejidos de hígado que no son de CHC

Materiales y procedimientos:

Muestras de tejido

Se recogieron tejidos de hígado de CHC y no tumoral adyacente de muestras de ensayo recién preparadas extraídas de forma quirúrgica de pacientes humanos para fines terapéuticos. Estas muestras de ensayo se recogieron bajo la supervisión directa del patólogo responsable. Los tejidos recogidos se almacenaron de forma inmediata en nitrógeno líquido en el Banco de Tumores de la Koo Foundation Sun Yat-Sen Cancer Center (KF-SYSCC). Estuvieron disponibles para el estudio muestras de tejido emparejadas de dieciocho pacientes con CHC. El comité Institucional de Revisión aprobó el estudio y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes. Las características clínicas de los dieciocho pacientes con CHC de este estudio se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Datos clínicos para dieciocho pacientes con CHC de los que se obtuvieron muestras emparejadas de tejido de hígado de CHC y adyacente no tumoral

n.º de caso	Sexo	Edad	AgSHB	AbsHB	IgG para VHC	Etapas TNM	AFP (ng/ml)	Diferenciación
1	M	70	+	-	-	2	2	Moderada
2	M	75	-	+	+	4A	5	Adecuada

(continuación)

n.º de caso	Sexo	Edad	AgsHB	AbsHB	IgG para VHC	Etapas TNM	AFP (ng/ml)	Diferenciación
3	M	59	+		-	4A	1232	Moderada
4	F	53	+		+	1	261	Moderada
5	M	45	+		-	2	103	Moderada
6	M	57	+	+	-	2	5	Moderada
7	M	53	+	+	-	3A	19647	Moderada
8	M	54	-	-	+	3A	7	Moderada
9	M	44	+		-	4A	306	Moderada
10	M	76	-	-	+	3A	371	Moderada
11	F	62	+	-	-	3A	302	Moderada
12	F	73	-	-	+	2	42	Moderada
13	M	46	+		-	4A	563	Moderada
14	M	45	-		-	3A	64435	Moderada
15	M	41	+		-	2	33,9	Adecuada
16	M	44	+	+	-	2	350	Moderada
17	M	67	+		-	3A	51073	Moderada
18	M	34	+		-	4A	2331	Moderada

Caracterización del transcrito de ARNm

- Se aisló ARN total de tejidos congelados en nitrógeno líquido utilizando reactivos de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). El ARN aislado se purificó adicionalmente utilizando el kit RNAEasy Mini (Qiagen, Valencia, CA) y se evaluó su calidad utilizando el ensayo RNA 6000 Nano en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Todas las muestras de ARN utilizadas para el estudio tenían un Número de Integridad de ARN (NIA) mayor que 5,7 ($8,2 \pm 1,0$, media $\pm$ DT). Las dianas de hibridación se prepararon a partir de 8 µg de ARN total de acuerdo con protocolos de Affymetrix y se hibridaron con un Chip Génico Affymetrix U133A, que contenía 22.238 conjuntos de sondas para aproximadamente 13.000 genes humanos. Inmediatamente después de la hibridación, la matriz hibridada se sometió a lavado automatizado y se tiñó utilizando una estación de fluidos Affymetrix GeneChip 400 y el protocolo EukGE WS2v4. Después de eso, se leyeron los Chips Génico U133A en un escáner Affymetrix GeneArray 2500.

Determinación de señales (calls) presentes y ausentes de los datos de micromatriz

- Se utilizó el programa informático Affymetrix Microarray Analysis Suite (MAS) 5.0 para generar las señales presentes para los datos de micromatriz para las 18 parejas de tejidos de CHC y de hígado no tumoral adyacente. Todos los parámetros para la determinación de señales presentes fueron valores predeterminados. Cada conjunto de sondas se determinó como "presente", "ausente" o "marginal" mediante MAS 5.0. De forma similar, los mismos datos de micromatriz se procesaron utilizando el programa informático dChip versión-2004 para determinar el estado "presente", "ausente" o "marginal" para cada conjunto de sondas en las micromatrices.

Identificación de los conjuntos de sondas con expresión diferencial extrema

- Para la identificación de genes con expresión diferencial extrema entre el tejido de CHC y el de hígado no tumoral adyacente, se utilizó el programa informático escrito utilizando el Practical Extraction and Report Language (PERL) de acuerdo con las siguientes reglas: "genes específicos de tumor" se definió como el conjunto de sondas que se llamó "presente" en el CHC y "ausente" o "marginal" en el tejido de hígado no tumoral adyacente, tanto por MAS 5.0 como por dChip. Se definieron los "genes específicos de tejido de hígado no tumoral" como el conjunto de sondas llamado "ausente" o "marginal" en el CHC y "presente" en el tejido de hígado no tumoral adyacente emparejado, tanto por MAS 5.0 como por dChip. En la FIG.1 se muestra un diagrama de flujo que representa el algoritmo de identificación.

Transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) cuantitativa en tiempo real

Se utilizó transcriptasa inversa-PCR cuantitativa (RT-PCRq) en tiempo real TaqMan™ para cuantificar el ARNm. Se sintetizó ADNc a partir de 8 µg de ARN total para cada muestra utilizando 1500 ng de cebador oligo (dT) y 600

unidades de Transcriptasa Inversa SuperScript™ II de Invitrogen (Carlsbad, CA), en un volumen final de 60 µl de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada reacción de RT-PCR se utilizaron como molde 0,5 µl de ADNc en un volumen final de 25 µl siguiendo las instrucciones del fabricante (ABI y Roche). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7900HT. Las sondas y reactivos necesarios para los experimentos se obtuvieron de Applied Biosystems (ABI) (Foster City, CA). Las secuencias de los cebadores y las sondas utilizadas para la RT-PCR cuantitativa en tiempo real de PLVAP son 5'-CCTGCAGGCATCCCTGTA-3' (cebador directo) (SEQ ID NO:25); 5'-CGGGCCATCCCTTGGT-3' (cebador inverso) (SEQ ID NO:26) y 5'-CCCCATCCAGTGGCTG-3' (sonda) (SEQ ID NO:27). El gen constitutivo hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) se utilizó como una referencia endógena para la normalización. Todas las muestras se ejecutaron por duplicado en la misma placa de PCR para el mismo ARNm diana y el ARNm de HPRT de referencia endógena. Las cantidades relativas de los ARNm diana se calcularon mediante el procedimiento de Ct (sigla de *cycle threshold*: umbral de ciclos) comparativo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Boletín del Usuario n.º 2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System). Se eligió una muestra de hígado no tumoral como el patrón relativo para el cálculo.

Resultados:

Las intensidades de expresión génica de PLVAP en 18 parejas de tejidos de hígado de CHC y no tumoral adyacentes se muestran en la FIG. 2. Las intensidades de expresión génica promedio fueron $759,8 \pm 436,5$ y $170,6 \pm 53,4$ (media $\pm$ DT) para el tejido de hígado de CHC y no tumoral adyacente emparejados, respectivamente. El valor p de la prueba t para muestras emparejadas entre los dos grupos fue $2,8 \times 10^{-5}$. Estos resultados indican que PLVAP se expresa en tejido de hígado de CHC y no en no tumoral. Esta expresión elevada de PLVAP en CHC se confirmó adicionalmente cuando 82 muestras de CHC no emparejadas mostraron una intensidad de expresión promedio de $810,4 \pm 482,0$ (media $\pm$ DT), lo que es esencialmente la misma que la hallada en las 18 muestras de CHC emparejadas ($p=0,62$ mediante la prueba t) (FIG. 2).

Para confirmar que PLVAP se expresa de forma significativa en tejido de hígado de CHC y no en tejido de hígado no tumoral, se realizó RT-PCR cuantitativa en tiempo real en muestras de ARN de 18 parejas de tejido de hígado de CHC y no tumoral adyacente. Las cantidades de ARNm de PLVAP fueron significativamente más altas en tejidos de CHC con respecto a los de hígado no tumorales (véase la FIG. 3A y la Tabla 2). Aunque los resultados mostraron algo de solapamiento entre los dos grupos, los transcritos de PLVAP fueron más elevados en CHC que en el tejido de hígado no tumoral adyacente dentro del mismo individuo, para todos los individuos analizados excepto uno (FIG. 3B). Esta excepción probablemente estaba asociada con los grados irregulares de degradación de ARN durante el procedimiento de almacenamiento de los tejidos.

Tabla 2: Intensidades de expresión del gen de PLVAP para 18 parejas de tejidos de CHC y de hígado no tumoral adyacente.

Número de Muestra	Intensidad de Expresión*	
	CHC	Tejido de hígado no tumoral adyacente
1	1757	195
2	1329	210
3	1148	168
4	1130	211
5	1096	213
6	1068	181
7	932	101
8	804	60
9	630	155
10	612	175
11	607	125
12	519	146
13	478	300
14	422	180
15	275	105
16	251	204
17	251	155
18	186	184

Ejemplo 2: Las células endoteliales vasculares de CHC expresan de forma específica PLVAP

Materiales y procedimientos:*Microdissección de captura por láser (MCL) de tejidos incluidos en parafina fijados con formalina*

Se llevó a cabo MCL de tejidos fijados con formalina procedentes de bloques de parafina utilizando el sistema Arcturus PixCell[®] IIe, cubiertas CapSure[™] HS LCM y el sistema de reactivos Paradise[™] de Arcturus Bioscience, Inc. (Mountain View, CA). Se cortaron cortes de tejido de siete micrómetros de grosor, se desparafinaron, se rehidrataron, se tiñeron y se deshidrataron para la MCL, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células diana se capturaron sobre las cubiertas CapSure[™] HS LCM utilizando un tamaño de haz de láser de 7,5 µm con energía de 50 mW y una duración de 1,3 ms. Aproximadamente, se capturaron de 5000 a 6000 células en cada cubierta. Sin embargo, debido a la escasez de células solo se capturó sobre cada cubierta de 1000 a 2000 células endoteliales vasculares de carcinoma hepatocelular.

Extracción de ARN a partir de cortes de tejido por MCL para RT-PCR cuantitativa

Las células capturadas sobre las cubiertas CapSure[™] HS LCM como se describe anteriormente se procesaron para la extracción de ARN, la síntesis de ADNc, la transcripción *in vitro* y la amplificación de ARN antisentido, utilizando el sistema de reactivos Paradise[™] de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después, el ARN antisentido sintetizado se utilizó como un molde para la RT-PCR cuantitativa en tiempo real TaqMan de dos etapas, para la cuantificación de ARNm de PLVAP y de beta-actina en las células capturadas mediante MCL. La primera etapa (es decir, la transcripción inversa) se llevó a cabo utilizando 4,5 µl de ARN antisentido y los Reactivos de Transcripción Inversa de TaqMan (ABI) en un volumen final de 10 µl siguiendo el protocolo del fabricante. La segunda etapa (es decir, la PCR en tiempo real) se realizó utilizando 2,4 µl de molde de ADNc, la mezcla de cebadores/sonda y la mezcla maestra de PCR universal de TaqMan de Applied Biosystems, en un volumen final de 25 µl. La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un Smart Cycler II (Cepheid, Inc., Sunnyvale, CA). Inicialmente las reacciones se incubaron a 50 °C durante 2 minutos y después a 95 °C durante 10 minutos. A partir de ahí, se realizaron 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y de apareamiento/extensión a 60 °C durante 40 segundos. Las secuencias de los cebadores y de las sondas se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de cebadores y sondas para la RT-PCR cuantitativa en tiempo real para los niveles de PLVAP y de beta-actina en muestras preparadas mediante microdissección por captura de láser.

	gen de PLVAP	gen de beta-Actina
cebador directo	5'-CCTTGAGCGTGAGTGTTCCTCA-3' (SEQ ID NO:28)	5'-GTCCCCCAACTTGAGATGTATGAA G-3' (SEQ ID NO:29)
cebador inverso	5'-GGCAGGGCTGGGAGTTG-3' (SEQ ID NO:30)	5'-GTCTCAAGTCAGTGTACAGGTAAG C-3' (SEQ ID NO:31)
sonda Taqman	5'-CTCCCAGGGAGACCAA-3' (SEQ ID NO:32)	5'-AAGGAGTGGCTCCCCTCC-3' (SEQ ID NO:33)

Preparación del vector de expresión para la proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ de fusión recombinante

Se generó el plásmido pGEM[®]-T Easy -PLVAP₅₁₋₄₄₂ insertando un fragmento de PCR que codifica los restos de aminoácidos 51 a 442 de PLVAP en el vector pGEM[®]-T Easy (Promega, Inc., Madison, WI). El fragmento de PCR se amplificó a partir de un clon de ADNc de PLVAP de OriGene (Rockville, MD) utilizando el conjunto de cebadores

5'-CATATGAACGTGCACGTGAGCACAGAGTCC-3' (SEQ ID NO:34)

y

5'-GGATCCTGAGCATATCCCTGCATCCTCC-3' (SEQ ID NO:35).

Para la construcción del plásmido pET-15b-PLVAP₅₁₋₄₄₂, se escindió de pGEM[®]-T Easy -PLVAP₅₁₋₄₄₂ un fragmento de ADNc que codifica los restos de aminoácidos 51 a 442 de PLVAP con sitios de reconocimiento para NdeI y BamHI en cada extremo respectivo y se insertó en pET-15b (Novagen, Inc., San Diego, CA). La construcción de expresión descrita anteriormente se verificó mediante secuenciación de ADN.

Expresión y purificación de la proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ de fusión recombinante

Para la producción de la proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ etiquetada con His recombinante (SEQ ID NO:2) (FIG. 4) se transformó

Escherichia coli (Rosetta-gami2(DE3)pLysS, Novagen) incubando células competentes con ADN plasmídico de PET-15b-PLVAP₅₁₋₄₄₂ en hielo durante 5 min, seguido de la incubación en un baño de agua a 42 °C durante 30 s y después otra vez en hielo durante 2 min. Antes de la siembra en placa en medio selectivo, los transformantes se incubaron a 37 °C durante 60 min mientras se agitaba a 250 rpm con medio SOC (extracto de levadura al 0,5 %, triptona al 2 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glucosa 20 mM). La expresión en *Escherichia coli* Rosetta-gami2(DE3)pLysS de la proteína de fusión etiquetada con His se indujo con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM durante 16 horas a 30 °C. Después de la inducción, las células bacterianas se sometieron a lisis por tratamiento con ultrasonido en tampón de equilibrado (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7) complementado con urea 8 M, y se separó en las fracciones soluble e insoluble por centrifugación a 5.600 x g durante 30 minutos. Para la purificación adicional de la proteína His-PLVAP₅₁₋₄₄₂, se cargó la fracción soluble en una resina de afinidad de metales TALON® (Clontech, Inc., Palo Alto, CA), se lavó con tampón de equilibrado y se eluyó con tampón de elución (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7, imidazol 250 mM). Se eliminó la etiqueta de His de la proteína de fusión purificada mediante la escisión con trombina (Novagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (véase la FIG. 5). La proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ resultante se recuperó mediante diálisis exhaustiva frente a PBS. Para verificar la identidad de la proteína PLVAP recombinante, se adquirió una pequeña cantidad de antisuero de ratón frente a la proteína de fusión GST-PLVAP₃₃₁₋₄₃₀ del Biodesign Institute (Tempe, AZ). Se detectó la proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ recombinante sin la etiqueta de His mediante análisis de transferencia de Western utilizando este anticuerpo, pero no reaccionó con anticuerpos contra la etiqueta de His. Estos resultados confirman la identidad de la proteína PLVAP recombinante.

Generación de suero de ratón anti PLVAP humana

La proteína recombinante PLVAP₅₁₋₄₄₂ purificada en PBS se utilizó para inmunizar ratones Balb/cByj de 6 semanas. Cada ratón se inmunizó de forma inicial con un total de 14 µg de proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ en adyuvante completo de Freund (Sigma, Inc., St Louis, MO) por inyección subcutánea en múltiples sitios. Después de esto, se reforzó la inmunización con 7 µg de proteína recombinante PLVAP₅₁₋₄₄₂ en adyuvante incompleto de Freund, cada dos semanas, un total de tres veces. Una semana después de la última inmunización de refuerzo se extrajo sangre a los ratones para la preparación de antisuero.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Reactivos y soluciones:

1. Proteína PLVAP recombinante
2. Conjugado de IgG anti ratón-fosfatasa alcalina (n.º de cat.: AP124A, CHEMICON)
3. Tampón de recubrimiento (cloruro de sodio 0,137 M, fosfato de sodio dibásico heptahidratado 0,01 M, fosfato de potasio monobásico 2 mM, azida de sodio al 0,002 % (0,3 mM), pH 7,2-7,4)
4. Tampón de lavado (cloruro de sodio 0,137 M, fosfato de sodio dibásico heptahidrato 0,01 M, fosfato de potasio monobásico 2 mM, Tween20 al 0,2 % (cat. P1379, SIGMA, pH 7,2-7,4)
5. Tampón de bloqueo (cloruro de sodio 0,137 M, fosfato de sodio dibásico heptahidrato 0,01 M, fosfato de potasio monobásico 2 mM, seroalbúmina bovina al 2 % (cat. 82-045, PENTEX), Tween 20 al 0,05 % (cat. P1379, SIGMA), pH 7,2-7,4)
6. Tampón carbonato (bicarbonato de sodio 0,016 M, carbonato de sodio 0,014 M, cloruro de magnesio 2 mM, azida de sodio al 0,002 % (0,3 mM), pH 9,6)
7. Sustrato de Fosfatasa Alcalina: una cápsula de sustrato de fosfatasa de 40 mg (Cat. P5994, SIGMA) disuelta en 40 ml de tampón carbonato

Procedimiento:

Los títulos de anticuerpos en el suero anti PLVAP se determinaron utilizando ELISA. En primer lugar, la placa de ELISA de 96 pocillos se recubrió con 50 µl de proteína PLVAP disuelta en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía azida de sodio al 0,002 % (es decir, tampón de recubrimiento) a una concentración en el intervalo de 2,5 µg/ml durante una noche a 4 °C. Después de tres lavados con 200 µl de tampón de lavado (PBS que contiene Tween-20 al 0,05 %) cada pocillo de la placa recubierta se bloqueó con 150 µl de tampón de bloqueo (es decir, tampón de lavado que contiene seroalbúmina bovina al 2 %) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de tres lavados adicionales, cada pocillo se incubó con 50 µl del antisuero diluido (dilución en serie con factor dos, de 1.000x a 128.000x), preparado en tampón de dilución, durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de eso, se incubó cada pocillo con conjugado de anti IgG de ratón-fosfatasa alcalina a una dilución de 5.000X (Chemico, Inc., Temecula, CA), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados los anticuerpos unidos se cuantificaron con 100 µl de sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma, Inc., St Louis, MO) y la medición de la absorbancia se realizó a 405 nm después de un período de incubación de 25 a 40 min utilizando un lector de placas de ELISA.

Detección inmunohistoquímica (IHQ) de PLVAP en tejidos fijados con formalina

Se cortaron cortes de seis micrómetros de bloques de parafina de tejidos fijados con formalina. Estos cortes se montaron sobre portaobjetos de vidrio SuperFrost plus adhesion (Menzel Glaser GmbH, Braunschweig, Alemania). Después, los cortes se procesaron para la inmunotinción de PLVAP en un instrumento de tinción automatizado Benchmark XT (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ), utilizando el protocolo XT-iView-DAB-V.1 con

acondicionante suave CCI durante 30 minutos, y los cortes se incubaron con suero anti PLVAP humana diluido 400X a 37 °C durante 36 minutos. El segundo anticuerpo y los reactivos utilizados para detectar la unión de los anticuerpos de ratón anti PLVAP humana fueron del Kit de Detección *View™* DAB de Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ). Todos los reactivos y tampones se adquirieron en Ventana Medical Systems.

5 Resultados:

Para determinar la fuente celular de PLVAP en las muestras de CHC, se diseccionaron de las muestras células endoteliales vasculares de CHC, células tumorales de carcinoma hepatocelular y hepatocitos no tumorales, incluyendo células endoteliales sinusoides de revestimiento, utilizando microdissección por captura láser (MCL). Debido a la estrecha yuxtaposición entre las células de hepatoma y las células endoteliales de revestimiento capilar, se hizo un esfuerzo durante la disección por evitar la inclusión de células endoteliales de revestimiento capilar. Los ARN extraídos de las células diseccionadas se utilizaron para RT-PCR cuantitativa en tiempo real de dos etapas para determinar las cantidades relativas de ARNm de PLVAP. Se estudiaron muestras de ensayo de dos pacientes distintos. Los resultados mostrados en la Tabla 4 y en las FIG. 6A-C indican que PLVAP se expresa en células endoteliales vasculares de CHC (FIG. 6A), mientras que no se detectó transcrito de PLVAP detectable en los tejidos de hígado no tumoral adyacentes (FIG. 6B).

Tabla 4: Determinación de las cantidades relativas de ARNm de PLVAP en dos muestras de CHC por RT-PCR cuantitativa en tiempo real Taqman en células diseccionadas por microdissección por captura láser

Muestra de CHC	Cantidad relativa de ARNm de PLVAP		
	Células endoteliales de CHC	Tejido de hígado no tumoral adyacente	Células tumorales de CHC
A	1	0	0,002
B	1	0,001	0,057

Para investigar adicionalmente la especificidad de tejido y de enfermedad de la expresión de PLVAP, se generaron anticuerpos policlonales frente al dominio extracelular de PLVAP humana (aminoácidos 51 a 442) para su uso en estudios de inmunohistoquímica (IHQ). Como se muestra en la FIG. 7, el antisero obtenido de ratones Balb/c que se inmunizaron con la proteína PLVAP₅₁₋₄₄₂ recombinante tenía un título elevado de anticuerpos anti-PLVAP.

Después, el antisero anti PLVAP se utilizó para determinar el emplazamiento de la expresión de PLVAP en cortes de tejido de pacientes con carcinoma hepatocelular (n=7) (las FIG. 8A-F y 9A-F), hiperplasia nodular focal (n=4) (las FIG. 10A-F), hemangioma hepático (n=2) (las FIG. 11A y B), hepatitis B crónica activa (n=2) (las FIG. 12A y B) o C (n=4) (las FIG. 13A-D) y cáncer metastásico (n=4) (es decir, colangiocarcinoma intrahepático, adenocarcinoma colorrectal metastásico o carcinoma de ovario metastásico) (las FIG. 14A-D). Los resultados mostraron que solo las células endoteliales capilares de carcinomas hepatocelulares expresaban la proteína PLVAP (las FIG. 8A, C, E y 9A, C, E, F). Las células endoteliales que revisten los sinusoides/capilares vasculares de tejidos de hígado no tumorales, incluyendo hígado cirrótico, hígado de hiperplasia nodular focal (las FIG. 10A-F) y hepatitis crónica (las FIG. 12A y B; las FIG. 13A-D) no expresaban la proteína PLVAP. Las células de revestimiento endoteliales de hemangioma hepático no mostraron expresión significativa de PLVAP tampoco (las FIG. 11A y B). Estos resultados demuestran que PLVAP es un biomarcador endotelial vascular que es específico para carcinoma hepatocelular, pero no para otras enfermedades del hígado. Por lo tanto, PLVAP puede utilizarse como un marcador diagnóstico y como diana terapéutica para el CHC.

35 Ejemplo 3. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales de ratón que se unen de forma específica a PLVAP

Materiales y procedimientos

Procedimientos de inmunización

Se inmunizaron cinco ratones Balb/cByJ hembra de seis semanas de manera inicial con 20 µg de proteína PLVAP recombinante purificada disuelta en 0,125 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se emulsionó en un volumen igual de adyuvante completo de Freund. La mezcla PLVAP-adyuvante se inyectó en volúmenes de 0,05 ml en cada uno de cuatro sitios subcutáneos distintos en la parte ventral del ratón, cerca de los ganglios linfáticos axilares e inguinales, así como en un quinto sitio subcutáneo, el cual se emplazaba cerca de la escápula. Todos los ratones recibieron una inmunización de refuerzo de 20 µg de proteína PLVAP recombinante inyectados por vía intraperitoneal cada dos semanas, un total de tres veces. Una semana después de la última inmunización de refuerzo, se tomaron muestras de sangre de ensayo para medir si los ratones estaban produciendo títulos suficientemente altos de anticuerpos anti PLVAP (>10.000 X). Se utilizó para este fin un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en fase sólida. Se seleccionó para la producción de hibridomas el ratón que produjo el título más elevado de anticuerpos contra PLVAP.

50 Desarrollo de anticuerpos monoclonales anti PLVAP murinos

Tres días antes del experimento de fusión programado para producir los hibridomas, se inyectaron 20 µg de PLVAP recombinante por vía intravenosa al ratón que producía el título más elevado de anticuerpo contra PLVAP. Los hibridomas que producían anticuerpos monoclonales (Acm) frente a PLVAP se produjeron de acuerdo a un protocolo descrito anteriormente (véase la Unidad 2.5, Production of Monoclonal Antibodies, en Current Protocols in Immunology, editores: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, y Strober W. Publicado por John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2001), con modificaciones menores. De forma concreta, las células esplénicas recogidas del ratón inmunizado se fusionaron con células de mieloma SP2/0 a una proporción de 7,5:1 (células esplénicas: células de mieloma) utilizando polietilenglicol 1540 al 50 %. Los productos de la fusión se sembraron en placas de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos y el siguiente día se añadió medio selectivo con hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT). Siete a diez días más tarde, se exploró por ELISA la producción de anticuerpos anti PLVAP en los sobrenadantes de los pocillos con crecimiento positivo. Los hibridomas que de forma inicial producían Acm anti PLVAP se expandieron y reexploraron. Los hibridomas que mostraron una producción continua de anticuerpos se clonaron por el procedimiento de dilución limitante. Los isotipos de los Acm se determinaron utilizando un ELISA. Los anticuerpos monoclonales se purificaron a partir de ascitis o de medios de cultivo mediante cromatografía en columna de afinidad de Proteína G (Unidad 2.7, Purification and Fragmentation of Antibodies, en Current Protocols in Immunology, editores: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM y Strober W. Published by John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2001).

Ensayo de ELISA

Los ensayos de ELISA se realizaron como se describe en el presente documento (véase el Ejemplo 2).

Determinación de las afinidades de unión

Las afinidades de unión de los anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY4 y KFCC-GY5 se midieron en ANT Technology Co., Ltd. (Taipei, Taiwán) utilizando la tecnología de microequilibrio de cristales de cuarzo ANQ300 (Lin S., y col., J. Immunol Methods 239: 121-124 (2000)).

Aislamiento y cultivo de células endoteliales vasculares umbilicales humanas (CEVUH)

El aislamiento y cultivo de las CEVUH se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo establecido descrito en Baudin B, Bruneau A, Bosselut N y Vaubourdolle M. Nature Protocols 2: 481-485 (2007). Durante el mantenimiento del cultivo de células endoteliales, para recubrir las placas de cultivo o los cubreobjetos se utilizó gelatina al 1 % (DIFCO, Corp.) disuelta en solución salina tamponada con fosfato para reemplazar la solución de colágeno.

Extracción de las proteínas de membrana hidrófobas de CEVUH mediante tampón que contiene Tritón X-114 (TX-114)

Se sembraron en placa quinientas mil CEVUH en una placa de cultivo de 10 cm durante 24 horas. Después, las células se estimularon durante 72 horas adicionales con VEGF humano a 40 ng/ml. Las células cultivadas se lavaron dos veces con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después, las células se despegaron y se levantaron de la placa mediante la incubación con 1 ml de PBS que contenía EDTA 2 mM, se pusieron en un tubo de centrifuga y se recogieron mediante centrifugación a 300x g durante 5 minutos. En el sedimento producido mediante centrifugación había aproximadamente 2 millones de células. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 200 µl de tampón Tris 0,05 M enfriado en hielo, que contenía EDTA 5 mM y Tritón X-114 (TX-114) al 0,5 % (v/v), pH 7,4. La suspensión celular solubilizada se incubó en hielo con agitación vortical suave ocasional. Después de eso, la suspensión de células se centrifugó a 10.000x g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar los residuos celulares insolubles. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrifuga limpio y se incubó a 37 °C durante 5 minutos. Durante la incubación el TX-114 se separó de la fase acuosa. Después, el tubo de microcentrifuga se centrifugó a 1000x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, de forma que el TX-114 se centrifugó hasta la parte inferior del tubo. Se retiró la fase acuosa de la parte superior del tubo y el sedimento de TX-114 que contenía las proteínas celulares hidrófobas se disolvió en tampón de muestra de gel de acrilamida con SDS 2x en un volumen final de 50 µl. Para la electroforesis en gel de acrilamida SDS se utilizaron 15 µl de la muestra.

Electroforesis en gel de acrilamida con SDS, preparación de la transferencia de Western e inmunotransferencia

Los procedimientos son los mismos que los descritos anteriormente por Kao KJ, Scornik JC y McQueen CF. Human Immunol 27: 285-297 (1990), con una ligera modificación. La detección de la unión del anticuerpo en transferencias de Western se llevó a cabo utilizando sustrato quimioluminiscente de fosfatasa alcalina y un analizador de imágenes luminescentes LAS-4000 (Fujifilm Corp.).

Microscopía de inmunofluorescencia

Materiales:

1). Anticuerpos primarios:

a). IgG de ratón normal (Sigma Corp., n.º de catálogo: I-5381) disuelto en solución salina tamponada con fosfato

(PBS) hasta 1 mg/ml como una solución madre, diluida antes del uso con PBS-BSA al 0,5 % a una concentración de 5 µg/ml;

b). Monoclonal de ratón anti factor de von Willebrand (FvW) humano (DakoCytomation Corp., n.º de catálogo: M0616) diluido 50x con PBS que contenía BSA al 0,5 % antes de su uso;

c). Los anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY4 y KFCC-GY5 purificados se diluyeron antes del uso a 5 µg/ml con PBS que contenía BSA al 0,5 %;

2). Anticuerpo secundario: F(ab')₂ de cabra anti IgG de ratón (HyL) conjugado con FITC (Serotec, Corp., n.º de catálogo: Star105F);

3). Medio de montaje VectaShield con DAPI (Vector Labs, Corp., n.º de catálogo: H-1200);

4). Metanol al 100 % (Merck corp. n.º de Catálogo: 1.06009); y

5). Solución salina balanceada de Hank (HBSS) (Gibco, Corp., n.º de catálogo: 12065-056) diluido hasta 1x antes del uso.

Procedimiento:

Para preparar células endoteliales vasculares de cordón umbilical humano para el estudio de inmunofluorescencia, se colocaron cincuenta mil células en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos con un cubreobjetos redondo estéril de 1,5 cm colocado en la parte inferior de cada pocillo. Cada pocillo contenía 0,5 ml de medio de cultivo M199 que se complementó con fetal bovino al 20 %, L-glutamina al 1 %, solución de antibiótico/antimicótico al 1 %, heparina 50 µg/ml y complemento de cultivo de células endoteliales 75 µg/ml (Sigma, Corp. E0760). Cada cubreobjetos se prerrecubrió durante una noche con 200 µl de colágeno de piel de ternera 0,4 µg/ml (Sigma Corp. C9791) en ácido acético al 0,04 % (v/v). Después, los cubreobjetos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato 1x (PBS) y posteriormente se secaron al aire para su uso. Las células se cultivaron durante una noche y después se estimularon durante 72 horas adicionales con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) 40 ng/ml. Las células de los cubreobjetos se utilizaron para el procedimiento de inmunofluorescencia.

Para teñir las células para la microscopía de inmunofluorescencia, se lavaron las células crecidas en el cubreobjeto en cada pocillo con 0,5 ml de HBSS 1x. Después, las células se fijaron y permeabilizaron en 0,5 ml de metanol enfriado en hielo durante 5 minutos. Las células fijadas se lavaron 3 veces con 0,5 ml de PBS 1x, durante 5 minutos por lavado. Después, las células fijadas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 0,5 ml de PBS 1x que contenía BSA al 0,5 %. El cubreobjetos que contenía las células fijadas se retiró y se colocó en la parte superior de 0,2 ml de solución de anticuerpo primario diluido, que contenía IgG normal, anticuerpo monoclonal anti PLVAP KFCC-GY4 o KFCC-GY5 5 µg/ml, o una dilución 50x de anticuerpo monoclonal anti FvW humano, con las células fijadas hacia abajo y en contacto con la solución de anticuerpo. La solución de anticuerpo se colocó en un trozo de parafilm en un pequeño recipiente de plástico cubierto. Se mantuvo la humedad interior colocando un pequeño trozo de papel de filtro humedecido con agua.

Después de la incubación a 37 °C durante una hora en un recipiente humidificado, el cubreobjetos se retiró y las células sobre el cubreobjetos se lavaron 3 veces con 0,5 ml de PBS durante 5 minutos cada vez. Después, las células fijadas se incubaron con 0,2 ml de anticuerpo secundario F(ab')₂ de cabra anti IgG de ratón conjugado con FITC diluido 200x durante 50 minutos a 37 °C, como se describe, para la incubación con la solución de anticuerpo primario. Después de eso, las células se lavaron 3 veces con PBS como se describe anteriormente. Las células teñidas se montaron en un portaobjetos de vidrio utilizando la solución anti decoloración VectaShield. Se eliminó del borde del cubreobjetos el exceso de medio de montaje y se selló con esmalte de uñas. Las células teñidas se examinaron utilizando un microscopio de fluorescencia.

Resultados

La inmunización de ratones Balb/cByJ con proteína PLVAP humana recombinante condujo al desarrollo de hibridomas que producían anticuerpos monoclonales (Acm) que reconocían la proteína PLVAP humana. Se seleccionaron dos hibridomas para estudios adicionales. Se llamó a los anticuerpos producidos por estos hibridomas KFCC-GY4 y KFCC-GY5. Las secuencias de los dominios V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y KFCC-GY5, y las CDR de estos dominios, se muestran respectivamente en las FIG. 15A y B, y 16A y B.

La línea celular de hibridoma denominada como KFCC-GY4 tiene la Designación de Depósito de Patente de la A.T.C.C. PTA-9963, habiéndose depositado el 8 de abril de 2009. La línea celular de hibridoma denominada como KFCC-GY5 tiene la Designación de Depósito de Patente de la A.T.C.C. PTA-9964, habiéndose depositado el 8 de abril de 2009.

Ambos anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y KFCC-GY5 se unen a la proteína PLVAP recombinante en ELISA (FIG. 17) y ensayos de inmunotransferencia (las FIG. 18C y D).

Además, en un ensayo de inmunotransferencia estos anticuerpos reaccionan de forma específica con la proteína PLVAP de extractos de células endoteliales vasculares de cordón umbilical humano (las FIG. 19B y D). Además, los experimentos de tinción de inmunofluorescencia mostraron la unión de los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y KFCC-GY5 a células endoteliales vasculares humanas que expresan PLVAP (las FIG. 20C y D).

Utilizando microequilibrio de cristales de cuarzo ANTQ300 (Lin, y col., J. Immunol. Methods 239: 121-124, 2000) se determinó que las afinidades de unión (K_d) de los anticuerpos monoclonales por la proteína PLVAP recombinante son de $0,41 \times 10^{-7}$ M para el Acm KFCC-GY5 y de $0,6 \times 10^{-7}$ M para el Acm KFCC-GY4.

Los experimentos de inmunohistoquímica realizados sobre cortes de hepatoma del hígado de dos pacientes con hepatoma distintos, utilizando los anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY4 y KFCC-GY5, mostraron que el anticuerpo monoclonal KFCC-GY5 producía una señal más fuerte en células endoteliales vasculares (las FIG. 21A,C) que el anticuerpo monoclonal KFCC-GY4 (las FIG. 21B,D).

Se realizaron en muestras de cuatro pacientes de hepatoma seleccionados aleatoriamente distintos experimentos de inmunohistoquímica, realizados en cortes de tejido de hígado no tumoral y de hepatoma adyacentes del hígado del mismo paciente, utilizando el anticuerpo monoclonal anti PLVAP KFCC-GY4. La expresión de PLVAP se detectó en células endoteliales vasculares de tejidos de hepatoma (las FIG. 22A, C, E y G) pero no en tejidos de hígado no tumorales adyacentes (las FIG. 22B, D, F y H).

Ejemplo 4: La proteína PLVAP se expresa en las superficies de las células endoteliales vasculares

Materiales y procedimientos

15 *Microscopía de inmunofluorescencia*

Reactivos:

Los reactivos utilizados para el siguiente procedimiento son como se describe en el Ejemplo 3, con las siguientes modificaciones:

- 20 • el tampón de lavado HBSS 1x contenía azida de sodio al 0,1 %, el cual se utilizó para evitar la endocitosis de los anticuerpos unidos a la superficie celular;
- los anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY4 y KFCC-GY5 se diluyeron en tampón de lavado HBSS 1x con azida de sodio al 0,1 %;

Procedimiento:

La tinción por inmunofluorescencia de las células endoteliales vasculares del cordón umbilical humano (CEVUH) se realizó como se describe en el Ejemplo 3, excepto que las células no se fijaron y permeabilizaron con metanol. En su lugar, tras la incubación con los anticuerpos monoclonales anti PLVAP, las células se lavaron y fijaron con paraformaldehído al 4 % a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de esta incubación, las células se lavaron 3 veces, después se incubaron con $F(ab')_2$ de cabra anti IgG de ratón conjugado con FITC. Después de tres lavados adicionales, las células se procesaron para la microscopía de inmunofluorescencia como se describe en el Ejemplo 3.

Resultados

Utilizando la estrategia descrita anteriormente solo podía detectarse la proteína PLVAP expresada en la superficie celular. Los resultados de estos experimentos revelaron que los anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY4 y KFCC-GY5 se unían a la superficie de las células endoteliales vasculares de CHC (las FIG. 23B,C), indicando que la proteína PLVAP se expresa en las superficies de estas células. Estos hallazgos sugieren que los anticuerpos que se unen de forma específica a PLVAP con alta afinidad tendrán la capacidad de unirse a la superficie de las células endoteliales vasculares de CHC tras la inyección en los vasos sanguíneos de un tumor de carcinoma hepatocelular.

Ejemplo 5: Los anticuerpos monoclonales anti PLVAP humana se unen a las proteínas PLVAP en especies de primates no humanos

40 Materiales y procedimientos

En primer lugar se prepararon portaobjetos de matriz tisular de acuerdo con las instrucciones del fabricante, horneando los portaobjetos a 60 °C durante 2 horas para eliminar la parafina de sellado. Después de eso, los portaobjetos se procesaron para la tinción inmunohistoquímica como se describe en el Ejemplo 2 (detección de PLVAP en tejidos fijados con formalina mediante IHQ). La única modificación fue que los portaobjetos se incubaron con los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y -GY5 1 µg/ml durante 48 minutos a 37 °C.

Resultados

Para determinar si los primates no humanos pueden utilizarse para evaluar la farmacocinética, la farmacodinámica y la toxicidad de los Acm KFCC-GY4 y KFCC-GY5, así como de otros anticuerpos obtenidos de estos Acm, se realizó la tinción por inmunohistoquímica de matrices de tejidos normales de ser humano, mono rhesus y mono cinomolgo fijados con formalina utilizando los anticuerpos KFCC-GY4 y KFCC-GY5 (FIG. 26). Los anticuerpos monoclonales anti PLVAP humana KFCC-GY4 y KFCC-GY5 se unieron en distintos tejidos tanto a las células endoteliales capilares de ser humano como de mono (cinomolgo y rhesus), con alto grado de similitud (FIG. 26). En las FIG. 27A-F2 se muestran

ejemplos de unión del anticuerpo KFCC-GY5 a cortes de glándula suprarrenal, riñón, cerebro e hígado de ser humano y de mono. También se utilizó anticuerpo monoclonal anti CD34 humana como un control positivo en cortes de tejido humano para destacar los vasos sanguíneos. Estos resultados indican que los monos rhesus y cinomolgo son adecuados para su uso en estudios de experimentos preclínicos de anticuerpos PLVAP.

5 **Ejemplo 6: Los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y KFCC-GY5 se unen a epítomos antigénicos entre los aminoácidos 282 y 482 en la región C terminal de la proteína PLVAP humana.**

Materiales y procedimientos

Clonación molecular

Se construyeron como sigue plásmidos que expresan las partes N terminal (aminoácidos 51-292) etiquetada con His o C terminal (aminoácidos 282-442) del dominio extracelular de PLVAP humana (aminoácidos 51-442). Se trató al PGEM[®]-T Easy-PLVAP₅₁₋₄₄₂ con *Eco* RV y *Stu* I, se autoligó y se generó el plásmido resultante pGEM[®]-T Easy-PLVAP₅₁₋₂₉₂. Para la construcción del plásmido pET-15b-PLVAP₅₁₋₂₉₂, se escindió de pGEM[®]-T Easy-PLVAP₅₁₋₂₉₂ un fragmento de ADNc que representa los restos de aminoácido 51 a 292 de PLVAP con los sitios de reconocimiento de NdeI/BamHI en los extremos y se insertó en pET-15b (Novagen). Para construir pET-15b-PLVAP₂₈₂₋₄₄₂, pET-15b-PLVAP₅₁₋₄₄₂ se trató con *Nde* I y *Sac* I, seguido de la ligación de los extremos romos utilizando ADN polimerasa T4. Las construcciones de expresión descritas anteriormente se verificaron mediante secuenciación de ADN y se transformaron en *Escherichia coli* (Rosetta-gami2(DE3)pLysS).

Expresión e inmunotransferencia de la proteína recombinante

Se indujo con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido 1 mM la expresión de las proteínas de fusión etiquetadas con His en células *Escherichia coli* Rosetta-gami2(DE3)pLysS durante 16 horas a 30 °C. Después de la inducción, las células bacterianas se sometieron a lisis con tampón de muestra Laemmli. Los lisados celulares resultantes se resolvieron por SDS-PAGE y se sometieron a tinción con azul de Coomassie e inmunotransferencia utilizando protocolos convencionales y los siguientes anticuerpos: anticuerpos primarios: KFCC-GY4, KFCC-GY5, Acm 2A7-6, Acm anti His (LTK Biotechnology, Taiwán). Las inmunotransferencias se revelaron mediante anticuerpos secundarios frente a IgG de ratón conjugados a fosfatasa alcalina de Chemicon, Inc. utilizando procedimientos convencionales.

Amplificación por PCR y exploración de bibliotecas

Se utilizaron los cebadores PLVAP *Sac* I F: 5'-CTCCAAGGTGGAGGAGCTGGC-3' (SEQ ID NO: 36) y PLVAP Stop Bam HI R: 5'-GGATCCTGAGCATATCCCTGCATCCTCC-3' (SEQ ID NO: 37) para amplificar la secuencia que codifica la parte C terminal del dominio extracelular de PLVAP (aminoácidos 282-442). La PCR se realizó utilizando el siguiente ciclo térmico: 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 56 °C durante 30 s y 72 °C durante 60 s. El ADN se purificó con el kit de purificación Qiaquick PCR (Qiagen, Surrey, RU) y después se utilizó en la construcción de una biblioteca de Novatope de PLVAP de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Novagen, Merck Biosciences Ltd., Beeston, RU). Brevemente, el producto de PCR purificado se digirió con ADNasa I en presencia de Mn²⁺ y los fragmentos entre 50-150 pares de bases (pb) se purificaron por gel utilizando un kit de extracción de gel (Qiagen). Se rellenaron los extremos de los fragmentos de ADN utilizando ADN polimerasa T4 y la polimerasa *Tth* para añadir un único resto dA a cada extremo 3', y después se ligó en el vector pScreen 1b(+)-T (Novagen), que está diseñado para expresar pequeños insertos como una fusión carboxilo terminal al gen de la proteína de la cápside 10 del fago bacteriano T7. La biblioteca se transformó en células NovaBlue (DE3) y se sembraron en placas en medio Luria-Bertani (LB) que contenía carbenicilina (50 µg/ml) y tetraciclina (12,5 µg/ml). La biblioteca de ADNc de PLVAP humana resultante se exploró (aproximadamente 10⁴ colonias para cada anticuerpo) utilizando el procedimiento descrito en el manual de Novatope: las colonias que expresaban los fragmentos de PLVAP se transfirieron a filtros de nitrocelulosa por contacto con la colonia durante 1 minuto. Las colonias bacterianas del filtro se lisaron incubando durante 15 min en una cámara de vapor de cloroformo sellada. Las proteínas se desnaturalizaron en solución de desnaturalización de colonias (Tris 20 mM pH 7,9, Urea 6 M, NaCl 0,5 M) durante 15 minutos y los filtros se bloquearon durante 30 min en gelatina al 1 % (p/v) en TBS con Tween 20 al 0,05 % (v/v) (TBS-T). Los residuos de las colonias se eliminaron secando con un pañuelo de papel y después se examinaron los filtros durante 1 h con anticuerpo monoclonal KFCC-GY4 y KFCC-GY5 (1 mg/ml) en TBS-T con gelatina al 0,5 % (p/v). Las transferencias se lavaron durante 15 min dos veces en TBS-T con gelatina al 0,5 % (p/v) y después se examinaron con una dilución 1/5000 de anti inmunoglobulina de ratón en cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Chemicon) en TBS-T con gelatina al 0,5 % (p/v). Después del lavado, las transferencias se desarrollaron utilizando sustrato bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitroazul de tetrazolio (BCIP; 33 µg/ml, NBT, 66 µg/ml) (Sigma). Las colonias positivas de cada exploración se sembraron en placas de LB con amp/tet recién preparadas y después se volvieron a examinar con anticuerpo monoclonal. Los positivos confirmados se utilizaron en minipreparaciones de ADN y los insertos del gen de PLVAP se secuenciaron utilizando el cebador terminador T7.

ELISA para el estudio de interferencia de la unión

Se recubrió cada pocillo de una placa ELISA durante una noche con 50 µl de anticuerpos monoclonales anti PLVAP KFCC-GY5 a una concentración de 5 µg/ml en PBS. Después del bloqueo y el lavado, se añadieron a cada pocillo

50 µl de proteína PLVAP recombinante (0,5 µg/ml). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos los pocillos se lavaron y se añadieron a cada pocillo por duplicado 50 µl de anticuerpo KFCC-GY4 biotinilado a distintas concentraciones y se incubó durante 30 minutos. Después de tres lavados, se revelaron los pocillos con 50 µl de conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante diluido y sustrato. Se midió para cada pocillo la densidad óptica a 450 nm. Cada valor era una media de los duplicados.

ELISA para la unión aditiva

Se recubrió cada pocillo de una placa de ELISA con 50 µl de proteína PLVAP recombinante 0,25 µg/ml. Los pocillos se bloquearon e incubaron con 50 µl de cada anticuerpo humanizado obtenido de KFCC-GY4 o KFCC-GY5, ya sea de forma separada o conjunta. La concentración final de cada anticuerpo fue de 0,01 µg/ml. Los valores eran un promedio de los duplicados.

Resultados

Para caracterizar adicionalmente los Acm KFCC-GY4 y KFCC-GY5, se realizó un mapeo epitópico para determinar los sitios antigénicos en PLVAP que une cada uno de estos anticuerpos. Los resultados iniciales demostraron que los epítopos antigénicos para ambos anticuerpos residen en la región C terminal de la proteína PLVAP, entre los aminoácidos 282 y 482 (las FIG. 28A, 28B y 28C). Los Acm KFCC-GY4 y KFCC-GY5 reaccionaron de forma positiva con PLVAP51-442 (carril 1) y PLVAP282-442 (carril 2), pero no reaccionaron con PLVAP51-292 (carril 3) o con proteína CEACAM6 humana, no relacionada con PLVAP (carril 4). Los resultados indican que los epítopos de ambos anticuerpos residen en el extremo C terminal de PLVAP, entre los restos de aminoácido 292 a 442.

Un estudio de mapeo más fino reveló que el Acm KFCC-GY4 reaccionaba con un clon de *E. coli* que expresa un péptido que abarca los aminoácidos 431 a 442 de PLVAP humana y el Acm KFCC-GY5 reaccionaba con un clon de *E. coli* que expresa un péptido que abarca los aminoácidos 378 a 404 de PLVAP humana. Como se representa en la Tabla 5, los epítopos para estos dos Acm no se solapan.

Tabla 5. Epítopos antigénicos para los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y KFCC-GY5
Secuencia de aminoácidos responsable del epítipo antigénico para el Acm KFCC-GY4:

Ser humano 431 SQRPPAGIPVAPSSG 442 (SEQ ID NO:38)
Ratón 426 SQRLPVVNPAQAQPSG 437 (SEQ ID NO:39)

Secuencia de aminoácidos responsable del epítipo antigénico para el Acm KFCC-GY5:

Ser humano 378 ELAIRNSALDTCIKTKSQPMMPVSRPM 404 (SEQ ID NO:40)
Ratón 375 EVDVRISALDTCVKAKSLPAVP-PRVS 400 (SEQ ID NO:41)

Los Acm KFCC-GY4 y KFCC-GY5 pudo cada uno unirse a PLVAP humana en un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) sin interferencia con la unión del otro anticuerpo (FIG. 29). Esta falta de interferencia también se observó utilizando anticuerpos monoclonales KFCC-GY4 y KFCC-GY5 combinados completamente humanizados (FIG. 30), lo que se describe en más detalle a continuación.

Ejemplo 7: Producción y caracterización de anticuerpos quiméricos que se unen de forma específica a PLVAP

Materiales y procedimientos

Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
CDR	Región Determinante de Complementariedad de la región variable de un anticuerpo (numeradas CDR1-3 para cada una de las cadenas pesada y ligera, según define Kabat).
Ec(0,1 %)	La Absorbancia de una solución de proteína 1 mg/ml
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FW	Región marco conservada - región de almacén de un dominio variable que sustenta las CDR
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IgG	Inmunoglobulina G
Acm	Anticuerpo monoclonal
DO a 280 nm	Densidad óptica medida a 280 nm
Proteína P	Proteína PLVAP
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
Región V	Región variable de una cadena de anticuerpo

Determinación inicial de las secuencias de la región variable

Se extrajo ARN total de 2×10^7 células de hibridoma cultivadas procedentes de las líneas celulares KFCC-GY4 y KFCC-GY5 utilizando reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para determinar la secuencia codificante de los dominios VH y VL de KFCC-GY4 y KFCC-GY5 se llevó a cabo RACE 5' utilizando el kit FirstChoice RLM-RACE (Ambion, Inc., Austin, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se trataron 10 µg del ARN extraído con fosfatasa de intestino de ternera (FIP) en una mezcla de reacción con un volumen total de 20 µl que contenía 2 µl de tampón FIP 10x y 2 µl de FIP durante 1 h a 37 °C. Después de la extracción con fenol/cloroformo, el ARN se precipitó con etanol y se resuspendió en 11 µl de agua sin nucleasas. Se trataron 5 µl del ARN tratado con FIP con pirofosfatasa ácida del tabaco (PAT) en 10 µl de mezcla de reacción que contenía 1 µl de tampón de PAT 10x y 2 µl de PAT, durante 1 h a 37 °C. Después se ligaron 2 µl del ARN tratado con FIP/PAT con 300 ng de adaptador de ARN con ARN ligasa T4, en una mezcla de reacción de 10 µl durante 1 h a 37 °C. Se utilizaron 2 µl del ARN ligado o de ARN control como un molde para sintetizar ADNc utilizando decámeros aleatorios con la transcriptasa inversa M-MLV durante 1 h a 42 °C. Los ADNc que correspondían con las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) variables se amplificaron después mediante PCR, de forma separada, con ADN polimerasa Taq Takara Ex (Takara Bio Inc., Osaka, Japón), utilizando el cebador directo externo de RACE 5', 5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3' (SEQ ID NO: 42) y los cebadores inversos complementarios a las secuencias de nucleótidos que codifican la región constante de la cadena kappa (5'-TCAACGTGAGGGTGCTGCTCATGC-3') (SEQ ID NO: 43) o la región CHI de la cadena pesada (5'-TTTCTTGTCACCTTGCTGCTGG-3') (SEQ ID NO: 44), respectivamente. Las mezclas de reacción de PCR se incubaron durante 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de amplificación, que comprendían la desnaturalización a 94 °C durante 30 s, el apareamiento a 57 °C durante 30 s y la extensión a 72 °C durante 1 min. La reacción se extendió durante otros 7 min a 72 °C para asegurar la extensión completa. Los productos de PCR se analizaron y purificaron a partir de un gel de agarosa al 1,5 % utilizando el kit de extracción de gel Qiaquick (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá). Los fragmentos de PCR purificados se clonaron en el vector plasmídico pGEM-T-easy (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Se sometieron al análisis por secuenciación de nucleótidos un mínimo de 5 clones independientes para cada cadena. Las CDR se identificaron de acuerdo con la definición de Kabat (las FIG. 15A,B y 16A,B).

Confirmación independiente de las secuencias de la región variable

Se extrajo de forma satisfactoria ARNm (Promega n.º de Catálogo Z5400) de células KFCC-GY4 y KFCC-GY5 congeladas. Se realizó la RT-PCR utilizando grupos de cebadores degenerados para secuencias señal murinas con un único cebador de región constante. Se amplificó el ARNm de la región variable de la cadena pesada utilizando un conjunto de seis grupos de cebadores degenerados (HA a HF) y se amplificó el ARNm de la región variable de la cadena ligera utilizando un conjunto de siete grupos de cebadores degenerados (kappaA a kappaG), el análisis de isotipado monoclonal de las IgG utilizando Isostrips de Roche (Roche n.º de Catálogo 493027001) reveló que ambas eran de los isotipos IgG1 / kappa. Se obtuvieron productos de amplificación con los grupos de cebadores de la cadena pesada y de la cadena ligera kappa, confirmando que la cadena ligera procede del clúster kappa. Se clonó cada producto y de cada uno se secuenciaron varios clones. Para los anticuerpos KFCC-GY4 y KFCC-GY5, para cada anticuerpo se identificaron secuencias funcionales únicas de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera.

Expresión de los anticuerpos quiméricos

Se transfirieron las regiones variables de KFCC-GY4 y KFCC-GY5 a un sistema de vector de expresión (Antitope) para la cadena pesada de IgG4 y la cadena ligera kappa. Se transfectaron células NS0 a través de electroporación y se seleccionaron utilizando metotrexato. Se identificaron varias colonias resistentes a metotrexato y se expandieron las líneas celulares positivas para la expresión de IgG. Se recuperó ADN genómico de las líneas celulares principales y se sometió a PCR y a secuenciación confirmatoria. Se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular las IgG4 KFCC-GY4 y KFCC-GY5 quiméricas de IgG en una columna de sefarsa de Proteína A (GE Healthcare n.º de Catálogo 110034-93) y se cuantificaron por DO a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción, $E_{c(0,1\%)}^1$, a base de la secuencia de aminoácidos predicha – se utilizaron valores de $E_{c(0,1\%)}^1$ de 1,484 y 1,334 para KFCC-GY4 y KFCC-GY5 quiméricos respectivamente. Se purificaron más de 2 mg de anticuerpo y se analizó por SDS-PAGE (FIG. 31). Se observaron las bandas que correspondían a los tamaños predichos de las cadenas pesada y ligera sin evidencia de contaminación.

Unión de los anticuerpos KFCC-GY4 y KFCC-GY5 quiméricos a PLVAP recombinante

Se evaluó en un ELISA de competición la unión de los anticuerpos KFCC-GY4 y KFCC-GY5 quiméricos a la proteína PLVAP recombinante. Se premezclaron series de diluciones del anticuerpo quimérico y de control de 30 µg/ml a 0,014 µg/ml (concentración final) con una concentración constante de KFCC-GY4 murino biotinilado (concentración final de 0,3 µg/ml) o se premezcló 10 µg/ml a 0,004 µg/ml (concentración final) con una concentración constante de KFCC-GY5 murino biotinilado (concentración final de 0,1 µg/ml), antes de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos Nunc Immuno MaxiSorp (Fisher n.º de Catálogo DIS-971-030J) prerrecubierta con proteína PLVAP recombinante 1 µg/ml diluida en PBS. La unión del Acm biotinilado se determinó mediante la detección con estreptavidina-HRP y sustrato TMB.

Resultados

Las regiones variables de los anticuerpos monoclonales anti PLVAP de ratón KFCC-GY4 y KFCC-GY5 se clonaron y secuenciaron de forma satisfactoria. Se identificaron en cada anticuerpo tres regiones determinantes de complementariedad (las CDR) de acuerdo con la definición de Kabat. El análisis de las secuencias obtenidas de los hibridomas KFCC-GY4 y KFCC-GY5 a partir de los estudios de confirmación se resumen en las Tablas 6 y 7. Estas secuencias coincidieron con las secuencias obtenidas por la caracterización inicial (las FIG. 15A,B y 16A,B), con la excepción de una única falta de coincidencia silenciosa en la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de KFCC-GY4. La transcripción anómala (número de referencia de GenBank M35669) asociada habitualmente con el compañero de fusión del hibridoma SP2/0 también se detectó en ambas líneas celulares.

Tabla 6: Análisis de secuencia del anticuerpo monoclonal KFCC-GY4

	Cadena P	Cadena L
Longitud de CDR 1	5 aa	16 aa
Longitud de CDR 2	17 aa	7 aa
Longitud de CDR 3	4 aa	9 aa
Línea germinal de ser humano más cercana^b	IGHV1-f*01 (64 %)	IGKV2D-30*01 (82 %)
FW1 de ser humano más cercana^b	IGHV1-46*03 (68 %)	IGKV2D-29*02 (87 %)
FW2 de ser humano más cercana^b	IGHV7-4-1*03 (71 %)	IGKV2D-30*01 (80 %)
FW3 de ser humano más cercana^b	IGHV1-f*01 (70 %)	IGKV2D-40*01 (94 %)
J de ser humano más cercana^b	IGHJ6*01 (91 %)	IGKJ4 (90 %)
Máximo n.º de restos de FR de ratón^c	13(4)	4 (1)

Tabla 7: Análisis de secuencia del anticuerpo monoclonal KFCC-GY5

	Cadena P	Cadena L
Longitud de CDR 1	5 aa	16 aa
Longitud de CDR 2	17 aa	7 aa
Longitud de CDR 3	4 aa	9 aa
Línea germinal de ser humano más cercana^b	IGHV1-46*03 (68 %)	IGKV2D-29*02 (80 %)
FW1 de ser humano más cercana^b	IGHV7-4-1*02 (76 %)	IGKV2D-30*01 (83 %)
FW2 de ser humano más cercana^b	IGHV7-4-1 *02 (79 %)	IGKV2D-40*01 (93 %)
FW3 de ser humano más cercana^b	IGHV1-69*10 (72 %)	IGKV2D-40*01 (91 %)
J de ser humano más cercana^b	IGHJ6*01 (91 %)	IGKJ2 (90 %)
Máximo n.º de restos de FR de ratón^c	9(3)	2(2)
^a definiciones de CDR y numeración de secuencia de acuerdo con Kabat		
^b ID(s) de línea germinal indicado seguido de % de homología		
^c Indica el número máximo de restos de ratón que necesitan proveerse de segmentos de secuencia de ser humano con los número de los posiblemente críticos para la afinidad, indicado entre paréntesis		

Los genes de la región variable se combinaron después con las regiones constantes de la cadena pesada y de la cadena ligera kappa de IgG4 y se expresaron en células NS0 para producir anticuerpos anti PLVAP quiméricos. Para llevar a cabo esto, se construyeron vectores plasmídicos que portaban las cadenas pesada y ligera quiméricas de KFCC-GY4 y las cadenas pesada y ligera quiméricas de KFCC-GY5 (las FIG. 32A-C, 33A,B, 34A-C y 35A,B). Estos plásmidos se utilizaron para transfectar células NS0. Se clonaron las células que producían anticuerpo quimérico y que estaban transfectadas de forma estable.

Las regiones variables de la cadena pesada y ligera para el anticuerpo KFCC-GY4 mostraron buena homología con las secuencias de línea germinal de ser humano más cercana (el 64 % y el 80 % respectivamente para KFCC-GY4) y las secuencias de la regiones marco conservadas individuales tuvieron homólogos cercanos en la base de datos de líneas germinales de ser humano. Esto, por lo tanto, reduce el grado de modificación por ingeniería genética que se necesita emprender para obtener un anticuerpo humanizado satisfactorio. El número máximo de restos de la región marco conservada de ratón que necesitarán abastecerse de segmentos de secuencia de ser humano para la cadena

pesada de KFCC-GY4 es de 13, siendo probablemente cruciales 4 restos de restricción para el mantenimiento de la actividad de unión. El número máximo de restos de la región marco conservada de ratón que se necesitarán proveer de segmentos de secuencia de ser humano para la cadena ligera de KFCC-GY4 es de 4, con 1 resto de restricción que se cree que es crítico para la actividad (Tabla 6).

- 5 Las regiones variables de la cadena pesada y la ligera para el anticuerpo KFCC-GY5 también mostraron buena homología con las secuencias de la línea germinal de ser humano más cercanas (el 68 % y el 80 % respectivamente para KFCC-GY5) y las secuencias de la regiones marco conservadas individuales tuvieron homólogos cercanos en la base de datos de línea germinal de ser humano. Esto, por lo tanto, reduce el grado de modificación por ingeniería genética que se necesita emprender para obtener un anticuerpo humanizado satisfactorio. El número máximo de
10 restos de la región marco conservada de ratón que se necesitarán proveer a partir de segmentos de secuencia de ser humano para la cadena pesada es de 9, probablemente siendo cruciales 3 restos de restricción para el mantenimiento de la actividad de unión. El número máximo de restos de la región marco conservada de ratón que se necesitará proveer a partir de segmentos de secuencia de ser humano para la cadena ligera es de 2, creyendo que ambos son críticos para la actividad (Tabla 7). El análisis por Composite Human Antibody™ (Antitope; Cambridge, RU) reveló que
15 puede encontrarse que los segmentos de la región marco conservada humana incluyen todos los restos de ratón convenientes y, por lo tanto, los anticuerpos humanizados completos pueden construirse a partir de ambos moldes.

Se utilizó un ensayo de ELISA de competición para demostrar que las eficiencias de unión de los anticuerpos quiméricos para PLVAP son similares a las de los anticuerpos murinos parentales respectivos. Los anticuerpos IgG4-GY4 quimérico y KFCC-GY4 murino tenían perfiles de unión muy similares, con valores de CI50 de 0,80 µg/ml y 0,98 µg/ml respectivamente (FIG. 36). De manera similar, los anticuerpos IgG4-GY5 quimérico y KFCC-GY5 murino también tenían perfiles de unión muy similares, con valores de CI50 de 0,40 µg/ml y 0,49 µg/ml respectivamente (FIG. 37). Por lo tanto, se identificaron y clonaron las secuencias de la región variable correctas para los anticuerpos monoclonales murinos parentales.

25 También se determinaron las afinidades de unión utilizando el sistema Bia T-100 de Biacore. Se determinó que los anticuerpos KFCC-GY4 y KFCC-GY5 quiméricos tenían afinidades de unión más altas por PLVAP que sus respectivos Acm parentales (Tabla 8). Los dos anticuerpos monoclonales quiméricos obtenidos de KFCC-GY4 y KFCC-GY5 también se denominan en el presente documento como CSR01 y CSR02, respectivamente.

Tabla 8. Afinidades de unión de los anticuerpos monoclonales KFCC-GY4, KFCC-GY5, KFCC-GY4 quimérico (CSR01) y KFCC-GY5 quimérico (CSR02).

Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Kd (M)
GY4	1,51x10 ⁴	7,01x10 ⁻³	4,64x10 ⁻⁷
GY4 quimérico (CSR01)	5,21x10 ³	2,12x10 ⁻³	4,06x10 ⁻⁷
GY5	6,93x10 ³	4,14x10 ⁻⁴	5,98x10 ⁻⁸
GY5 quimérico (CSR02)	3,07x10 ⁴	3,01x10 ⁻⁵	9,78x10 ⁻¹⁰

ka: velocidad de asociación; kd: velocidad de disociación;
Kd: constante de disociación (afinidad de unión).

30 **Ejemplo 8: Producción y caracterización de anticuerpos completamente humanizados que se unen de forma específica a PLVAP**

Materiales y procedimientos

Visión general

35 Se construyeron tres cadenas ligeras kappa distintas y dos cadenas pesadas distintas a base de las secuencias del ADNc del anticuerpo quimérico KFCC-GY4 (CSR01). Se utilizaron para transfectar la línea celular NSO para la producción de anticuerpos humanizados combinados. Se generaron cinco líneas celulares distintas para la producción de cinco anticuerpos monoclonales. De manera similar, se construyeron dos cadenas ligeras kappa distintas y dos cadenas pesadas distintas a base de las secuencias del ADNc del anticuerpo quimérico KFCC-GY5 (CSR02). Se obtuvieron cuatro líneas celulares que producen cuatro anticuerpos monoclonales distintos. Las secuencias de
40 nucleótidos de los dominios variables de estas cadenas pesadas y ligeras humanizadas se resumen en las FIG. 38A-E y 39A-D. En la FIG. 40 se muestra un diagrama de flujo de la obtención de los anticuerpos quiméricos y de los anticuerpos combinados completamente humanizados.

Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
BLAST, CDR	Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico. Región determinante de complementariedad de una región variable de un anticuerpo (numeradas CDR1-3 para cada una de las cadenas pesada y ligera, como define Kabat).
Ec(0,1 %)	La absorbancia de una solución de proteína 1 mg/ml
ELISA, FW, HRP, IgG	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, región marco conservada - región armazón de un dominio variable que sustenta a las CDR, peroxidasa de rábano picante, inmunoglobulina G
Acm	Anticuerpo monoclonal
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
DO a 280 nm	Densidad óptica medida a 280 nm
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
Región V	Región variable de una cadena de anticuerpo
Proteína P	Proteína PLVAP

Diseño de las secuencias de la región variable del anticuerpos humano

- Se produjeron modelos estructurales de las regiones variables (V) de KFCC-GY4 y KFCC-GY5 de ratón utilizando Swiss PDB y se analizaron para identificar los aminoácidos de "restricción" importantes en las regiones V de ratón, que probablemente eran esenciales para las propiedades de unión del anticuerpo. Se consideraron como importantes los restos contenidos dentro de las CDR (utilizando tanto la definición de Kabat como la de Chothia), junto con varios restos del armazón. Tanto las secuencias de VH como de VK de KFCC-GY4 y KFCC-GY5 contenían restos del armazón típicos. Mientras que los motivos CDR1 y 2 de ambos anticuerpos eran comparables con muchos anticuerpos murinos, se observó que el CDR3 de la VH para ambos anticuerpos era inusualmente corto. A partir del análisis anterior se consideró que las secuencias de ser humano combinadas de KFCC-GY4 y KFCC-GY5 podían crearse con una gran amplitud de alternativas fuera de los CDR, pero solo con una pequeña variedad de posibles restos alternativos dentro de las secuencias de CDR. El análisis preliminar indicó que para crear las CDR similares o idénticas a las de las secuencias de ratón podían combinarse los segmentos de secuencia correspondientes procedentes de varios anticuerpos de ser humano. Para regiones fuera de o flanqueando las CDR, se identificó como posibles componentes de las nuevas regiones variables de anticuerpo de ser humano una amplia selección de segmentos de secuencia de ser humano.

Evitación de epítipo y diseño de variantes

- Basándose en el análisis anterior, se seleccionó un gran conjunto preliminar de segmentos de secuencia que podían utilizarse para crear las variantes de los anticuerpos de ser humano KFCC-GY4 y KFCC-GY5, y se analizaron utilizando la tecnología iTope™ para el análisis de la unión de péptidos a los alelos del MHC de clase II de ser humano y utilizando la TCED™ (Base de datos de Epítopos de Linfocitos T) de epítopos de linfocitos T relacionados con la secuencia de anticuerpos conocidos (Antitope Ltd., Cambridge, RU). Se descartaron los segmentos de secuencia en donde se identificaron péptidos que se unen al MHC de clase II que no es de ser humano significativos o que puntuaron aciertos significativos frente al TCED™. Esto dio como resultado un conjunto reducido de segmentos y las combinaciones de estos se analizaron otra vez, como anteriormente, para asegurar que las uniones entre segmentos no contenían posibles epítopos de linfocitos T. Después se combinaron los segmentos seleccionados para producir secuencias de regiones variables de la cadena pesada y ligera para la síntesis. Para cada anticuerpo se construyeron cinco cadenas pesadas y tres cadenas ligeras, con las secuencias que se detallan en las FIG. 41A-E y 42A-C (para KFCC-GY5) y las FIG. 43A-E y 44A-C (para KFCC-GY4) y los alineamientos de secuencia que se detallan en las FIG. 45 y 46.

Construcción, expresión y purificación de los anticuerpos variantes

- Se sintetizaron los genes de las regiones VH y VK del anticuerpo de ser humano de variante 1 inicial para KFCC-GY4 y KFCC-GY5 utilizando una serie de oligonucleótidos solapantes que se aparearon, ligaron y amplificaron por PCR para proporcionar regiones V sintéticas de longitud completa. Las posteriores variantes de secuencia de anticuerpo de ser humano se construyeron utilizando oligonucleótidos solapantes largos y PCR, utilizando la variante 1 inicial como molde. Después, se clonaron las variantes ensambladas de forma directa en el sistema de vector de expresión pANT (Antitope, Ltd., Cambridge, RU) para las cadenas pesadas y las cadenas ligeras kappa de IgG4. Todas las combinaciones de cadenas pesadas y ligeras combinadas (es decir, un total de 15 emparejamientos) se transfectaron de forma estable en células NS0 a través de electroporación y se seleccionaron utilizando metotrexato 200 nM (Sigma n.º de catálogo M8407-500MG). Se analizaron los niveles de expresión de IgG de las colonias resistentes a

metotrexato para cada construcción y las líneas con la mejor expresión se seleccionaron y congelaron en nitrógeno líquido. Las variantes de IgG4 para KFCC-GY4 y KFCC-GY5 se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular en una columna de sefarsa de Proteína A (GE Healthcare n.º de Catálogo 110034-93) y se cuantificaron por la DO a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción, $E_{c(0,1\%)}$, a base de la secuencia de aminoácidos predicha (Tabla 9). Se purificaron más de 2 mg de anticuerpo y se analizó mediante SDS-PAGE (las FIG. 47A,B). Se observaron bandas que correspondían a los tamaños predichos para las cadenas pesada y ligera, sin evidencia de contaminación.

Tabla 9: Valores de $E_{c(0,1\%)}$ para las variantes de los anticuerpos KFCC-GY4 y KFCC-GY5

Variante		$E_{c(0,1\%)}$
Quimera de GY4		1,48
Variantes de GY4 (todas)		1,49
Quimera de GY5		1,33
Variantes de GY5	VH4/VK2	1,33
	VH5/VK2	
Variantes de GY5	VH4/VK3	1,35
	VH5/VK3	

Además, se transfectaron de forma transitoria células CHO-K1 utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen n.º 11668-019). 72 horas después de la transfección se recogieron los medios celulares para la purificación de anticuerpo. Brevemente, se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular las variantes del anticuerpo IgG4 de ser humano de las infecciones transitorias en una columna de sefarsa de Proteína A (Sigma n.º de Catálogo P3391-1.5G) y se cuantificaron utilizando un ELISA de captura de Fc/detección de cadena kappa (Sigma n.º de Catálogo 16260 y A7164) frente a un patrón de IgG4 de ser humano/kappa (Sigma n.º de catálogo 14639). Una observación general fue que el número de clones de NS0 que expresaban era significativamente inferior para los clones del linaje KFCC-GY4 cuando se comparaba con los clones del linaje KFCC-GY5. Además, también se observó que las producciones estable y transitoria fueron inferiores para los clones del linaje KFCC-GY4 en comparación con KFCC-GY5. En algunos casos, las producciones transitorias de los linajes de KFCC-GY4 no fueron suficientes para permitir la caracterización completa de las variantes y, así, todos los análisis posteriores se llevaron a cabo utilizando material purificado de NS0 a partir de líneas celulares estables.

Unión de los anticuerpos variantes a la proteína PLVAP recombinante

La unión de las variantes de los anticuerpos de ser humano KFCC-GY4 y KFCC-GY5 a PLVAP recombinante se evaluó en un ELISA de competición. Se premezclaron una serie de diluciones de 30 µg/ml a 0,014 µg/ml (concentración final) del anticuerpo variante o del control, con una concentración constante de KFCC-GY4 murino biotinilado (concentración final de 0,3 µg/ml) o se premezclaron de 10 µg/ml a 0,004 µg/ml (concentración final) con una concentración constante de KFCC-GY5 murino biotinilado (concentración final de 0,1 µg/ml), antes de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos Immuno MaxiSorp de Nunc (Fisher n.º de Catálogo DIS-971-030J) prerrecubierta con "proteína P" recombinante diluida 1 µg/ml en PBS. La unión del Acm biotinilado se determinó mediante la detección con estreptavidina-HRP y sustrato TMB. Después de finalizar la reacción con HCl 3 M, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placa MRX TC II de Dynex Technologies y las curvas de unión de los anticuerpos analizados se compararon frente a los patrones de referencia de ratón.

Titulación de la unión de los anticuerpos monoclonales anti PLVAP combinados completamente humanizados y quiméricos a PLVAP

Se recubrió cada pocillo de una placa de ELISA con 50 µl de proteína PLVAP recombinante 2,5 µg/ml en PBS. Después del lavado y el bloqueo, cada pocillo se incubó con una concentración distinta de anticuerpo monoclonal humanizado (0,5 µg/ml a 0,0025 µg/ml) durante 60 minutos a temperatura ambiente. La unión del anticuerpo a PLVAP se midió utilizando anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG4 de ser humano conjugado de fosfatasa alcalina (BD Pharmingen) diluido 1000x

Resultados

Las cinco variantes principales de los anticuerpos IgG4-GY4 y KFCC-GY4 murino tenían perfiles de unión muy similares (FIG. 48). En la Tabla 10 se muestran los valores de CI50 absolutos y los valores relativos con respecto al Acm KFCC-GY4 para las cinco variantes principales. Todas las variantes principales mostradas están dentro de dos veces la del anticuerpo monoclonal murino original.

De forma similar, las cuatro variantes principales de los anticuerpos IgG4-GY5 y KFCC-GY5 murino tenían perfiles de unión muy similares (FIG. 49). En la Tabla 11 se muestran los valores de CI50 absolutos y los valores relativos con respecto al Acm KFCC-GY5 para las cinco variantes principales. Todas las variantes principales mostradas están

dentro de dos veces la del anticuerpo monoclonal murino original.

Tabla 10: Valores de CI₅₀ de la preparación de las variantes de Composite Human Antibody™ KFCC-GY4

Anticuerpo	CI ₅₀ (µg/ml)	CI ₅₀ (proporción en comparación con el Acm GY4)
Acm GY4	1,82	1
VH4/VK2	2,53	1,39
VH4/VK3	2,94	1,61
VH5/VK1	2,18	1,20
VH5/VK2	1,91	1,05
VH5/VK3	2,82	1,55

Las variantes de Composite Human Antibody™ de GY4 se purificaron a partir de sobrenadante de NS0 transfectadas de forma estable y se analizaron en un ensayo de competición con el Acm KFCC-GY4 biotinilado. Se presentan los valores de CI₅₀ y también están normalizados frente a la unión del Acm KFCC-GY4 de referencia.

Tabla 11: Valores de CI₅₀ de las variantes de Composite Human Antibody™ KFCC-GY5

Anticuerpo	CI ₅₀ (µg/ml)	CI ₅₀ (proporción en comparación con el Acm GY5)
Acm GY5	0,38	1
VH4/VK2	0,56	1,47
VH4/VK3	0,43	1,13
VH5/VK2	0,60	1,58
VH5/VK3	0,41	1,08

Las variantes de Composite Human Antibody™ GY5 se purificaron a partir de sobrenadante de NS0 transfectadas de forma estable y se analizaron en un ensayo de competición con Acm KFCC-GY5 biotinilado. Se presentan los valores de CI₅₀ y también están normalizados frente a la unión del Acm KFCC-GY5 de referencia.

Los anticuerpos humanizados combinados obtenidos de los anticuerpos KFCC-GY4 y KFCC-GY5 fueron capaces de unirse a la proteína PLVAP (FIG. 50). Los anticuerpos combinados completamente humanizados a partir de KFCC-GY4 quimérico (CSR01) se unen peor que CSR01 quimérico. Por el contrario, los anticuerpos combinados completamente humanizados a partir de KFCC-GY5 quimérico (CSR02) se unen más o menos igual de bien que CSR02 quimérico.

Para confirmar que los anticuerpos completamente humanizados a partir de KFCC-GY4 (CSR01) y KFCC-GY5 (CSR02) pueden unirse a PLVAP sin interferir con la unión del otro, se realizó un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) *in vitro* para demostrar que algunos de los anticuerpos combinados completamente humanizados a partir de CSR01 y CSR02 eran efectivamente aditivos en la unión a PLVAP (FIG. 30).

La unión de los anticuerpos humanizados a las proteínas PLVAP expresadas en células endoteliales vasculares de cordón umbilical humano se evaluaron mediante estudios de inmunofluorescencia. Todos los anticuerpos humanizados analizados en estos estudios tuvieron la capacidad de unirse a células endoteliales (las FIG. 51A-C, 52A-G y 53A-E). Estos resultados indican que los anticuerpos humanizados que se unen a estos dos epítomos pueden utilizarse como agentes terapéuticos o diagnósticos de forma independiente, o juntos por su efecto aditivo, si se necesita.

En resumen, los resultados del estudio descrito en los Ejemplos en el presente documento demuestran que pueden desarrollarse anticuerpos monoclonales murinos frente a dos epítomos antigénicos bien definidos distintos en el dominio extracelular de la proteína PLVAP humana. Se han identificado las secuencias de aminoácidos de estos dos epítomos. La unión de estos anticuerpos a los dos epítomos identificados en PLVAP no interfiere con la del otro y puede ser aditiva. Por lo tanto, estos anticuerpos y los anticuerpos obtenidos de ellos pueden utilizarse como agentes terapéuticos o diagnósticos de forma individual o juntos por su efecto aditivo, si se necesita. Se han identificado las CDR responsables de la unión antigénica. Esta información se ha utilizado de forma satisfactoria para humanizar los anticuerpos monoclonales murinos anti PLVAP para el tratamiento del cáncer de hígado en sujetos humanos y como para reducir la antigenicidad.

Ejemplo 9: Desarrollo de un ensayo de diagnóstico para la detección de los concentraciones de PLVAP en suero

Materiales y procedimientos

ELISA de PLVAP

1. Cada pocillo de una placa de ELISA se recubrió con 50 µl de Acm KFCC-GY4 a 5 µg/ml durante una noche. El anticuerpo se preparó en tampón PBS 1x que contenía azida de sodio al 0,02 %.
2. Después de lavar tres veces cada pocillo con 200 µl de tampón de lavado (PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %), cada pocillo se bloqueó con 200 µl de tampón de bloqueo (tampón de lavado que contenía seroalbúmina bovina al 2 %) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Después del bloqueo los pocillos se lavaron tres veces.
4. Se añadieron 50 µl de los patrones de PLVAP y de las muestras de suero diluido a los pocillos designados por duplicado, y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los patrones y las muestras de suero se diluyeron en tampón de bloqueo.
5. Los pocillos se lavaron tres veces y se añadieron 50 µl de Acm KFCC-GY5 biotinilado a 0,25 µg/ml.
6. Después de la incubación durante 30 minutos todos los pocillos se lavaron tres veces.
7. Se añadieron a cada pocillo 50 µl de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Pierce, Inc, n.º de catálogo: N100) diluido 2500x y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Después de tres lavados se añadieron 100 µl de sustrato OPD preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma, Inc. n.º de catálogo: P-6787) y se incubó durante una duración óptima de tiempo.
9. La incubación se finalizó añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 0,18 M.
10. Las mediciones de DO se tomaron a 570 nm.

Resultados

- 20 Los anticuerpos monoclonales anti PLVAP humana KFCC-GY4 y KFCC-GY5 murinos se utilizaron para establecer un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para medir la concentración de la proteína de PLVAP en suero. Para capturar la proteína PLVAP en suero se utilizó el anticuerpo KFCC-GY4 para recubrir una placa de ELISA y para detectar la proteína PLVAP capturada por el anticuerpo KFCC-GY4 se utilizó el anticuerpo KFCC-GY5 biotinilado. Como patrón de referencia se utilizó la proteína PLVAP recombinante. Como muestra la curva patrón del ELISA de PLVAP (FIG. 54), la sensibilidad para este ensayo es de aproximadamente 50 ng/ml. Cuando se ensayaron dos muestras de suero procedentes de dos pacientes de cáncer de hígado en dos diluciones (2x y 4x), ambas tenían concentraciones de PLVAP medibles (450 ng/ml y 360 ng/ml) y eran comparables con la curva patrón. En el plasma de dos individuos sanos no se detectó PLVAP medible. Por lo tanto, este ensayo puede utilizarse en aplicaciones diagnósticas para ensayar las concentraciones de PLVAP en suero.

30

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo se une a la proteína asociada a vesículas de membrana plasmática humana (PLVAPh) y comprende:
 - a) al menos una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 86; y
 - b) al menos una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 92.
2. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico codifica un dominio pesado variable que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 76 u 86; y un dominio ligero variable que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 72 o 92.
3. El ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el ácido nucleico está aislado.
4. Un vector que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el vector de la reivindicación 4.
6. La célula hospedadora de la reivindicación 5, en la que la célula está aislada.
7. Un procedimiento de fabricación de un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a la proteína asociada a vesículas de membrana plasmática humana (PLVAPh), que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 5 o la reivindicación 6 en condiciones para expresar el anticuerpo y aislar el anticuerpo.

Algoritmo para la identificación de genes de expresión diferencial extrema

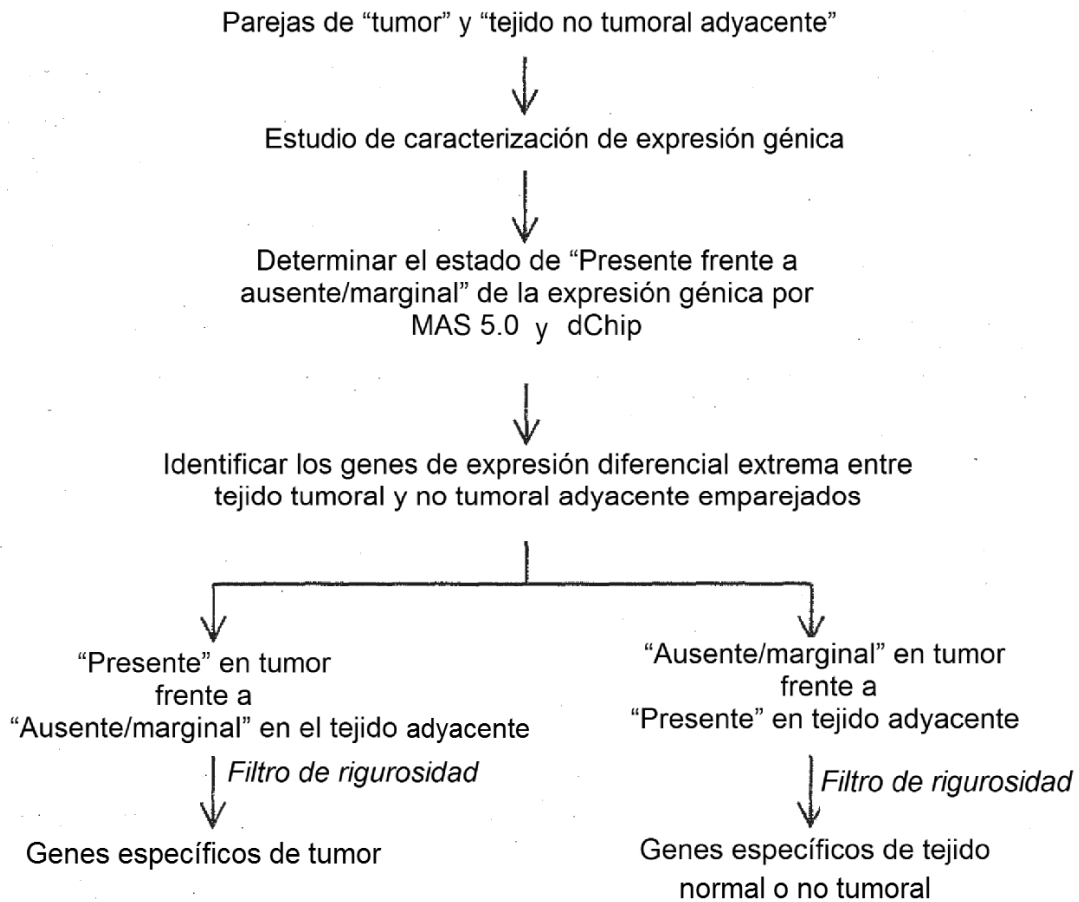


FIG. 1

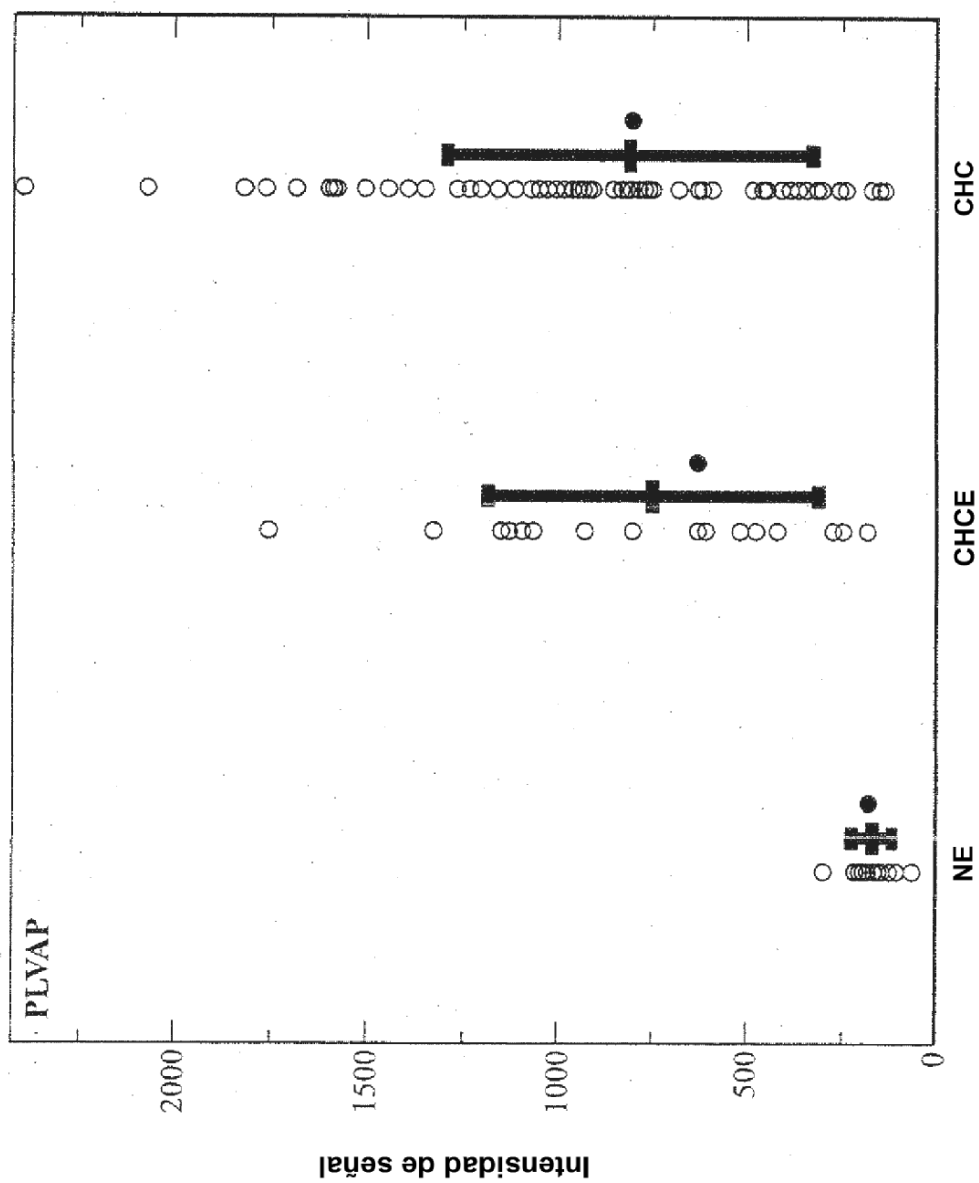


FIG. 2

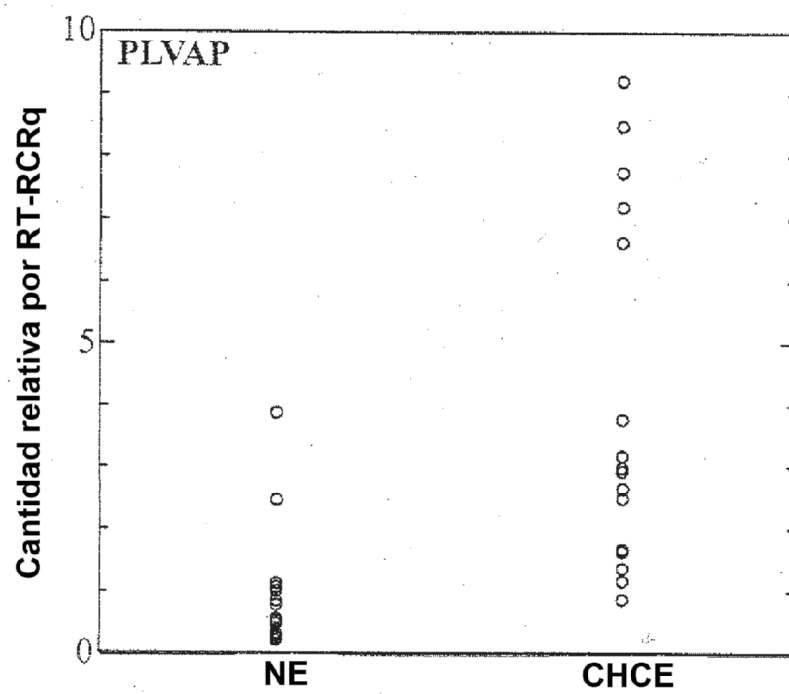
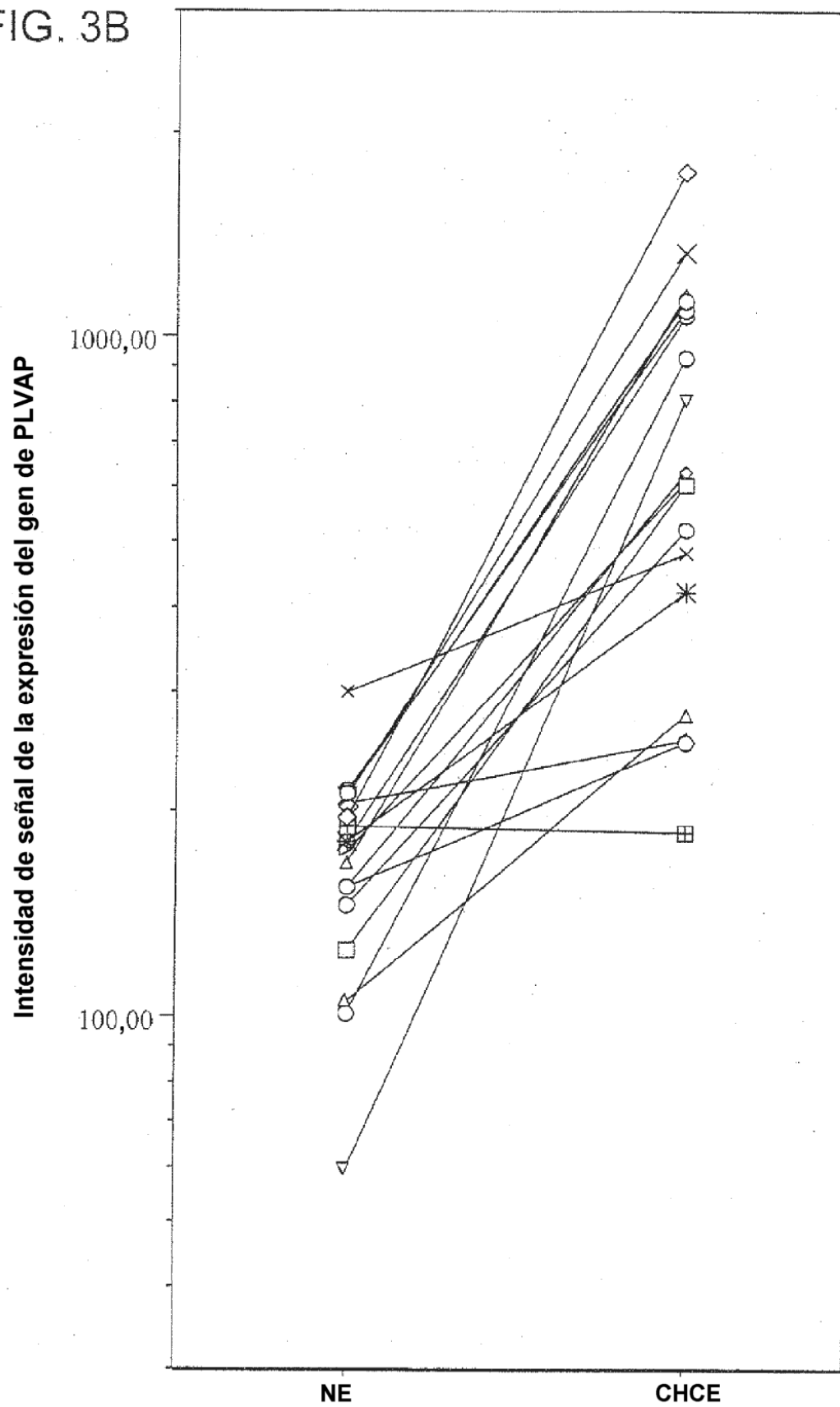


FIG. 3A

FIG. 3B



1 atgggcagcagccatcatcatcatcacagcagcggcctgggtg
 M G S S H H H H H S S G L V
 46 ccgcgcggcagccatatgaacgtgcacgtgagcacagagtccaac
 P R G S H M N V H V S T E S N
 91 ctgcaggccaccgagcgcgcgagccgagggcctatacagtcagctc
 L Q A T E R R A E G L Y S Q L
 136 ctagggtcacggcctcccagtcaccaacttgaccaaggagctcaac
 L G L T A S Q S N L T K E L N
 181 ttcaccacccgcgcccaaggatgccatcatgcagatgtggctgaat
 F T T R A K D A I M Q M W L N
 226 gctcgcgcgcacctggacgcgcacatcaatgccagcttccgcacagtgc
 A R R D L D R I N A S F R Q C
 271 cagggtgaccgggtcatctacaagaacaatcagaggtacatggct
 Q G D R V I Y T N N Q R Y M A
 316 gccatcatcttgagtgagaagcaatgcagagatcaattcaaggac
 A I I L S E K Q C R D Q F K D
 361 atgaacaagagctgcgatgccttgctcttcatgctgaatcagaag
 M N K S C D A L L F M L N Q K
 406 gtgaagacgctggaggtggagatagccaaggagaagaccatttgc
 V K T L E V E I A K E K T I C
 451 actaaggataaggaaagcgtgctgctgaacaaacgcgtggcggag
 T K D K E S V L L N K R V A E
 496 gaacagctgggttgaatgcgtgaaaacccgggagctgcagcaccaa
 E Q L V E C V K T R E L Q H Q
 541 gagcgccagctggccaaggagcaactgcaaaaggtgcaagccctc
 E R Q L A K E Q L Q K V Q A L
 586 tgcctgcccctggacaaggacaagtttgagatggaccttcgtaac
 C L P L D K D K F E M D L R N
 631 ctgtggagggaactocattatcccacgcagcctggacaacctgggt
 L W R D S I I P R S L D N L G
 676 tacaacctctaccatcccctgggctcggaattggcctccatccgc
 Y N L Y H P L G S E L A S I R
 721 agagcctgcgaccacatgcccagcctcatgagctccaaggtggag
 R A C D H M P S L M S S K V E
 766 gagctggcccgagcctccgggcggatatacgaacgcgtggcccg
 E L A R S L R A D I E R V A R
 811 gagaactcagacctccaacgccagaagctggaagcccagcagggc
 E N S D L Q R Q K L E A Q Q G
 856 ctgcggggccagtcaggaggcgaaacagaaggtggagaaggaggct
 L R A S Q E A K Q K V E K E A
 901 caggcccgggaggccaagctccaagctgaatgctcccggcagacc
 Q A R E A K L Q A E C S R Q T

FIG. 4A

```

946 cagctagcgctggaggagaaggcggtgctgcggaaggaacgagac
    Q L A L E E K A V L R K E R D
991 aacctggccaaggagctggaagagaagaagagggaggcggagcag
    N L A K E L E E K K R E A E Q
1036 ctcaggatggagctggccatcagaaactcagccctggacacctgc
    L R M E L A I R N S A L D T C
1081 atcaagaccaagtgcgagccgatgatgccagtgtcaaggcccatg
    I K T K S Q P M M P V S R P M
1126 ggccctgtccccaacccccagcccatcgacccagctagcctggag
    G P V P N P Q P I D P A S L E
1171 gagttcaagaggaagatcctggagtcccagaggccccctgcaggc
    E F K R K I L E S Q R P P A G
1216 atccctgtagcccatccagtggctga
    I P V A P S S G * (SEQ ID NO:2)
    ggaggctccaggcctgaggaccaagggatggcccgactcggcgggt

    ttgcggaggatgcagggatatgctcacagggatttc (SEQ ID NO:1)

```

FIG. 4B

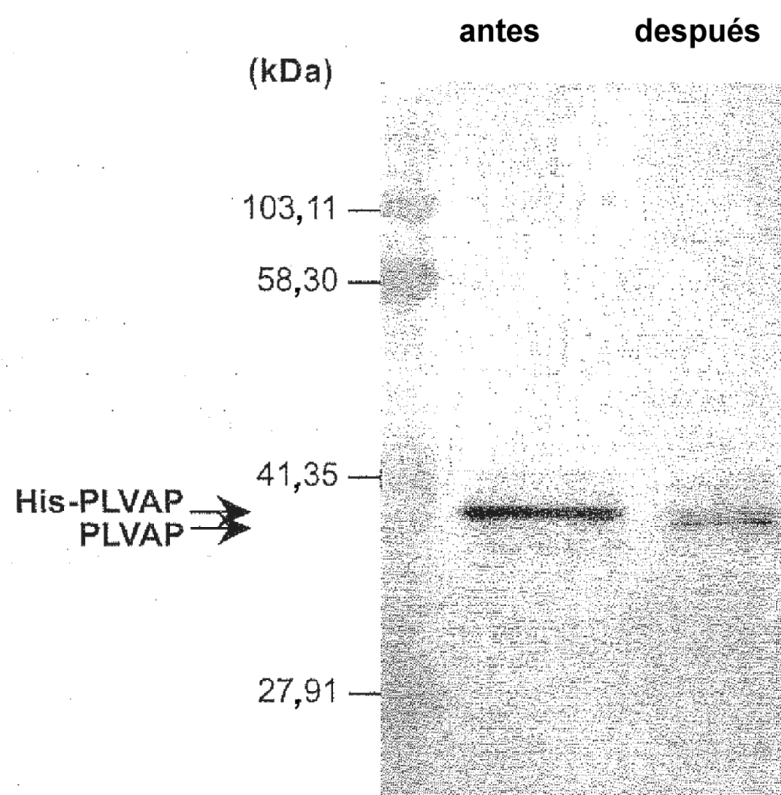
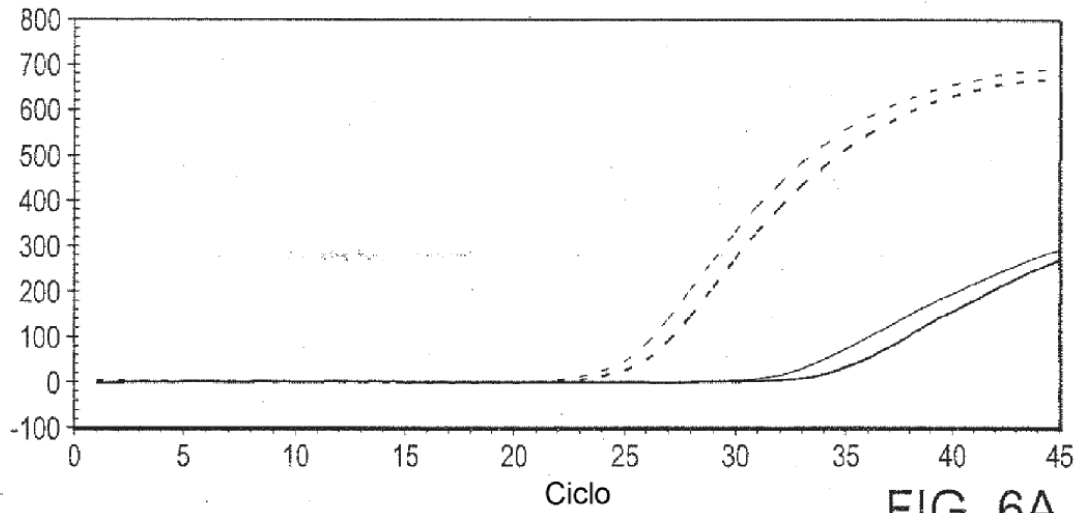
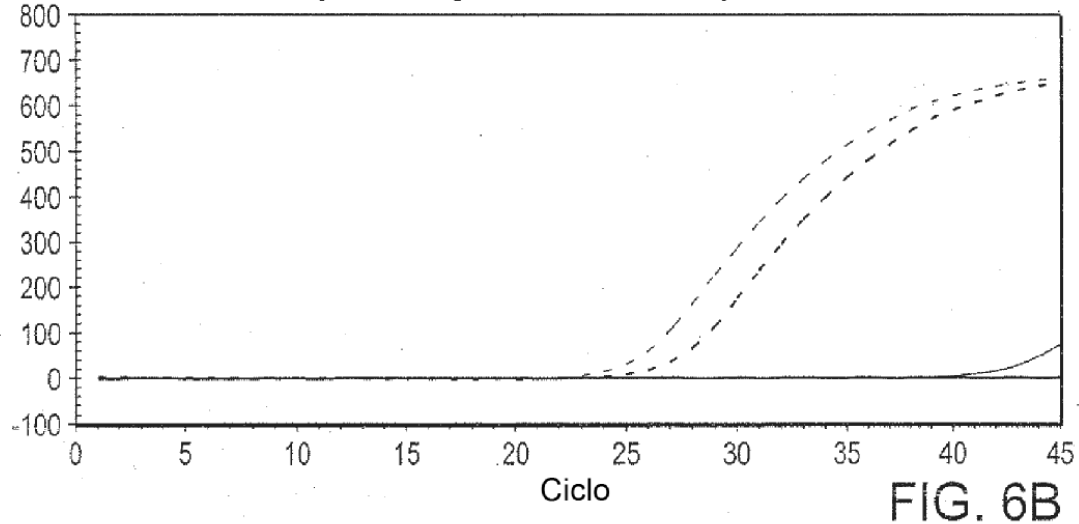


FIG. 5

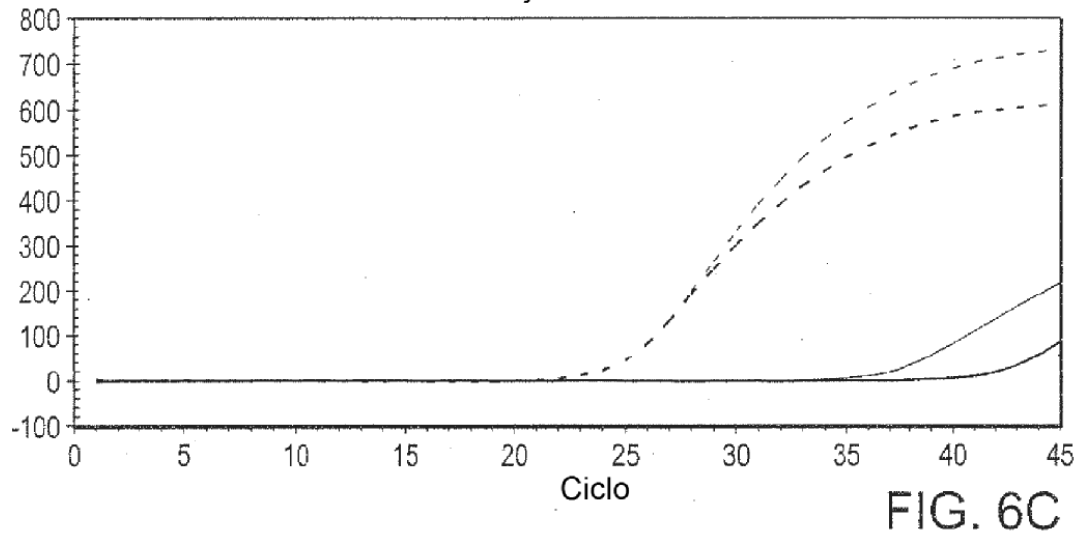
Células endoteliales de CHC



Tejido de hígado no tumoral adyacente



Tejido de CHC



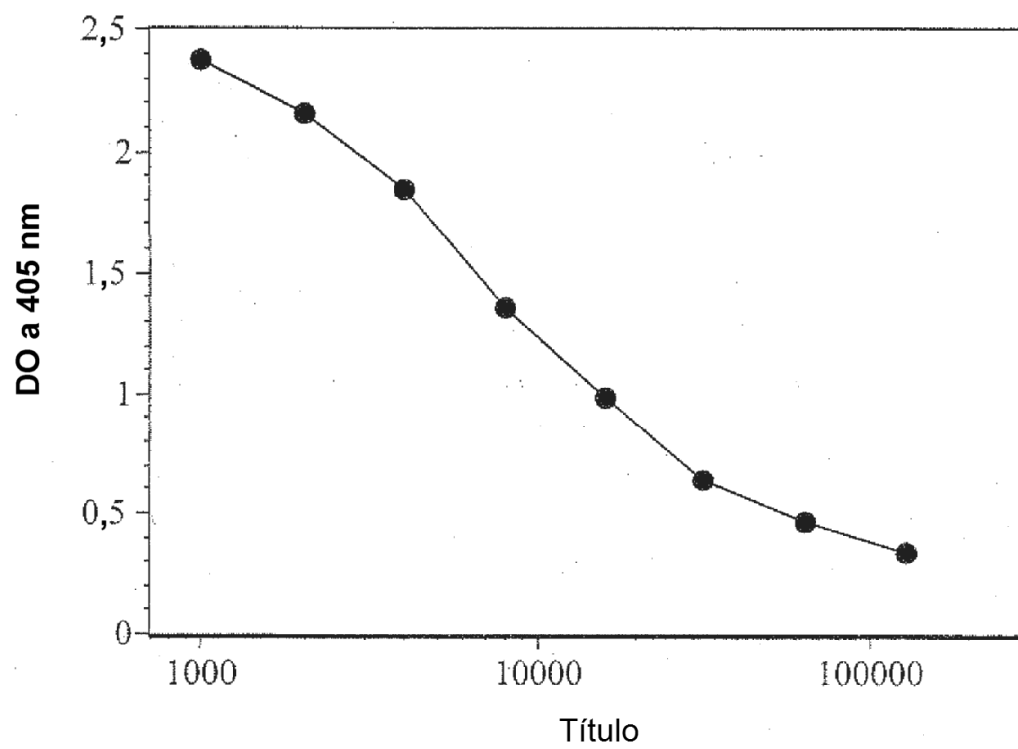


FIG. 7

FIG. 8B

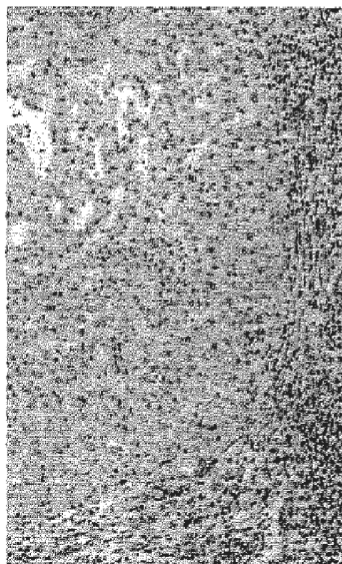


FIG. 8D

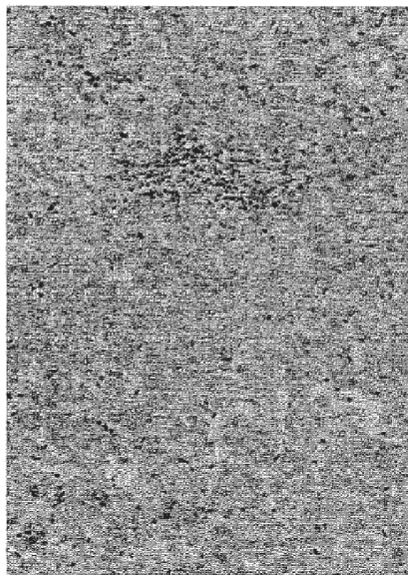


FIG. 8F

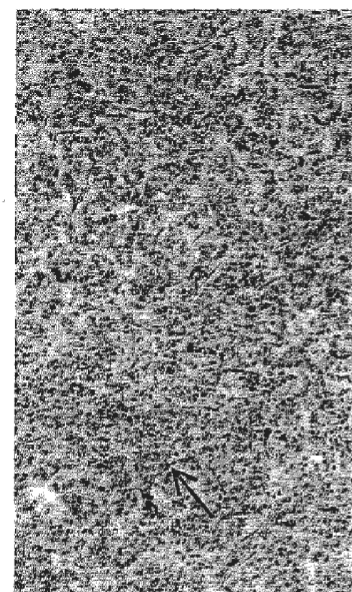
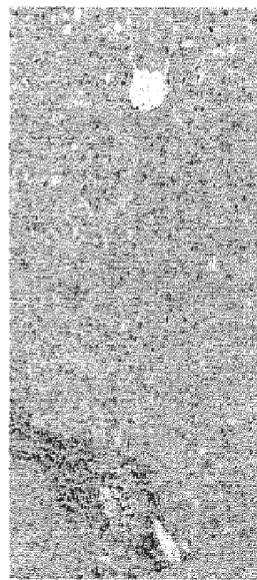


FIG. 8A

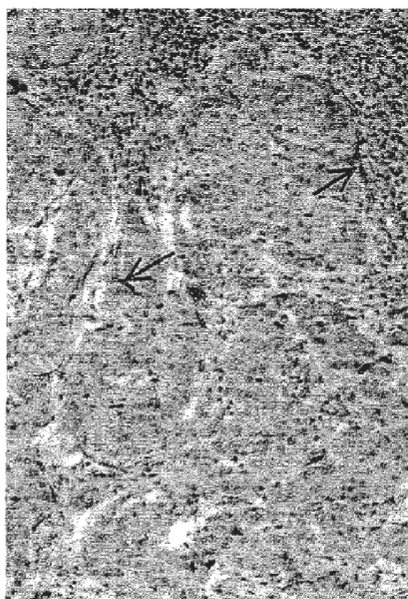


FIG. 8C

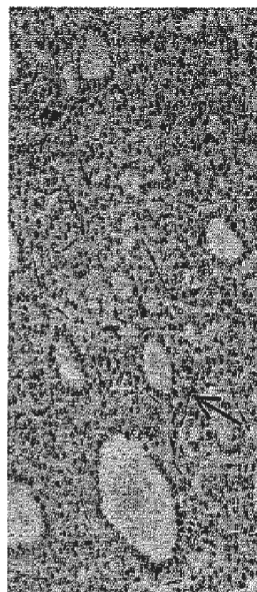


FIG. 8E

FIG. 9B

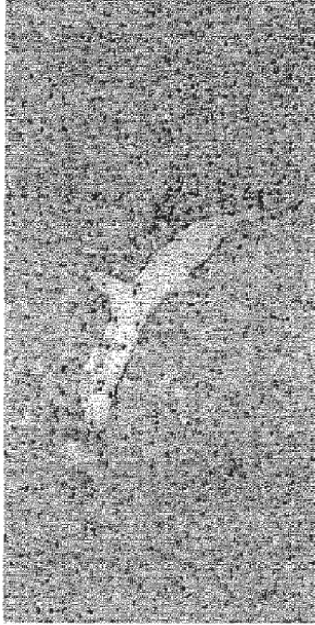


FIG. 9A

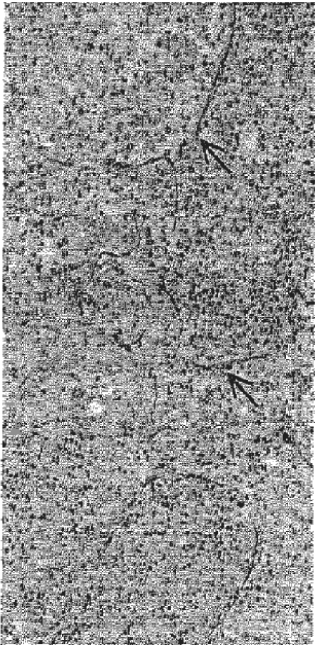
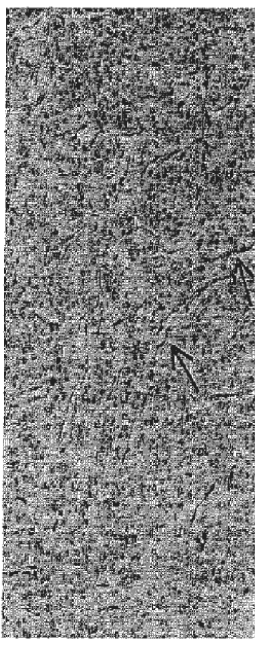


FIG. 9D

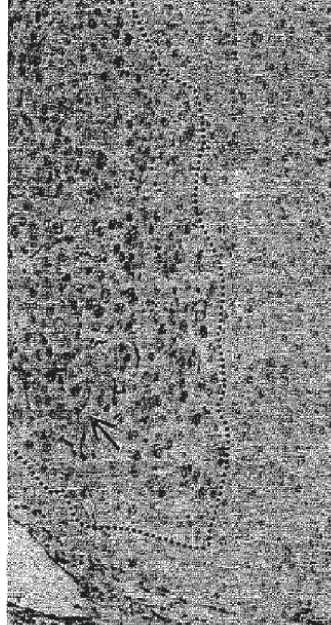


FIG. 9C



Tejido de CHC en la línea discontinua

FIG. 9F



Tejido no tumoral adyacente por fuera de la línea discontinua

FIG. 9E

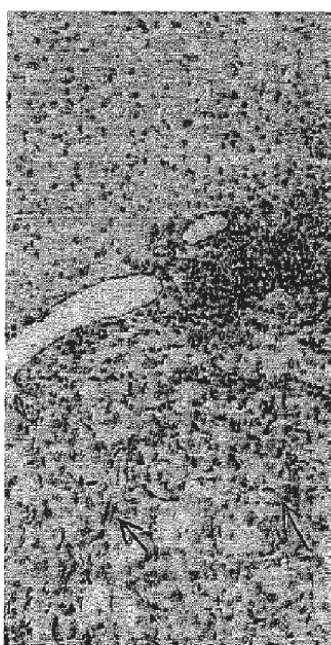


FIG. 10C

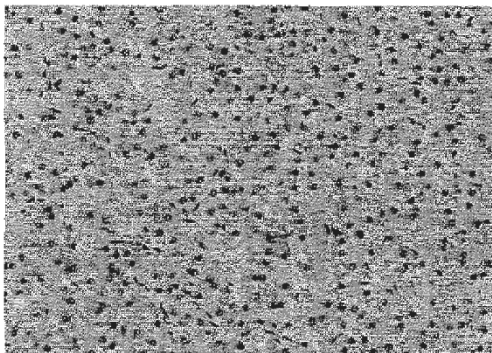


FIG. 10B

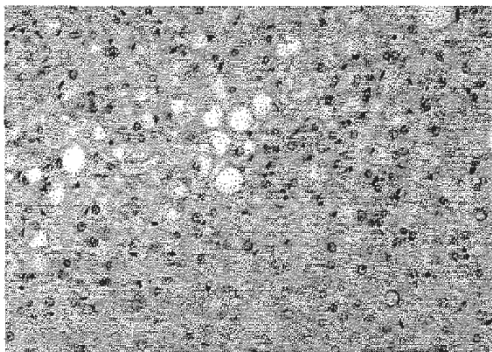


FIG. 10A

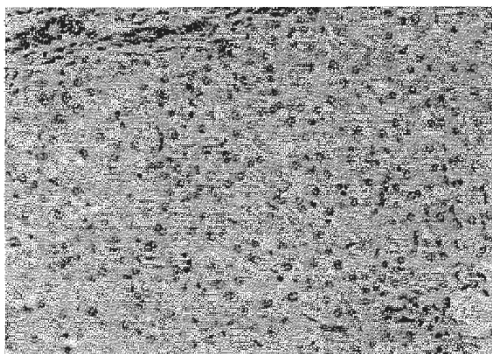


FIG. 10F

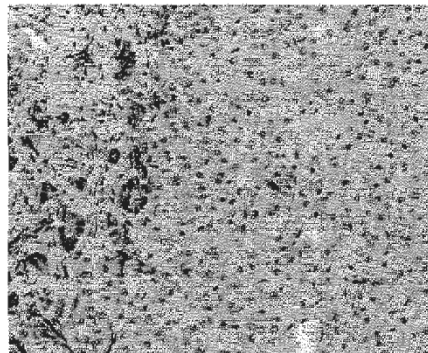


FIG. 10E

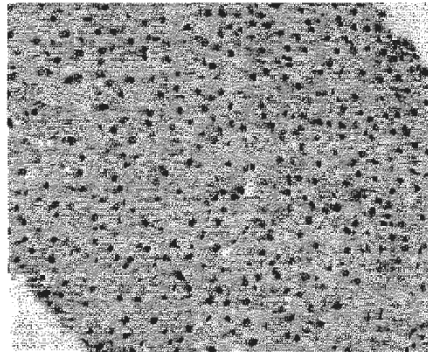


FIG. 10D





FIG. 11B

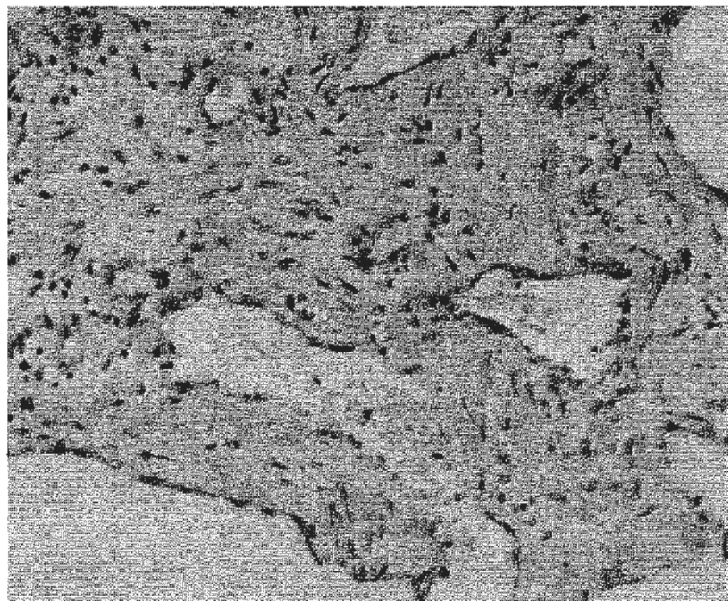


FIG. 11A

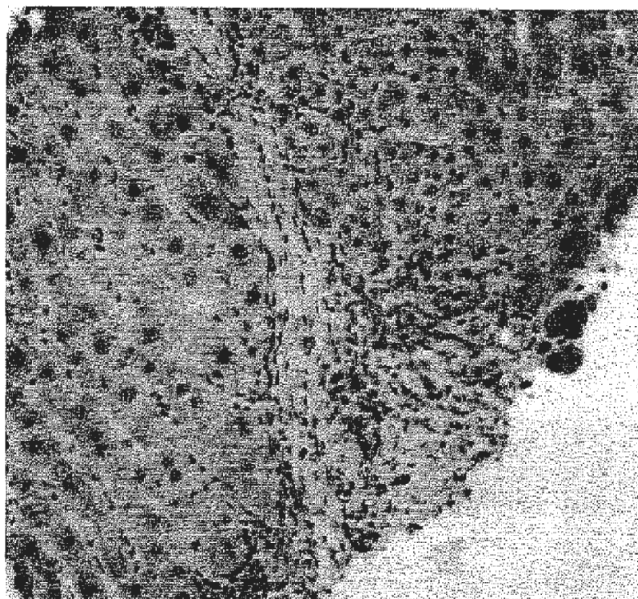


FIG. 12B

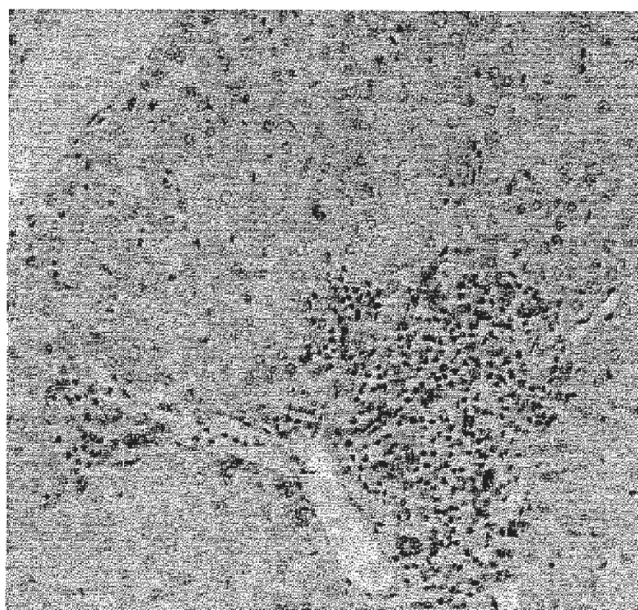


FIG. 12A

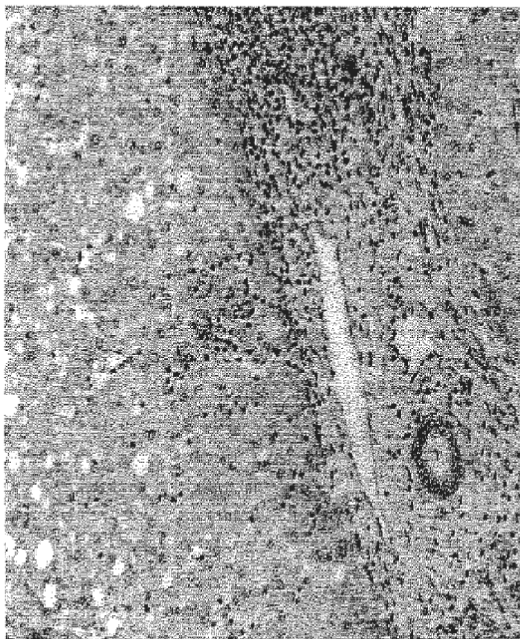


FIG. 13A

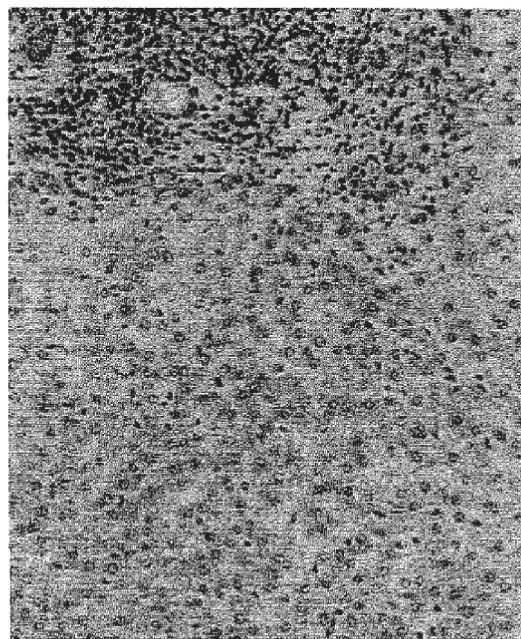


FIG. 13B

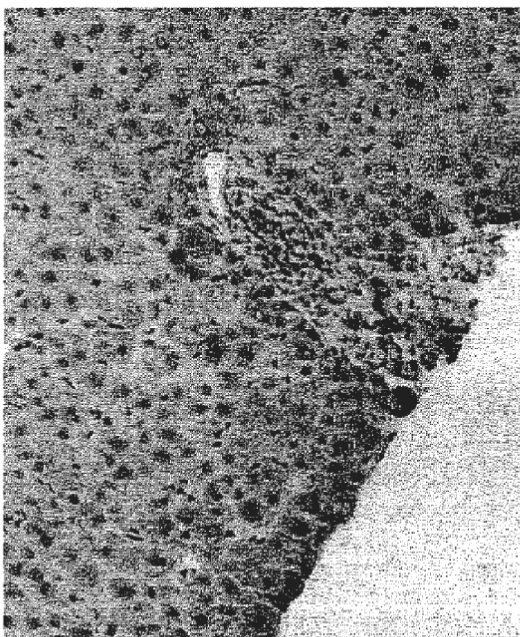


FIG. 13C

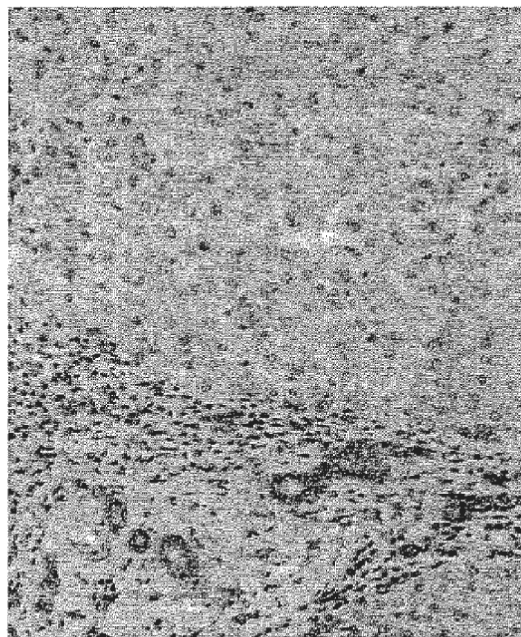


FIG. 13D

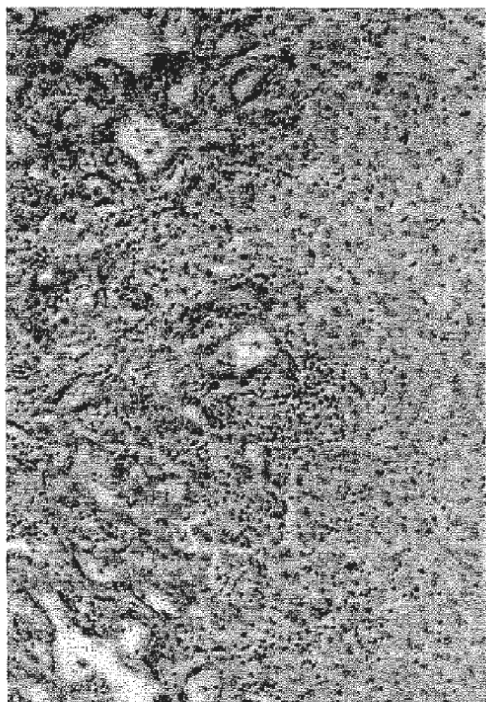


FIG. 14B

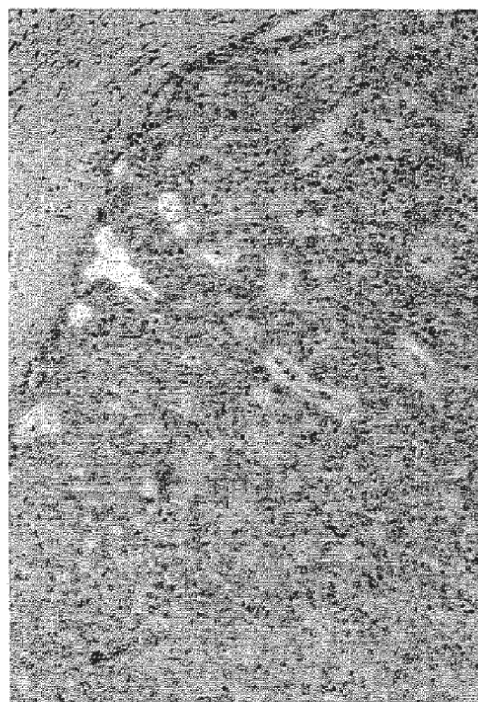


FIG. 14D



FIG. 14A

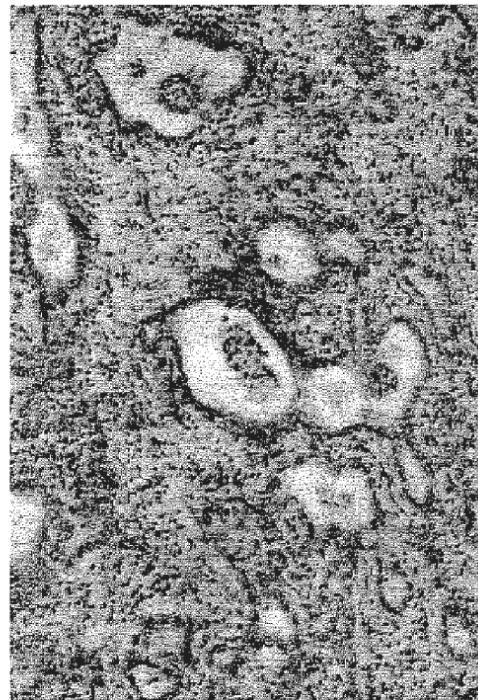


FIG. 14C

GAGGTTGAGCTGAGCAGCTCTGGGGCAGAGTTTGTGAGGTCAGGGGCTCAGTCAAGTTGTCTGACAGCTTCTGGCTTCAACATTTAAA 90
 GACTACTATATACACTGGGTGAAGCAGAGAGGCTGAACAGGGCTGGAGTGGATTGGATGATCCTGAGAAAGGTGATATTGAATAT 180
 GCCCGAAGTCCAGGGCAAGGCCACTATGACTGCAGACACATCCTCCAATACAGCCTACCTGCAAGTTCAGCAGCCTGACATCTGAGGAC 270
 ACTGCCGTCTATTACTGTCTCTACCAAGAAGGCTCCTGGGGCCAGGCCACTCTCAGTCTCCTCAGCC 342 (SEQ ID NO:3)

E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	F	V	R	S	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	S	G	F	N	I	K
D	Y	Y	I	H	W	V	K	Q	R	P	E	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	D	P	E	N	G	D	I	E	Y
CDR1																													
A	P	K	F	Q	G	K	A	T	M	T	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	Q	F	S	S	L	T	S	E	D
T	A	V	Y	Y	C	L	Y	Q	E	G	S	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	A	(SEQ ID NO:4)					
CDR2																													
CDR3																													

CDR1: D Y Y I H (SEQ ID NO:5)
 CDR2: W I D P E N G D I E Y A P K F Q G (SEQ ID NO:6)
 CDR3: Q E G S (SEQ ID NO:7)

FIG. 15A

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTTTTGTCGGTTACCATTTGGACAACCCAGCCTCCATCTCTTGAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTA 90
 AATAGTGTGATGGAAAAGACATATTTGAAATTGGTTGTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAATTTGGAC 180
 TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAAAAATCAGCAGAGTGGAGGTGAGGATTTGGGAGTT 270
 TATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTTACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA 336 (SEQ ID NO:8)

D	V	V	M	T	Q	T	P	L	T	L	S	V	T	I	G	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L
N	S	D	G	K	T	Y	L	N	W	L	L	Q	R	P	G	Q	S	P	K	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D

CDR1

S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V
Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	F	T	F	G	G	T	K	L	E	I	K	(SEQ ID NO:9)								

CDR2

CDR3

CDR1: K S S Q S L L N S D G K T Y L N (SEQ ID NO:10)
 CDR2: L V S K L D S (SEQ ID NO:11)
 CDR3: W Q G T H F P F T (SEQ ID NO:12)

FIG. 15B

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCIGGTGAGGCCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCAC
 C 90
 AGCAACTACATAAACTGGGTGAACACAGAGGCCCTGGACAGGGCCCTTGAGTGGATCGGAATAATTTATCCTTCTGATGGTTTAACTAACTA
 C 180
 AATCAAAAAGTTCAAGGACAGGGCCACATTGACTGTAGACAAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGA
 C 270
 TCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAAACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCC 342 (SEQ ID NO:13)

Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	R	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T
S	N	Y	I	N	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	N	I	Y	P	S	D	G	F	T	N	Y

CDR1

CDR2

N	Q	K	F	K	D	R	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	P	T	S	E	D
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

S	A	V	Y	Y	C	T	R	N	F	D	V	W	G	A	G	T	T	V	T	V	S	S	A
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

CDR3

CDR1: S N Y I N (SEQ ID NO:15)

CDR2: N I Y P S D G F T N Y N Q K F K D (SEQ ID NO:16)

CDR3: N F D V (SEQ ID NO:17)

FIG. 16A

GAAGTTGTGATGACCCAAACTCCTCTCCCTGGCTGTCTAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGT
 C 90
 CACAGTAATGGAAACACCTATTACAGTGGTACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCAAAGCTCCTGATCTACACAGTTTCCCAACCCGATT
 T 180
 TCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAAGTGGAGTGGATCAGGGCCAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGAGGCTGAGGATCTGGGAGT
 T 270
 TATTCTGTCTCTCAAAGTACACATGTTCTCTTTCACGTTCTGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA 336 (SEQ ID NO:18)

D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V
 CDR1

H S N G N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P K L L I Y T V S N R F

CDR2

S G V P D R F S G S G S G P D F T L K I S R V E A E D L G V
 Y F C S Q S T H V P F T F G S G T K L E I K (SEQ ID NO:19)

CDR3

CDR1: R S S Q S L V H S N G N T Y L Q (SEQ ID NO:20)

CDR2: T V S N R F S (SEQ ID NO:21)

CDR3: S Q S T H V P F T (SEQ ID NO:22)

FIG. 16B

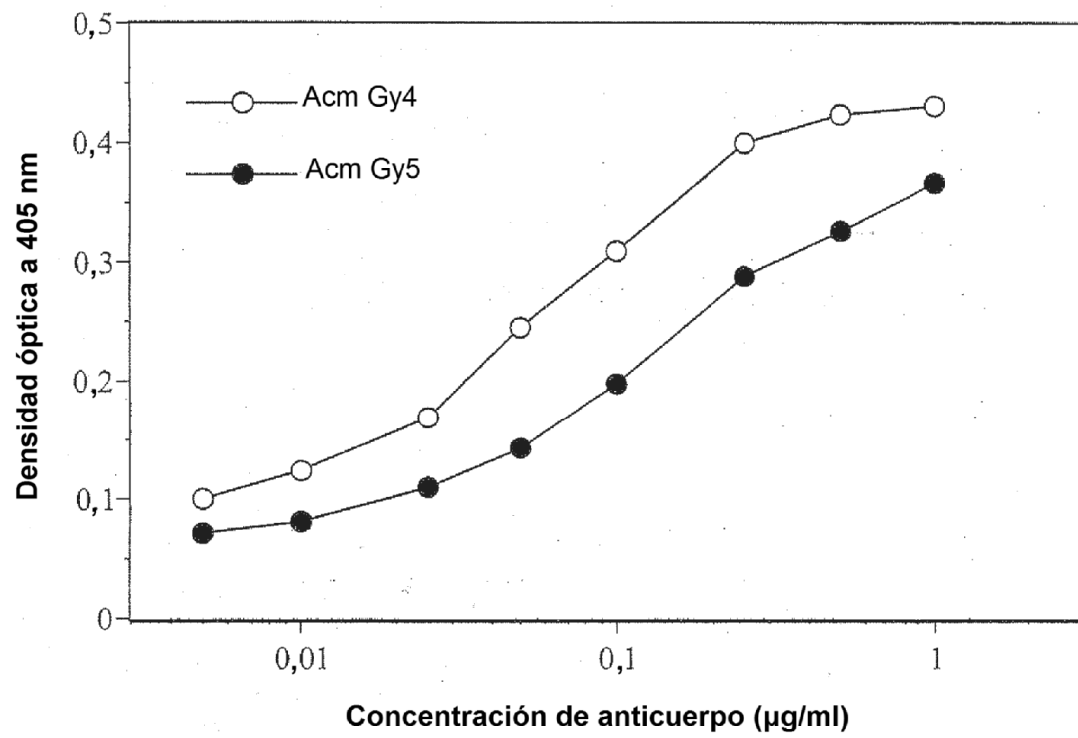


FIG. 17

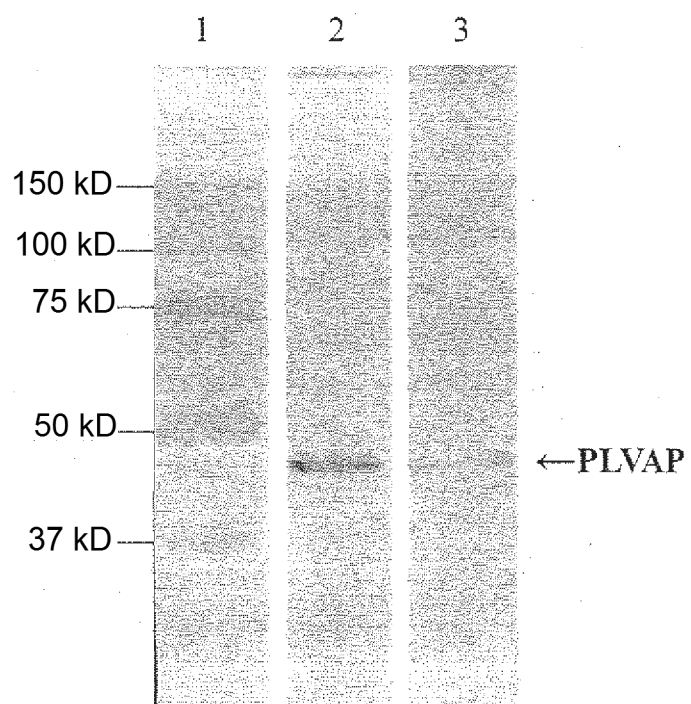


FIG. 18

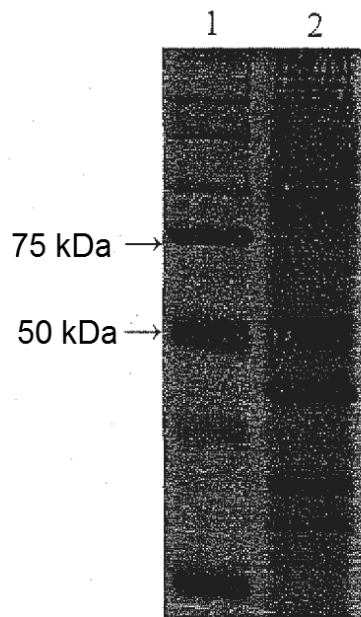


FIG. 19A

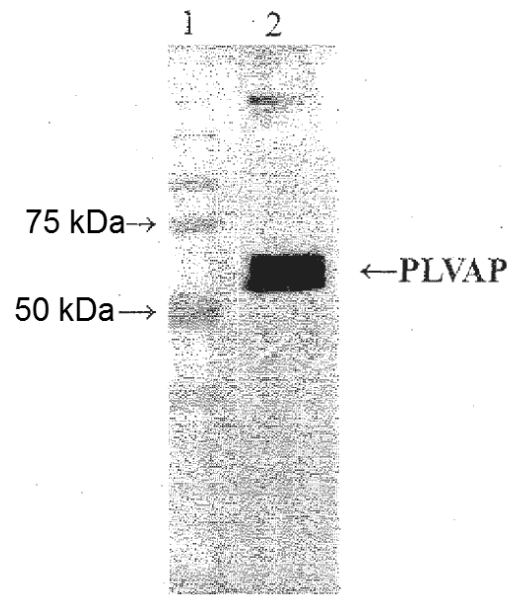


FIG. 19B

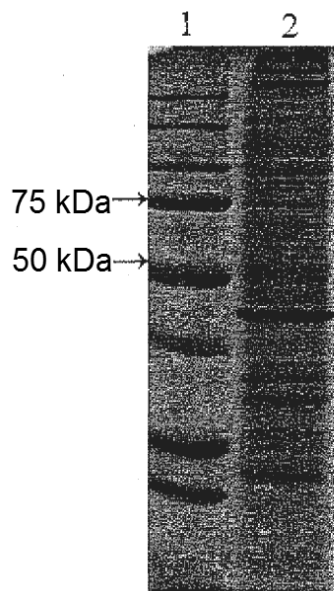


FIG. 19C

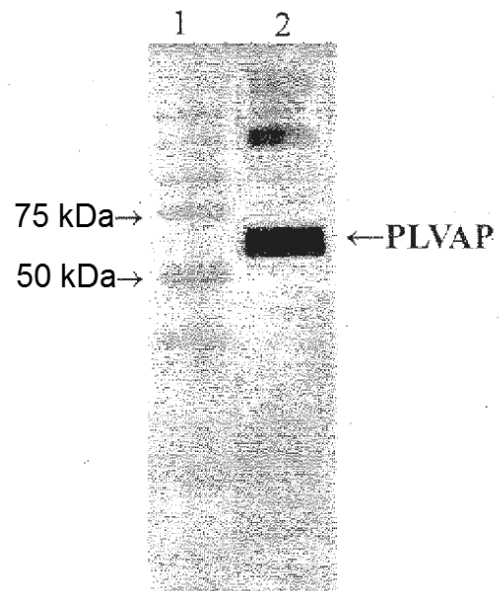
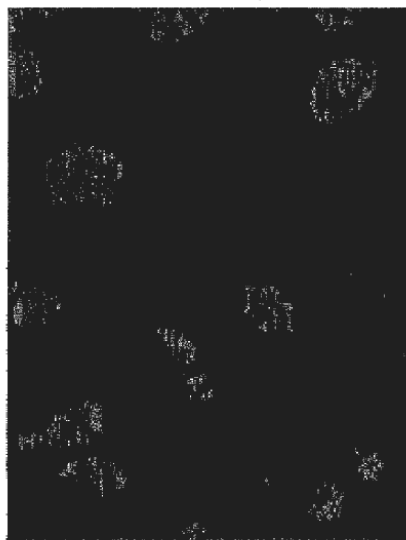


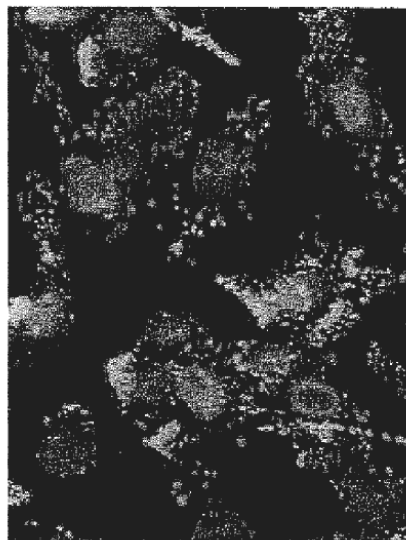
FIG. 19D

FIG. 20A



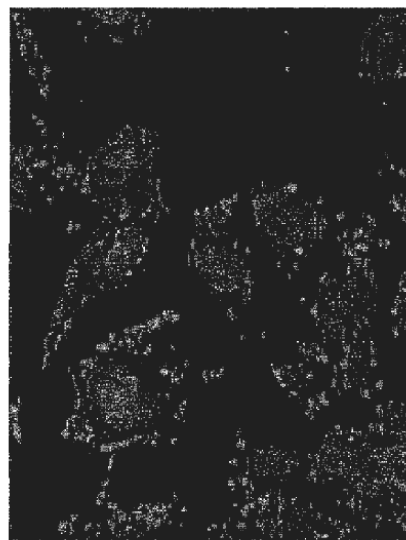
IgG de ratón

FIG. 20B



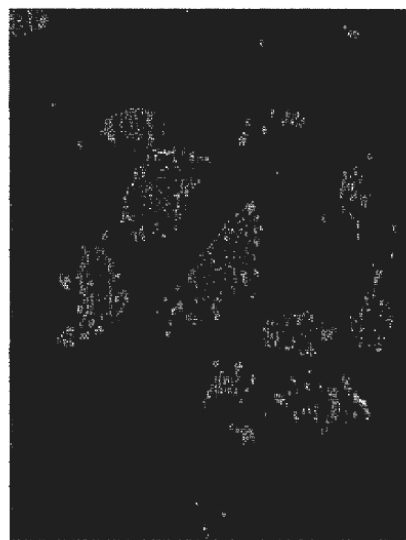
FvW de ratón

FIG. 20C



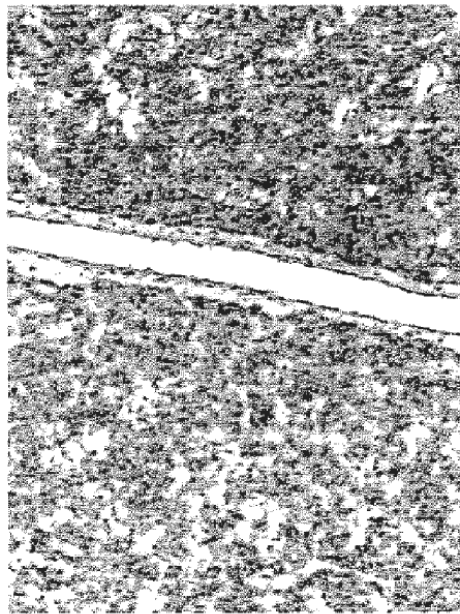
KFCC-GY4

FIG. 20D



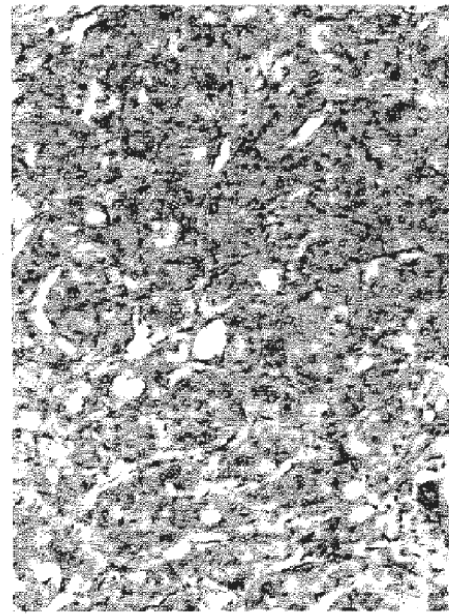
KFCC-GY5

FIG. 21B

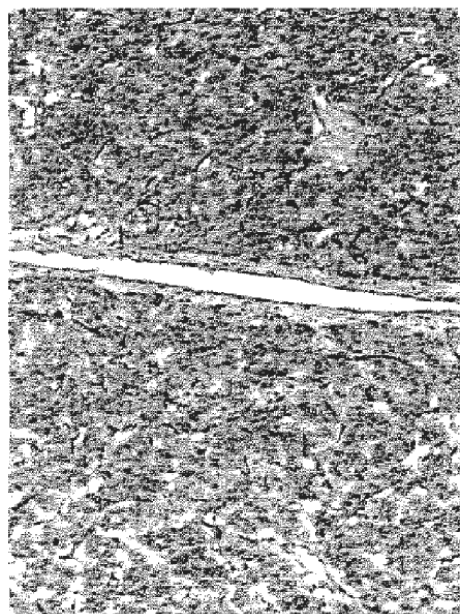


A-GY5

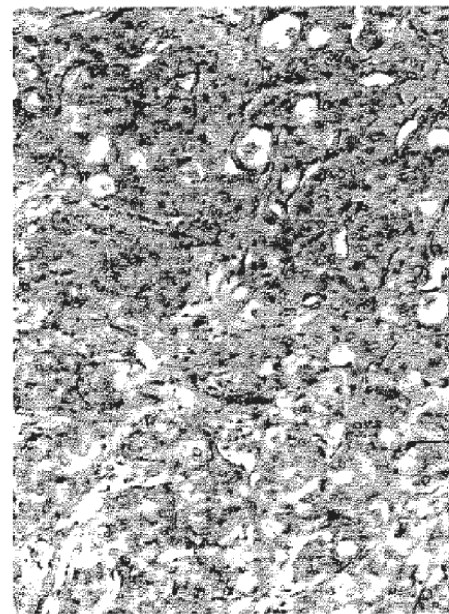
FIG. 21D



B-GY5



A-GY4



B-GY4

FIG. 21A

FIG. 21C

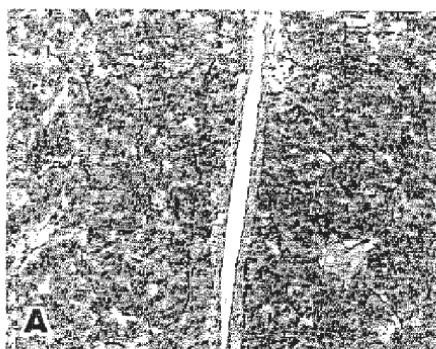


FIG. 22A

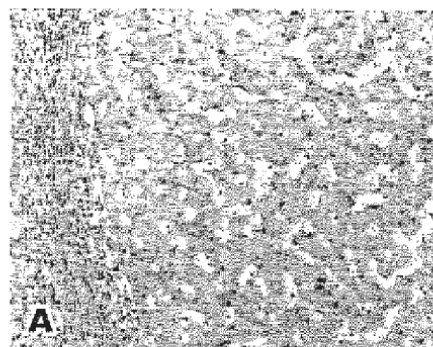


FIG. 22B

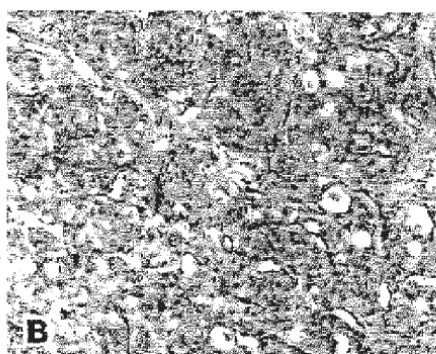


FIG. 22C

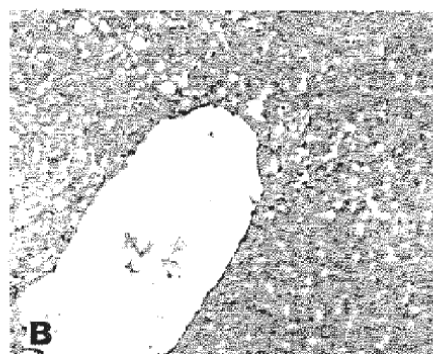


FIG. 22D

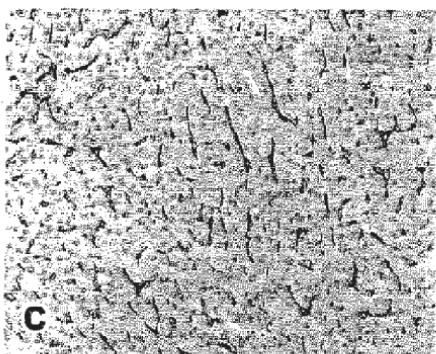


FIG. 22E

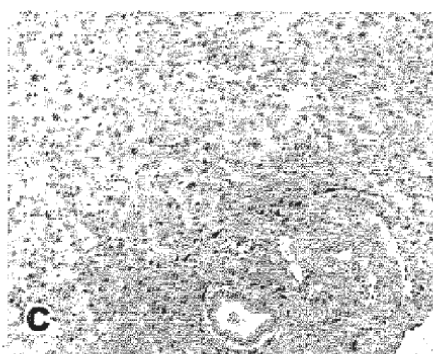


FIG. 22F

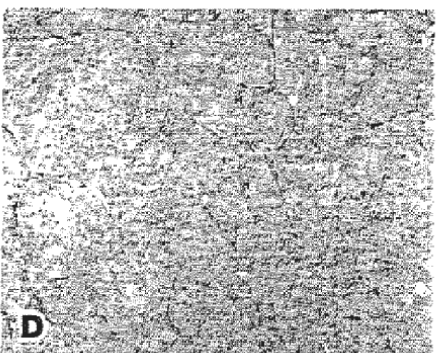


FIG. 22G

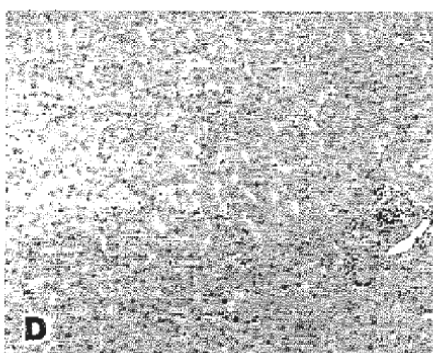


FIG. 22H

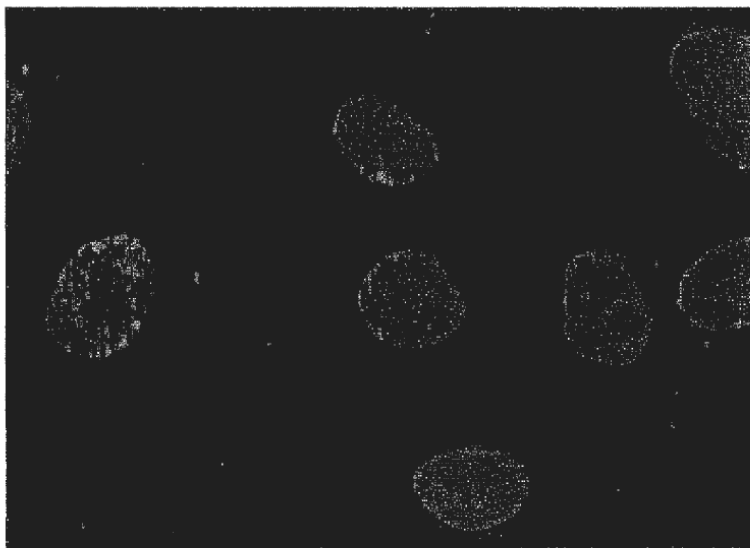


FIG. 23A

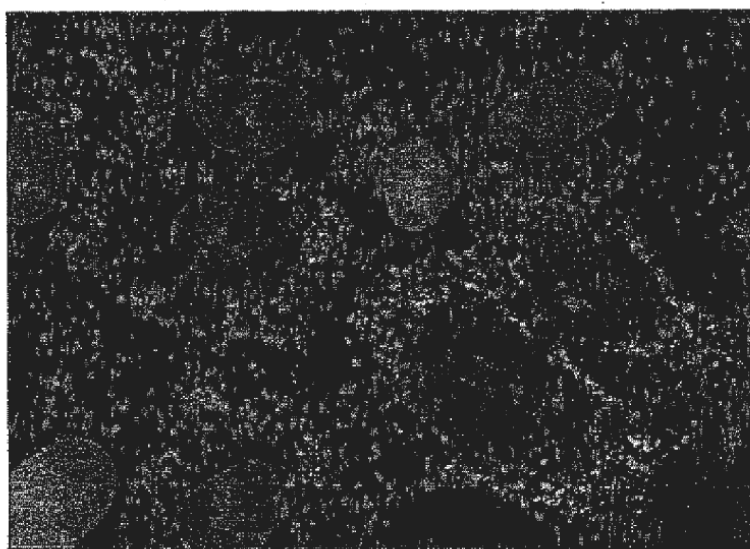


FIG. 23B

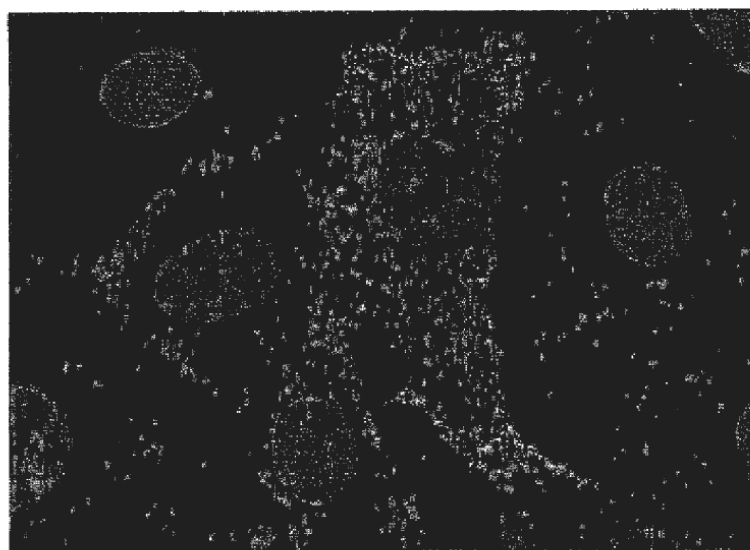


FIG. 23C

1 mglamehggs yaraggssrg cwyylryffl fvsligflil lglvlfmvyg nvhvstesnl
61 qaterraegl ysqllgltas qsnltkelnf ttrakdaimq mwlnarrdld rinasfrqcg
121 gdrviytnng rymaailse kgcrdqfkdm nkscdallfm lngkvktlev eiakektict
181 kdkesvllnk rvaeeglvec vktrelqhge rqlakeqlqk vqalcplpdk dkfemdlrnl
241 wrdsiiprsl dnlgynlyhp lgselasirr acdhmpslms skveelarsl radiervare
301 nsdlgrgkle agqglrasge akqkvekeag areaklgaec srqtqlalee kavlrkerdn
361 lakeleekkr eaeqlrmela irnsaldtci ktksgpmmpv srpmgvpvnp qpdpaslee
421 fkrkilesqr ppagipvaps sg (SEQ ID NO:23)

FIG. 24

1 cggacgcgtg ggtgagcagg gaagggtgcac cggacggcgg gatcgagcaa atgggtcttg
 61 ccattggagca cggaggggtcc tacgctcggg cggggggcag ctctcggggc tgctggtatt
 121 acctgcgcta cttcttctctc ttctgtctccc tcatccaatt cctcatcatc ctggggctcg
 181 tgctcttcat ggtctatggc aacgtgcacg tgagcacaga gtccaacctg caggccaccg
 241 agcgccgagc cgagggccta tacagtcagc tcttagggct cacggcctcc cagtccaact
 301 tgaccaagga gctcaacttc accaccgcg ccaaggatgc catcatgcag atgtggctga
 361 atgctcgccg cgacctggac cgcattcaatg ccagcttccg ccagtgccag ggtgaccggg
 421 tcatctacac gaacaatcag aggtacatgg ctgccatcat cttgagttag aagcaatgca
 481 gagatcaatt caaggacatg aacaagagct gcgatgcctt gctcttcatg ctgaatcaga
 541 aggtgaagac gctggagggtg gagatagcca aggagaagac catttgcaact aaggataagg
 601 aaagcgtgct gctgaacaaa cgcgtggcgg aggaacagct ggttgaatgc gtgaaaaccc
 661 gggagctgca gcaccaagag cgcagctgg ccaaggagca actgcaaaag gtgcaagccc
 721 tctgcctgcc cctggacaag gacaagtttg agatggacct tcgtaacctg tggagggact
 781 ccattatccc acgcagcctg gacaacctgg gttacaacct ctaccatccc ctgggctcgg
 841 aattggcctc catccgcaga gcctgcgacc acatgcccag cctcatgagc tccaagggtg
 901 aggagctggc ccggagcctc cggggcgata tcgaacgcgt ggcccgcgag aactcagacc
 961 tccaacgcca gaagctggaa gccagcagg gcctgcgggc cagtcaggag gcgaacaga
 1021 aggtggagaa ggaggctcag gcccgggagg ccaagctcca agctgaatgc tcccggcaga
 1081 cccagctagc gctggaggag aaggcgggtgc tgcggaagga acgagacaac ctggccaagg
 1141 agctggaaga gaagaagagg gaggcggagc agctcaggat ggagctggcc atcagaaact
 1201 cagccctgga cacctgcac aagaccaagt cgcagccgat gatgccagt tcaaggccca
 1261 tgggcccctgt cccaaccoc cagcccatcg accagctag cctggaggag ttcaagagga
 1321 agatcctgga gtccagagg cccctgcag gcacccctgt agcccatcc agtggctgag
 1381 gaggtccag gcctgaggac caagggatgg ccgactcgg cggtttgagg aggatgcagg
 1441 gatatgctca cagcgccga cacaaccoc tccgcgcgc cccaaccac cagggccacc
 1501 atcagacaac tccctgcatg caaaccccta gtaccctctc acaccgcac ccgcgcctca

FIG. 25A

1561 cgatccctca cccagagcac acggcgcgg agatgaagtc accgaagcaa cggcgtgac
 1621 gtcacatata accgtggtga tggcgtcacg tggccatgta gacgtcacga agagatatag
 1681 cgatggcgto gtgcagatgc agcacgtcgc acacagacat ggggaacttg gcatgaagtc
 1741 acaccgagat gcagcaacga cgtcacgggc catgtcgaag tcacacatat taatgtcaca
 1801 cagacggggc gatggcatca cacagacggt gatgatgtca cacacagaca cagtgacaac
 1861 acacaccatg acaacgacac ctatagatat ggcaccaaca tcacatgcac gcatgccctt
 1921 tcacacacac tttctacca attctcacct agtgtcagtc tccccgacc ctggcacacg
 1981 ggccaaggta cccacaggat cccatccct cccgcacagc cctgggcccc agcacctccc
 2041 ctctccagc ttcctggcct cccagccact tctcaccac cagtgcctgg acccggaggt
 2101 gagaacagga agccattcac ctccgtcct tgagcgtgag tgtttccagg acccctcgg
 2161 ggccctgagc cgggggtgag ggtcacctgt tgcggggagg ggagccactc cttctcccc
 2221 aactccagc cctgcctgtg gcccggtgaa atgttggtgg cacttaataa atattagtaa
 2281 atccttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa (SEQ ID NO:24)

FIG. 25B

Tejido normal	Tejido normal humano		Mono cin.	Mono rh.
	Positividad para PLVAP por GY4	Positividad para PLVAP por GY5	Positividad para PLVAP por GY4 o GY5	Positividad para PLVAP por GY4 o GY5
Médula ósea	-	-	-	-
Cerebelo	-	-	-	-
Cerebro	-	-	-	-
Hígado (excepto vasos pequeños del espacio porta)	-	-	-	-
Nervio (excepto tejido intersticial)	-	-	-	-
Ovario	-	-	-	-
Bazo – pulpa blanca	-	-	-	-
Músculo esquelético	-	+/-*	-	-
Testículo	+w	+w	-	-
Paratiroides	+w	+w	**	**
Próstata	+	+w	+	+
Glándula salival	+	+	+	+
Riñón	+w	+	+	+
Corteza suprarrenal	+	+	+	+
Mama	+	+	+	+
Colon	+	+	+	+
Esófago	+	+	+	+
Corazón	+	+	-	-
Intestino	+	+	+	+
Pulmón	+	+	+	+w
Mesotelio	+	+	+	+
Páncreas	+	+	+	+
Hipófisis	+	+	+	+
Piel	+	+	+	+
Bazo – pulpa roja	+	+	+	+
Timo	+	+	+	+
Tiroides	+	+	+	+
Amígdala	+	+	+	+
Cuello uterino	+	+	+	+
Útero	+	+	+	+
Estómago	+	+	+	+

*: vasos pequeños + vasos grandes -

**: sin tejido paratiroide

Toda la positividad estaba restringida en las células endoteliales

FIG.26

FIG. 27A

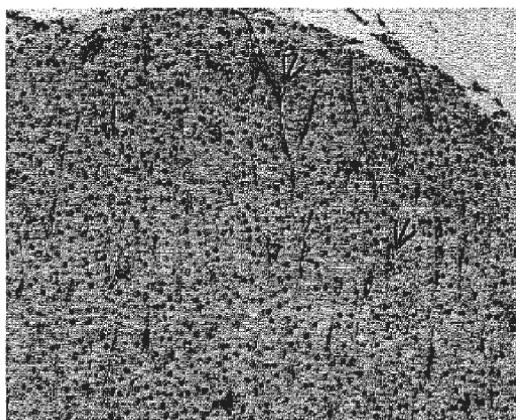


FIG. 27B

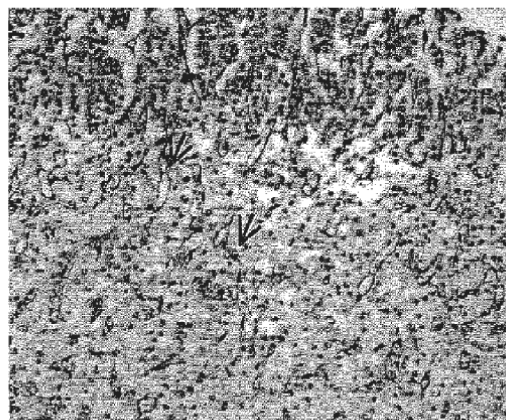


FIG. 27C

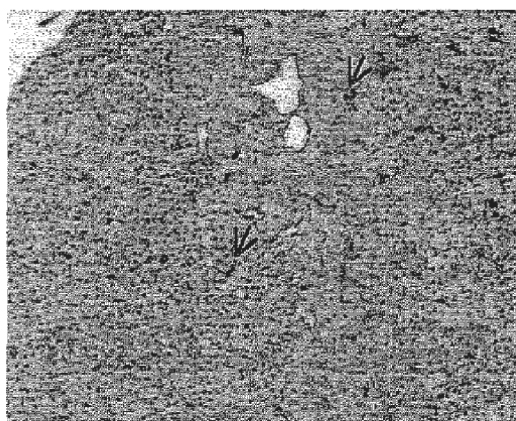


FIG. 27D

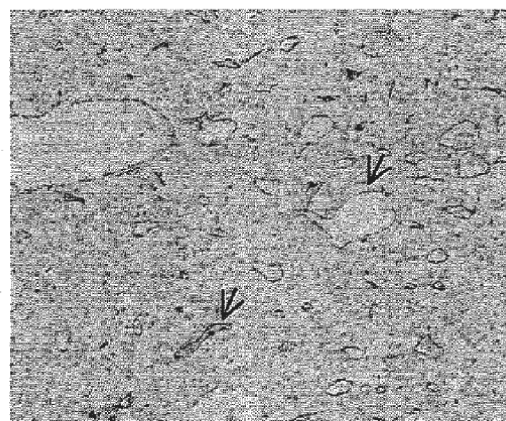


FIG. 27E

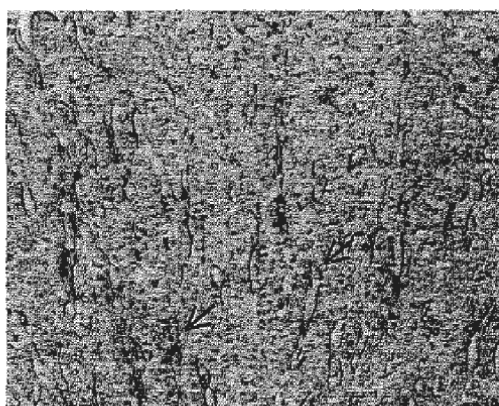


FIG. 27F

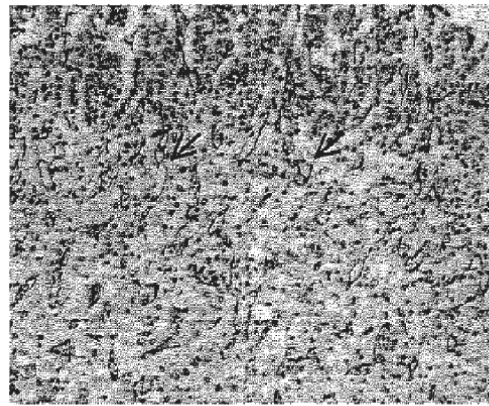


FIG. 27G

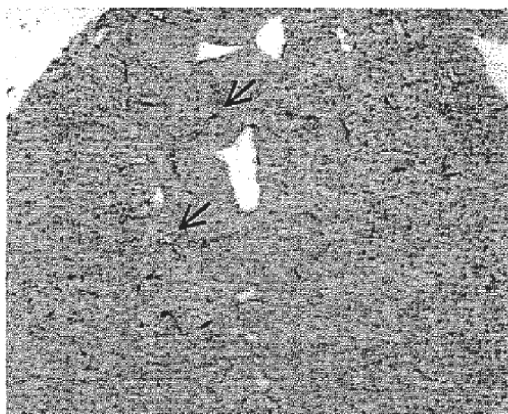


FIG. 27H

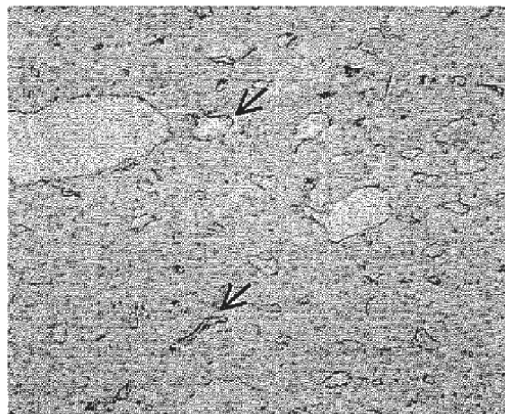


FIG. 27I

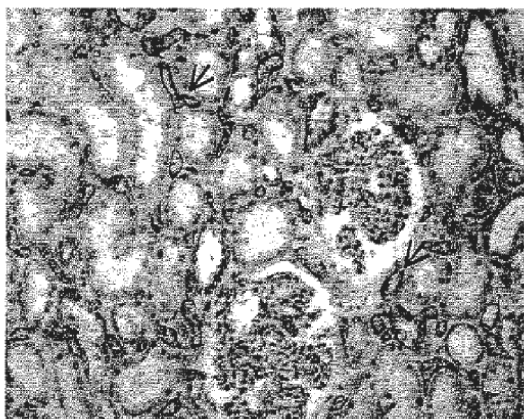


FIG. 27J

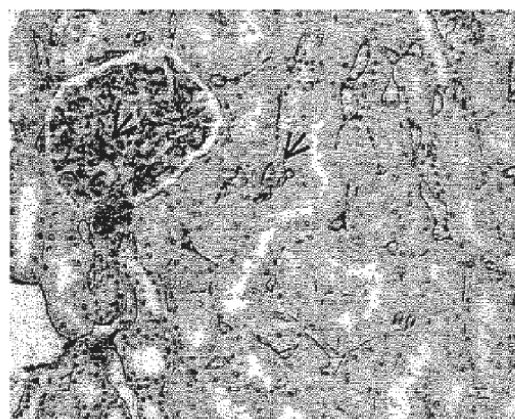


FIG. 27K



FIG. 27L

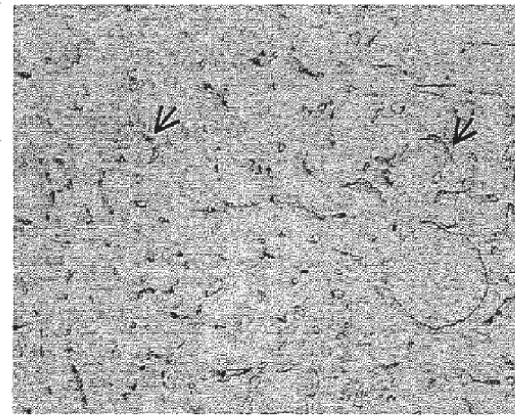


FIG. 27M

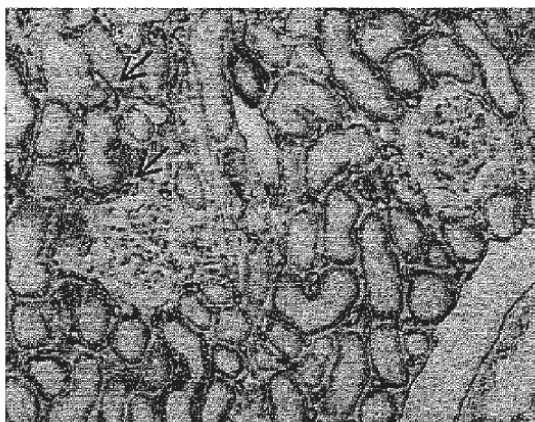


FIG. 27N

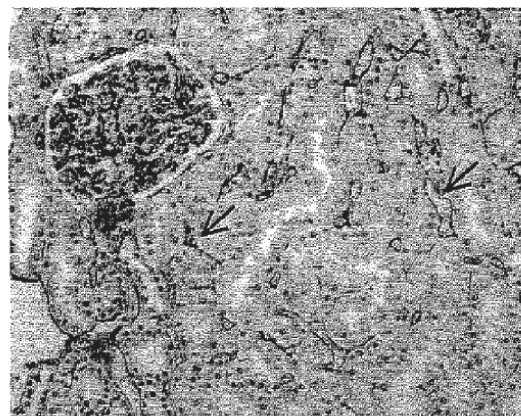


FIG. 27O

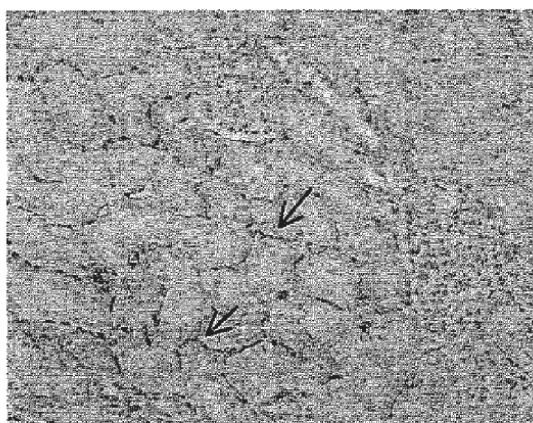


FIG. 27P

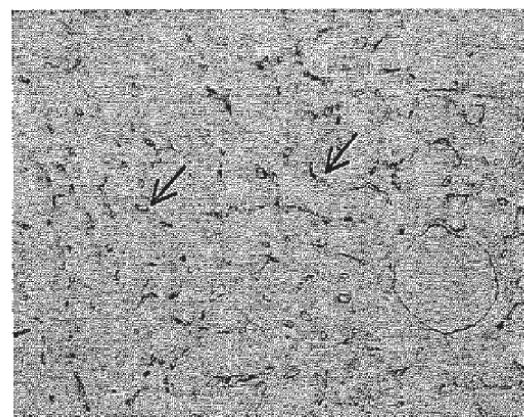


FIG. 27Q

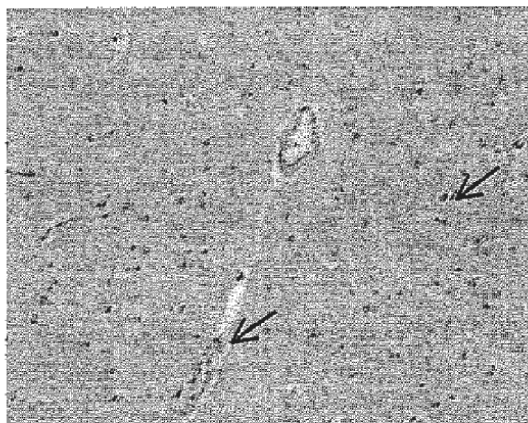


FIG. 27R

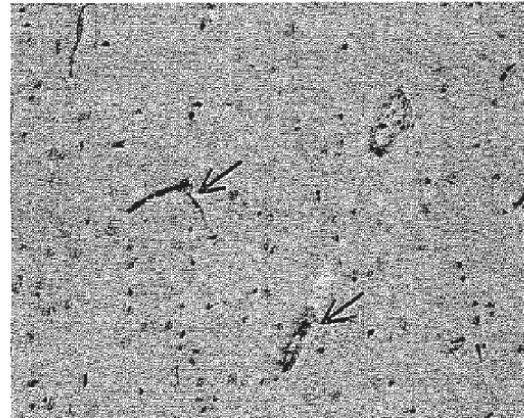


FIG. 27S

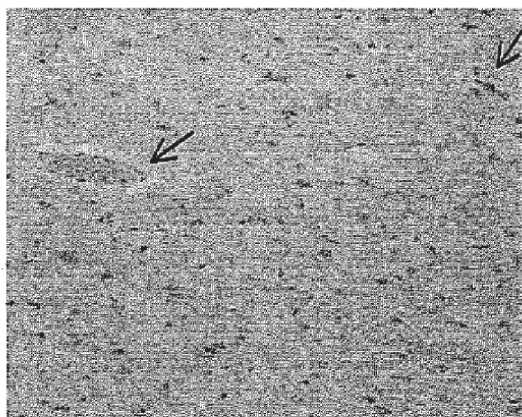


FIG. 27T

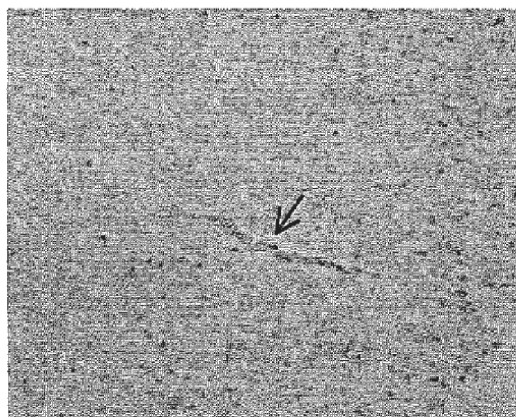


FIG. 27U

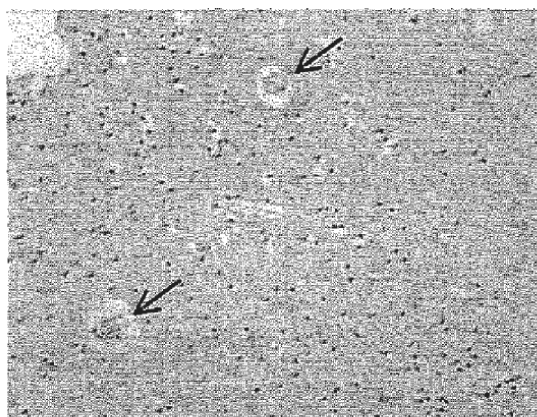


FIG. 27V

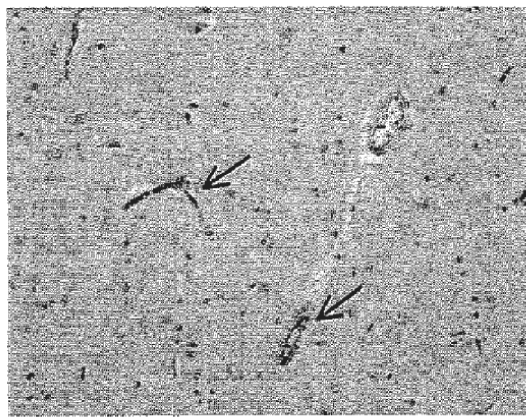


FIG. 27W

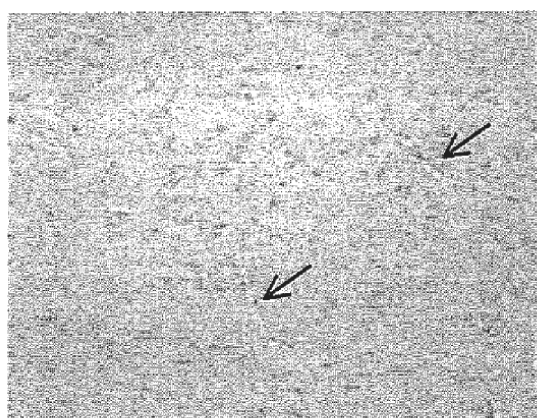


FIG. 27X

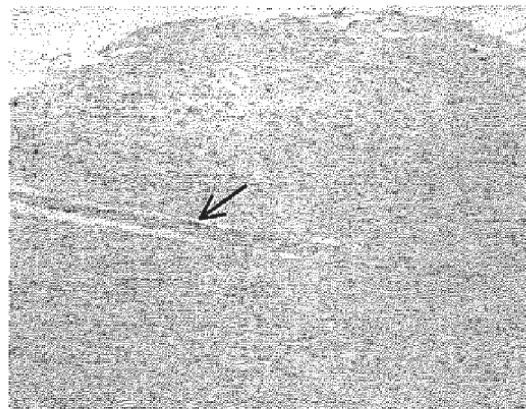


FIG. 27Y

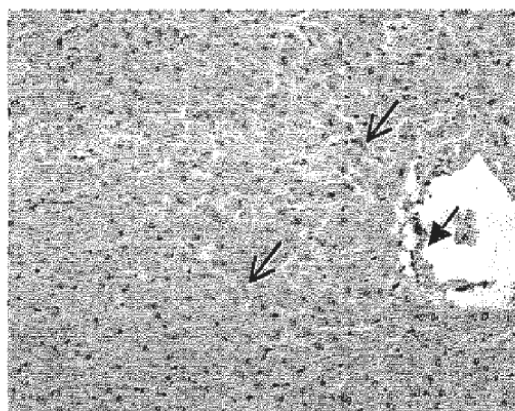


FIG. 27Z

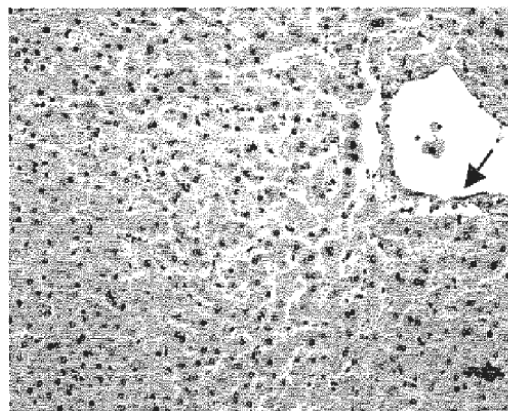


FIG. 27A2

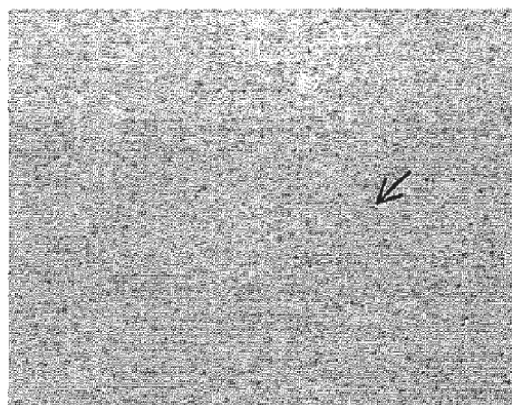


FIG. 27B2

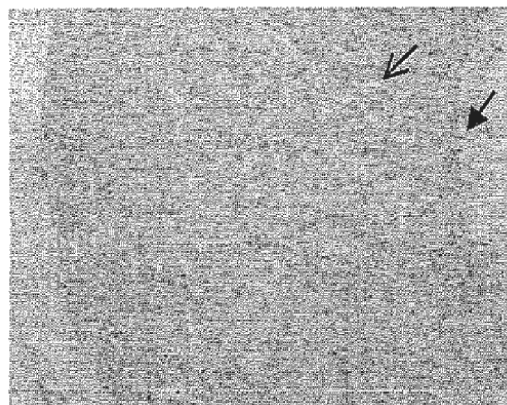


FIG. 27C2

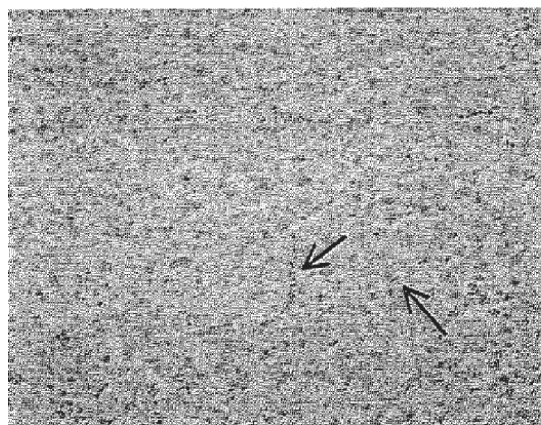


FIG. 27D2

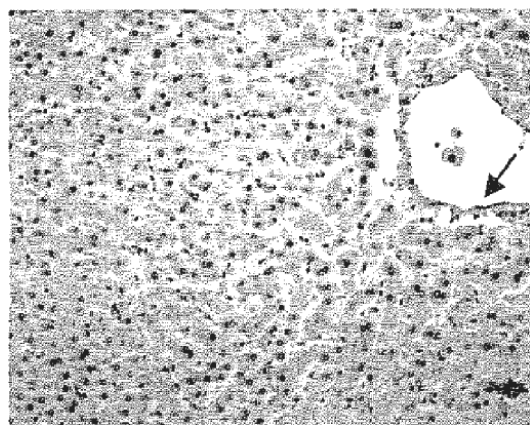


FIG. 27E2

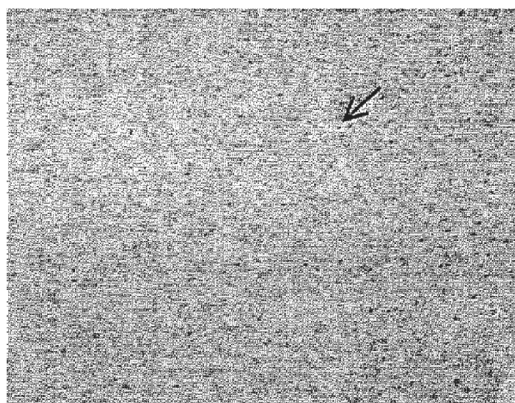
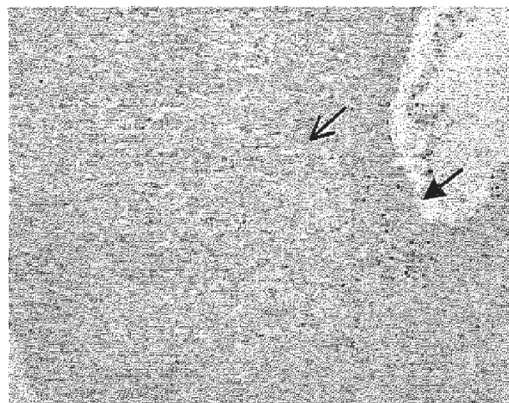
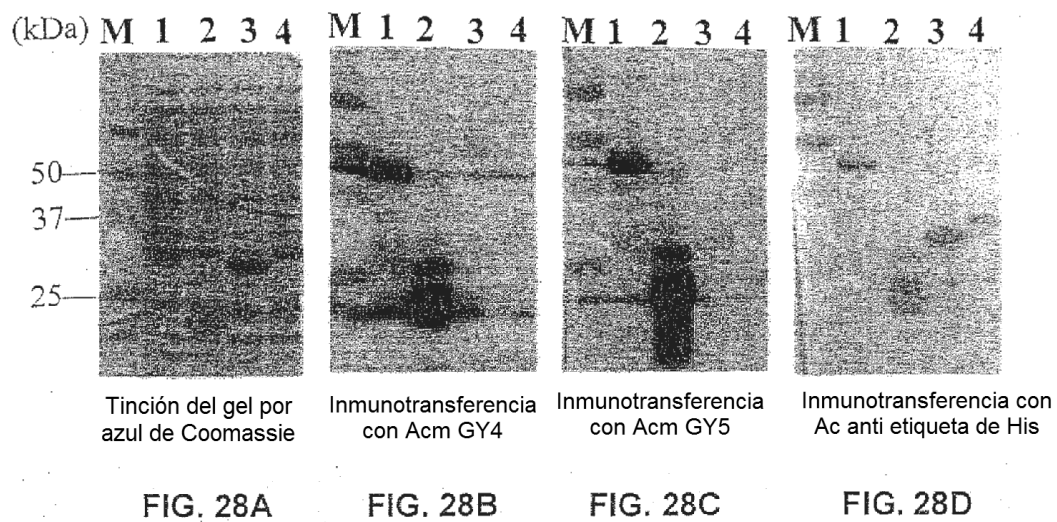


FIG. 27F2





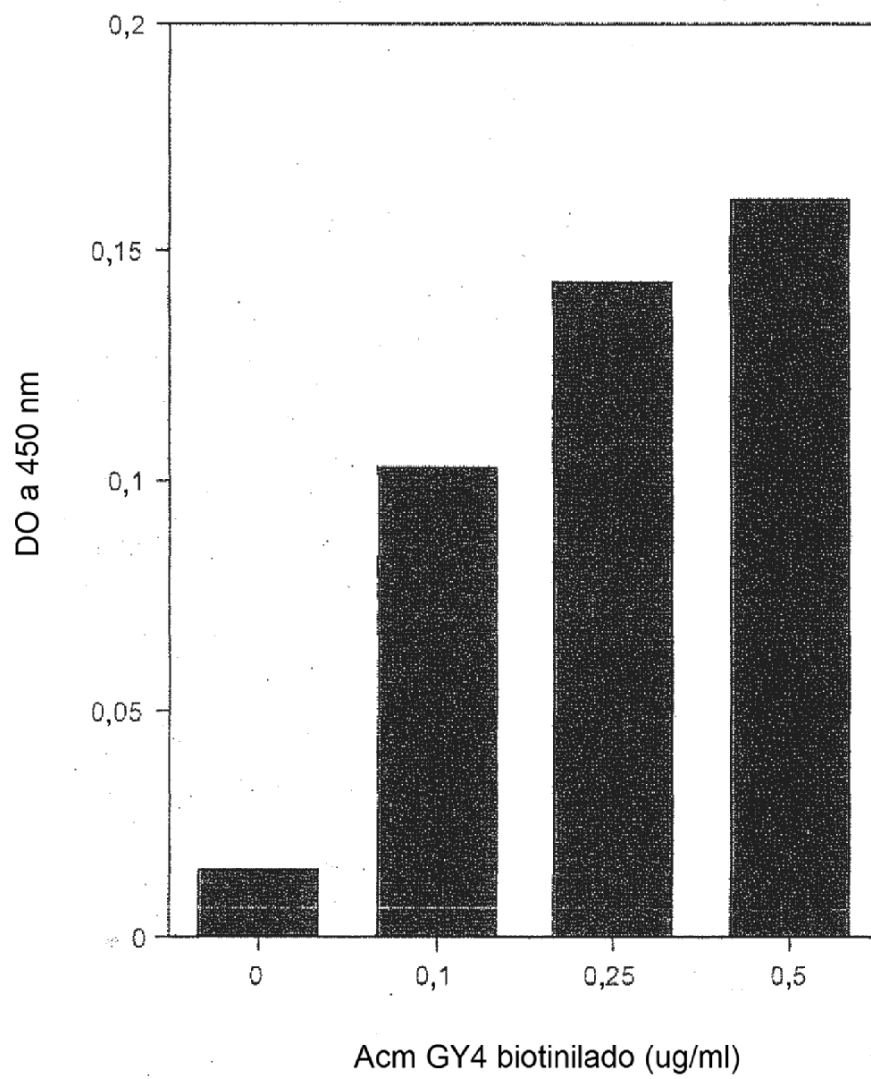


FIG. 29

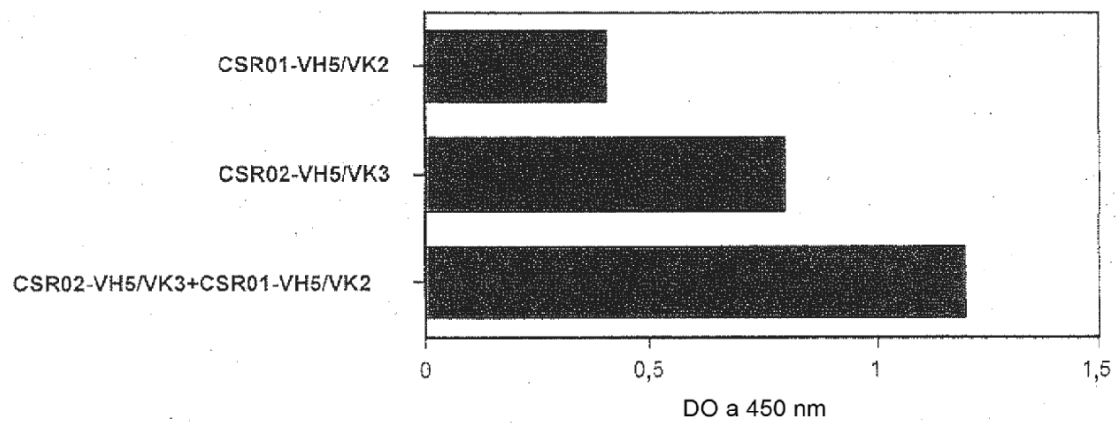


FIG. 30

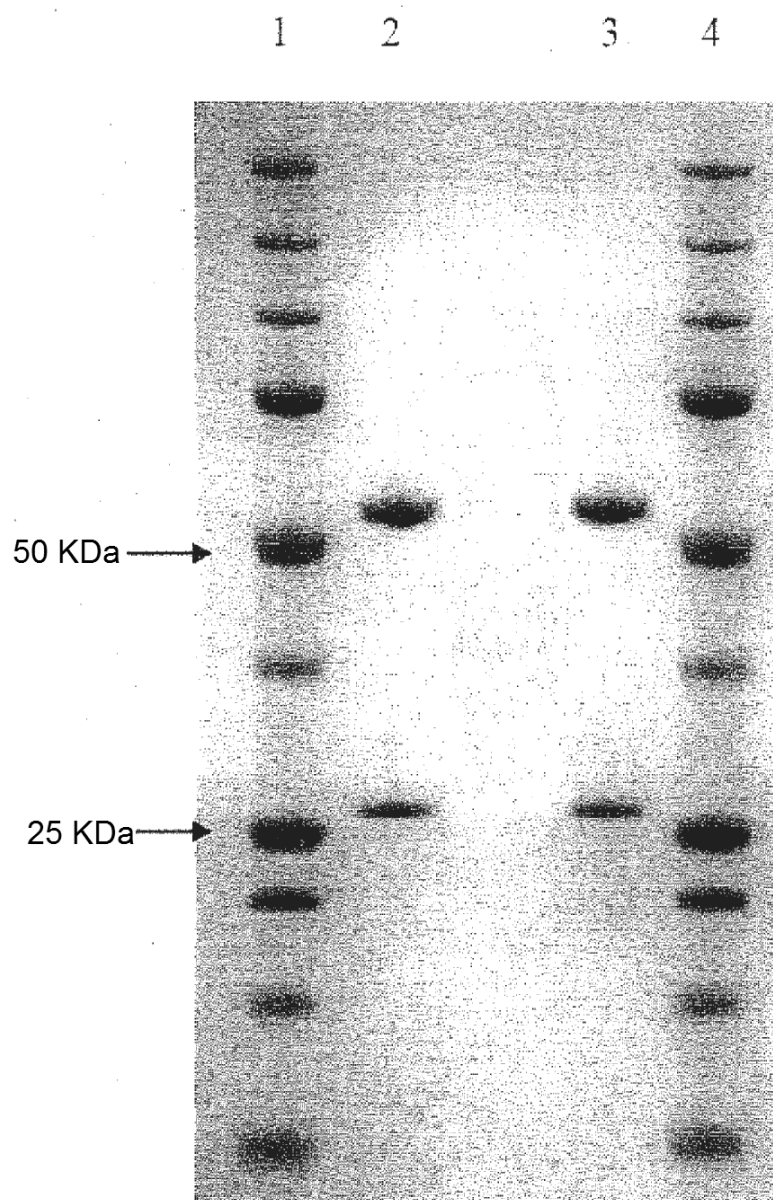


FIG. 31

Promotor de CMV

Promotor de CMV

Promotor de CMV

Promotor de CMV

H G T S L L L F L Y A V A T R V H S E Y B L Q D S G
 Secuencia señal
 VH de GY4-

Y K Q

F Q G K A Y H Y A Q T S S R I A Y L O F S S L 7 S E
VH de GY4

(SEQ ID NO:45)

FIG. 32A

1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580 2581 2582 2583 2584 2585 2586 2587 2588 2589 2590 2591 2592 2593 2594 2595 2596 2597 2598 2599 2600 2601 2602 2603 2604 2605 2606 2607 2608 2609 2610 2611 2612 2613 2614 2615 2616 2617 2618 2619 2620 2621 2622 2623 2624 2625 2626 2627 2628 2629 2630 2631 2632 2633 2634 2635 2636 2637 2638 2639 2640 2641 2642 2643 2644 2645 2646 2647 2648 2649 2650 2651 2652 2653 2654 2655 2656 2657 2658 2659 2660 2661 2662 2663 2664 2665 2666 2667 2668 2669 2670 2671 2672 2673 2674 2675 2676 2677 2678 2679 2680 2681 2682 2683 2684 2685 2686 2687 2688 2689 2690 2691 2692 2693 2694 2695 2696 2697 2698 2699 2700 2701 2702 2703 2704 2705 2706 2707 2708 2709 2710 2711 2712 2713 2714 2715 2716 2717 2718 2719 2720 2721 2722

FIG. 32B

[illegible]

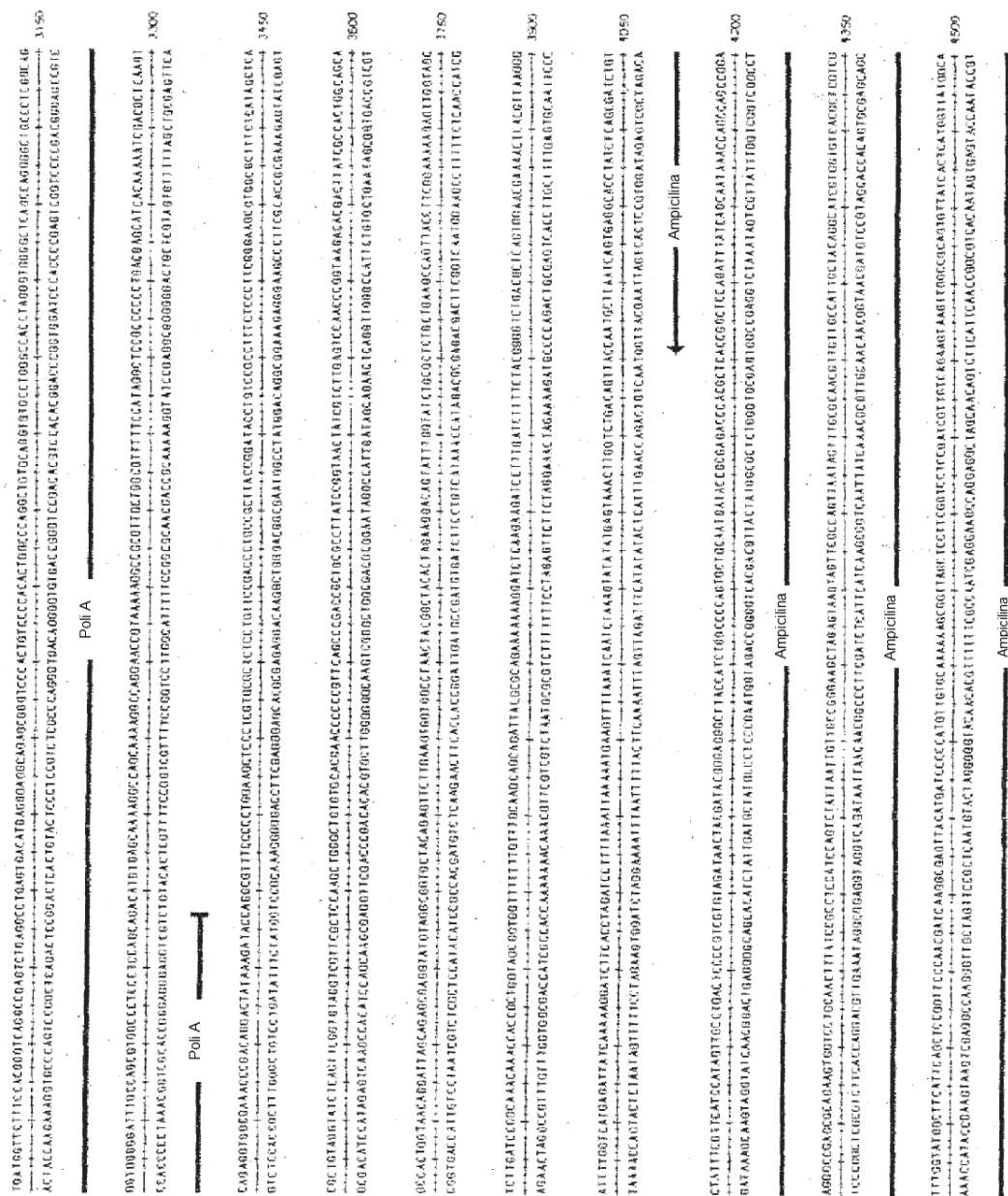


FIG. 32D.

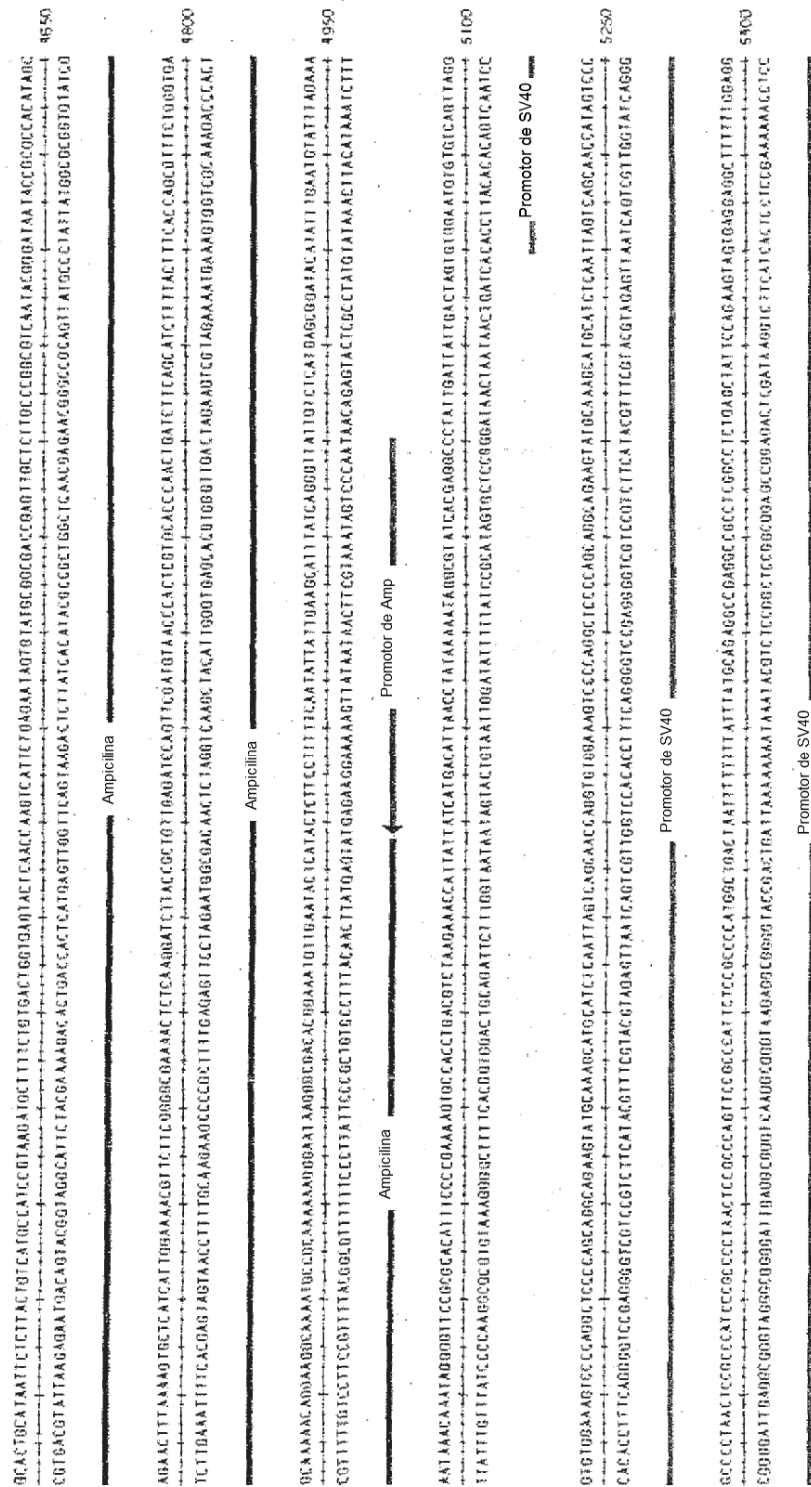


FIG. 32E

5550

Promotor de SV40 →

5700

5850

5900

5950

6000

6050

6100

6150

6200

6250

6300

6350

6400

6450

6500

6550

6600

6650

6700

6750

6800

6850

6900

6950

7000

7050

7100

7150

7200

7250

7300

7350

7400

7450

7500

7550

7600

7650

7700

7750

7800

7850

7900

7950

8000

8050

8100

8150

8200

8250

8300

8350

8400

8450

8500

8550

8600

8650

8700

8750

8800

8850

8900

8950

9000

9050

9100

9150

9200

9250

9300

9350

9400

9450

9500

9550

9600

9650

9700

9750

9800

9850

9900

9950

10000

10050

10100

10150

10200

10250

10300

10350

10400

10450

10500

10550

10600

10650

10700

10750

10800

10850

10900

10950

11000

11050

11100

11150

11200

11250

11300

11350

11400

11450

11500

11550

11600

11650

11700

11750

11800

11850

11900

11950

12000

12050

12100

12150

12200

12250

12300

12350

12400

12450

12500

12550

12600

12650

12700

12750

12800

12850

12900

12950

13000

13050

13100

13150

13200

13250

13300

13350

13400

13450

13500

13550

13600

13650

13700

13750

13800

13850

13900

13950

14000

14050

14100

14150

14200

14250

14300

14350

14400

14450

14500

14550

14600

14650

14700

14750

14800

14850

14900

14950

15000

15050

15100

15150

15200

15250

15300

15350

15400

15450

15500

15550

15600

15650

15700

15750

15800

15850

15900

15950

16000

16050

16100

16150

16200

16250

16300

16350

16400

16450

16500

16550

16600

16650

16700

16750

16800

16850

16900

16950

17000

17050

17100

17150

17200

17250

17300

17350

17400

17450

17500

17550

17600

17650

17700

17750

17800

17850

17900

17950

18000

18050

18100

18150

18200

18250

18300

18350

18400

18450

18500

18550

18600

18650

18700

18750

18800

18850

18900

18950

19000

19050

19100

19150

19200

19250

19300

19350

19400

19450

19500

19550

19600

19650

19700

19750

19800

19850

19900

19950

20000

20050

20100

20150

20200

20250

20300

20350

20400

20450

20500

20550

20600

20650

20700

20750

20800

20850

20900

20950

21000

21050

21100

21150

21200

21250

21300

21350

21400

21450

21500

21550

21600

21650

21700

21750

21800

21850

21900

21950

22000

22050

22100

22150

22200

22250

22300

22350

22400

22450

22500

22550

22600

22650

22700

22750

22800

22850

22900

22950

23000

23050

23100

23150

23200

23250

23300

23350

23400

23450

23500

23550

23600

23650

23700

23750

23800

23850

23900

23950

24000

24050

24100

24150

24200

24250

24300

24350

24400

24450

24500

24550

24600

24650

24700

24750

24800

24850

24900

24950

25000

25050

25100

25150

25200

25250

25300

25350

25400

25450

25500

25550

25600

25650

25700

25750

25800

25850

25900

25950

26000

26050

26100

26150

26200

26250

26300

26350

26400

26450

26500

26550

(SEQ ID NO:50)

FIG. 32F

[illegible]

Poli A

[illegible]

Poli A

(SEQ ID NO:51)

ATAGAAATAGTACAGACCTAGCC
TATCTTATCATGTCGGATCGG

Poli A

FIG. 32G

Promotor de CMV

Promotor de CMV

Promotor de CMV

Promotor de CMV

H R T F A O L L G L L L W L P G A R C D Y Y H T G T P L T L S V F I G O P A S J S
 Secuencia señal WK de G14

VK de GY4-

(SEQ ID NO:52)

0 T D F I L K I S R V E A C D E G V Y C W Q

VK deGV4

FIG. 33A

[illegible]



FIG. 33C

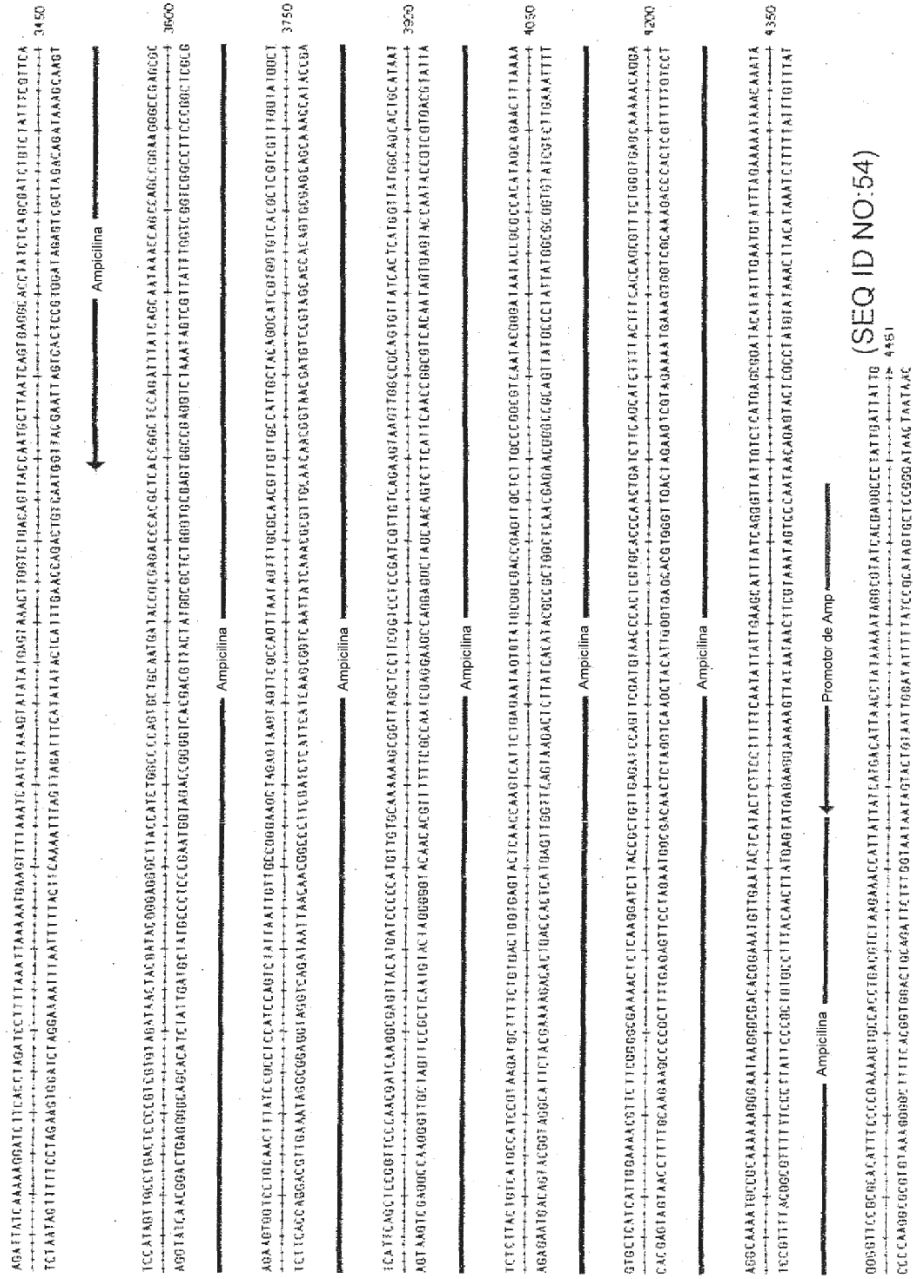


FIG. 33D

Quimera GY5 VK (pANT12)

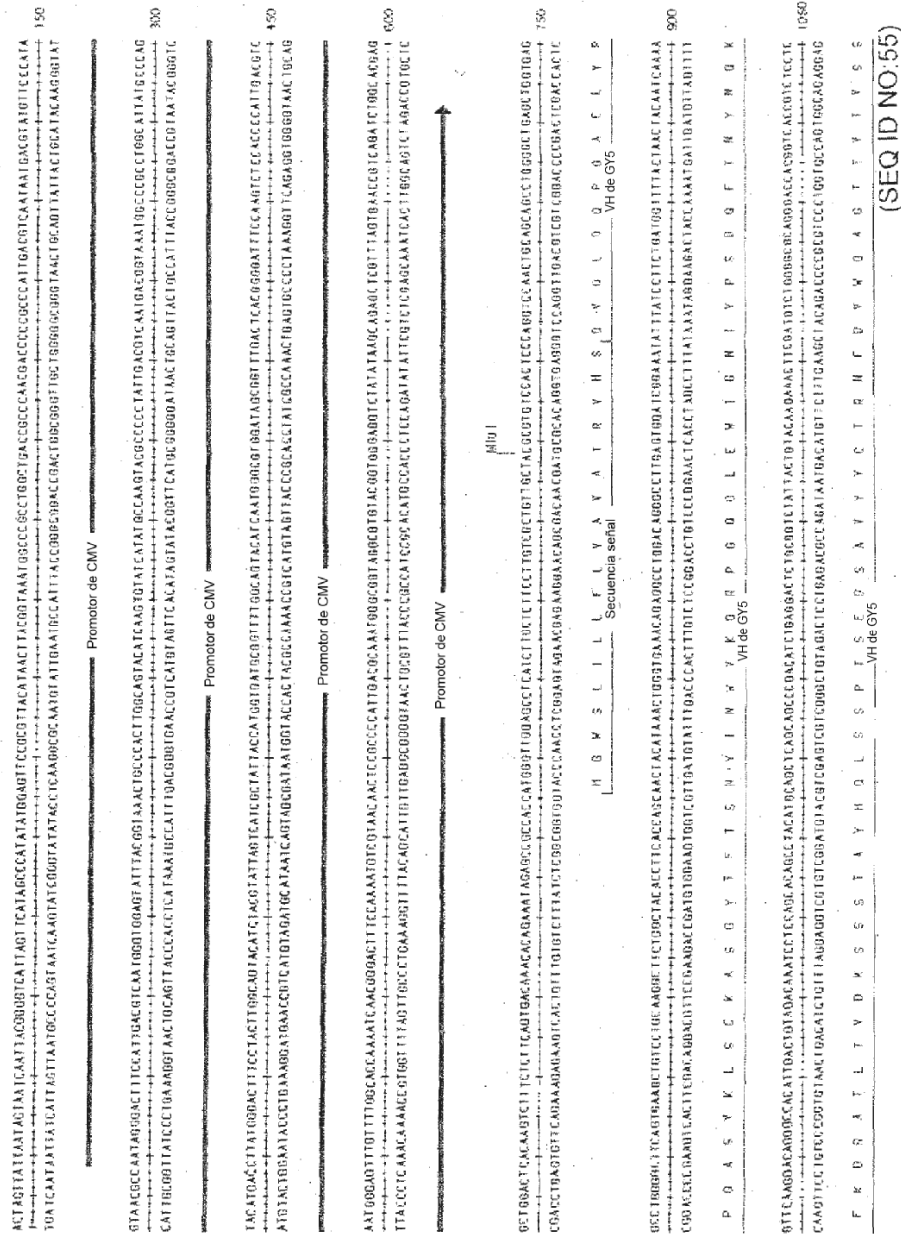


FIG. 34A

[illegible]

FIG. 34B.

[illegible]

A P E E L Q U O P S Y L L F P P K P K O I L H I S F T P E Y I S Y V V O V S Q E O P E Y O F N W

CHZ de 1944

[illegible]

V V D Q V E Y H A R T K P R E E Q F N S I Y P Y V S V L I Y L H Q D W L N O F E Y K E X V S H K G
Ch2 de lg4

[illegible]

L P S S I E K T I S V A K (SEQ ID NO: 48)
CH2 de 1934

[illegible]

PQVITLPSSQELLEKINQVSLTCLYKOFYFP&OIAVVENESNGOPELHNXYRTIP
CH3 de la G4

[illegible]

PVLESDNSSFLLVSRLLI VUWRSRWQEONVFSLSVMHTEALMNHVYIUWSSLESLLEL

[illegible]

0 k
CH3 de IgG4
(SEQ ID NO. 49)
Poli A

(SEQ ID NO: 49)

Poli A

FIG. 34C

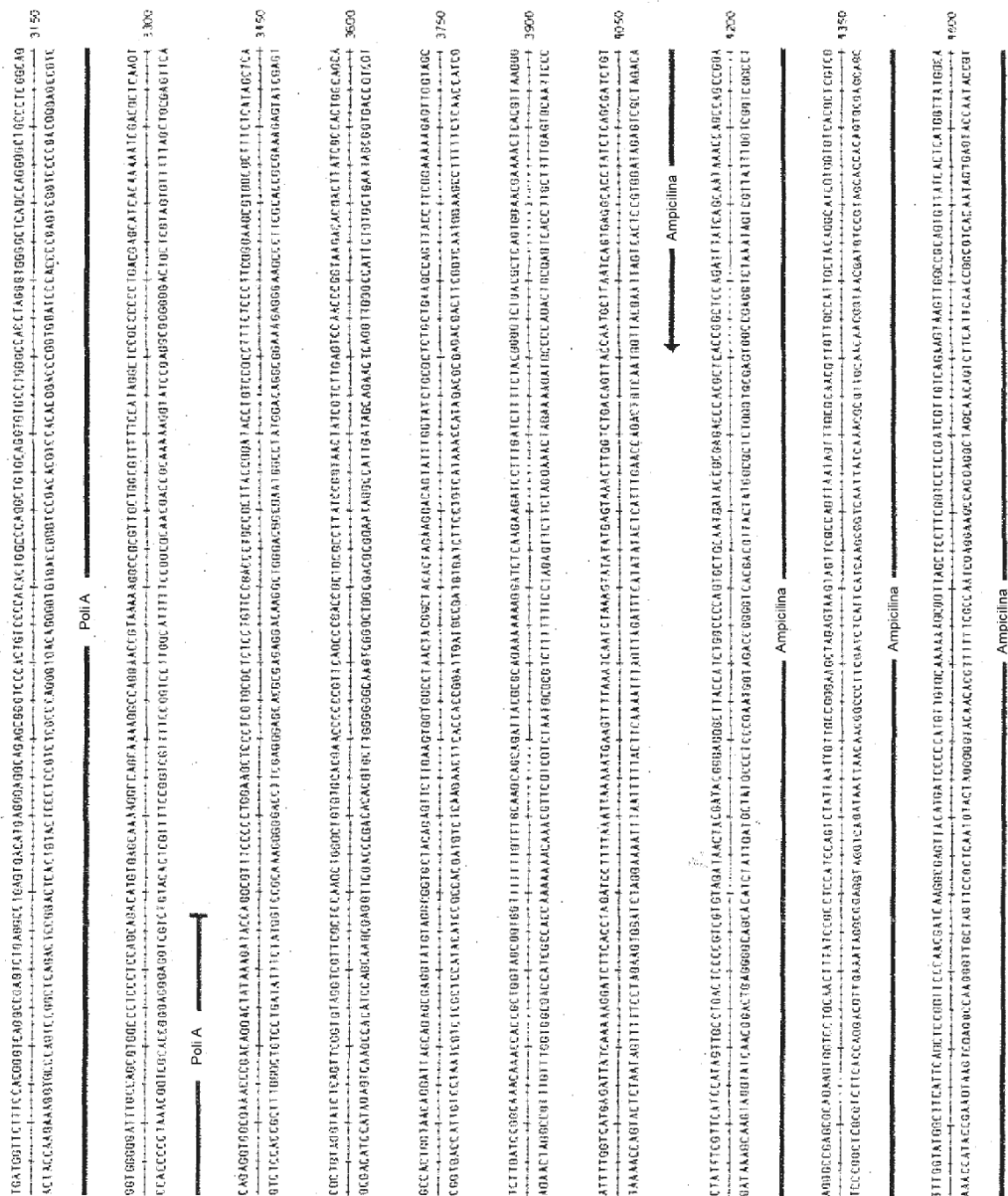
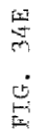


FIG. 34D



C C A C A C C T C T C T A G T B G A A G T A A C G A A T C G A C C T T T A A G B G A C A G A A T A A T A G T T C T C A G T A B A G A C T C A A B A A C C A C C A C A G A G A C T C A T T
 5700
 G G T G T T G G A G A G T C A C C T T C A T T T G T C T T A G A C C A C T T T T T G B A C A A A A C C T T B G T T C C A T T C C T G A G A A T T A A T A G T T C T C A G T A B A G A C T C A A B A A C C A C C A C A G A G A C T C A T T
 5800
 T T T S S V E G K Q N L V I H G R K T W F S I F E K R P L K U R I N I V L S E E L V E P P R G A H
 5900
 T T T D C C A A A G T T G B A T G A T O C C T T A A G A C T T A T T A G A C A C C G B A A T T B G C A A G T A A G A T A G A C A T G O T T T G A T A G T C G A G A C C A G T T G T T A C C G A G A C C A G T C C T T T O I G A C A A G A
 6000
 A A G A C O G T T T C A A C C T A C T A C G B A A T T C G A A T A C T T C A T C T G T A C C A A C C I A C A C C T C C G T C A G A C A A A T O O T C C T C G B I A C T A G T T G B T C C O G T O A G T C T G A G A A C A C T G T T C C T
 6100
 F L A K S I D D A L R L T E U P F L A S K V G H V X I V G G S S V Y O E A H N O P G H L R L F V T R
 6200
 T C A T O C A G A A T T G A A B T G A C A C G T T T T C C A G A A A T T O A T T T G B G A A T A T A A A C T C C C A D A A I A C C A B G C T C T C T C A B G T C C A G R A G A A A A G B C A T G A A C A C C A G C C A C C T C A G A C T T A G T T G A A D T C T A C C A G A A A A G A C T A A C
 6300
 A G T A C T C T A A C T T C A C T O T G C A A A G B G T C T T A A C C C T T A T A T T T G A A G A G B G T C T T A G B G T C C G A G A G A C T C C A G B G T C T C T T T T C C G T A G T T C A T T C A A C T T C A G A T C C T T C T T C T T C T G A T T G
 6400
 I H G E F E S U T F F P E I D L G K Y K L L P E Y P G Y L S E Y O E E K G I K Y K F E V Y C Y V U
 6500
 A G B A A G A T G C T T C A A G T T C T T O C T C C C T C T A A A G C A T O C A T T T T A T A A G A C C A T G B G A C T T T G C T O B C T T T A G A T C A I A N T A G E C A I A C C A C A T T T G T A G A B G T T T A C T T O E T T A A A A A C C T C C A C A C C T C C C C T G A
 6600
 T C C T T C A C G A A G T T C A G A G A C A G B G B G A T T C O A T A C G T A A A A T A T T C T G B T A C C T G A A A C O A C C G A A A T A C T A G T A T T A G T G E I A T G B T G A A A C A C T C C A A A T G A A C C A A A T T T T T G B A G B G T G T G B A G B G A C T
 6700
 A C C T G A A A C A T A A A A T G A A T G C A A T T G T T T A A C T G T T A T T O C A B C T C T A A T G B T A C A A T A A G C A T A G A T C A C A A A T T T C A C T G C A T T C T A G T T G T T G C C A A C A C T A C A T G
 6800
 T B G A C T T T G A T T T A C T T A C G T T A X A C A C A C A A T G A N C A A T A A C B T C D A G A T T A C C A A T G T T A T T C G T A T C B I A G T G T T A A G T G T T A T T C B T A A A A A A G T G A C G T A G A T C A A C A C C A A A C A G B T T T G A B T A G T T A C
 6900
 5700
 5800
 5900
 6000
 6100
 6200
 6300
 6400
 6500
 6600
 6700
 6800
 6900

FIG. 34F

[illegible]

FIG. 35A

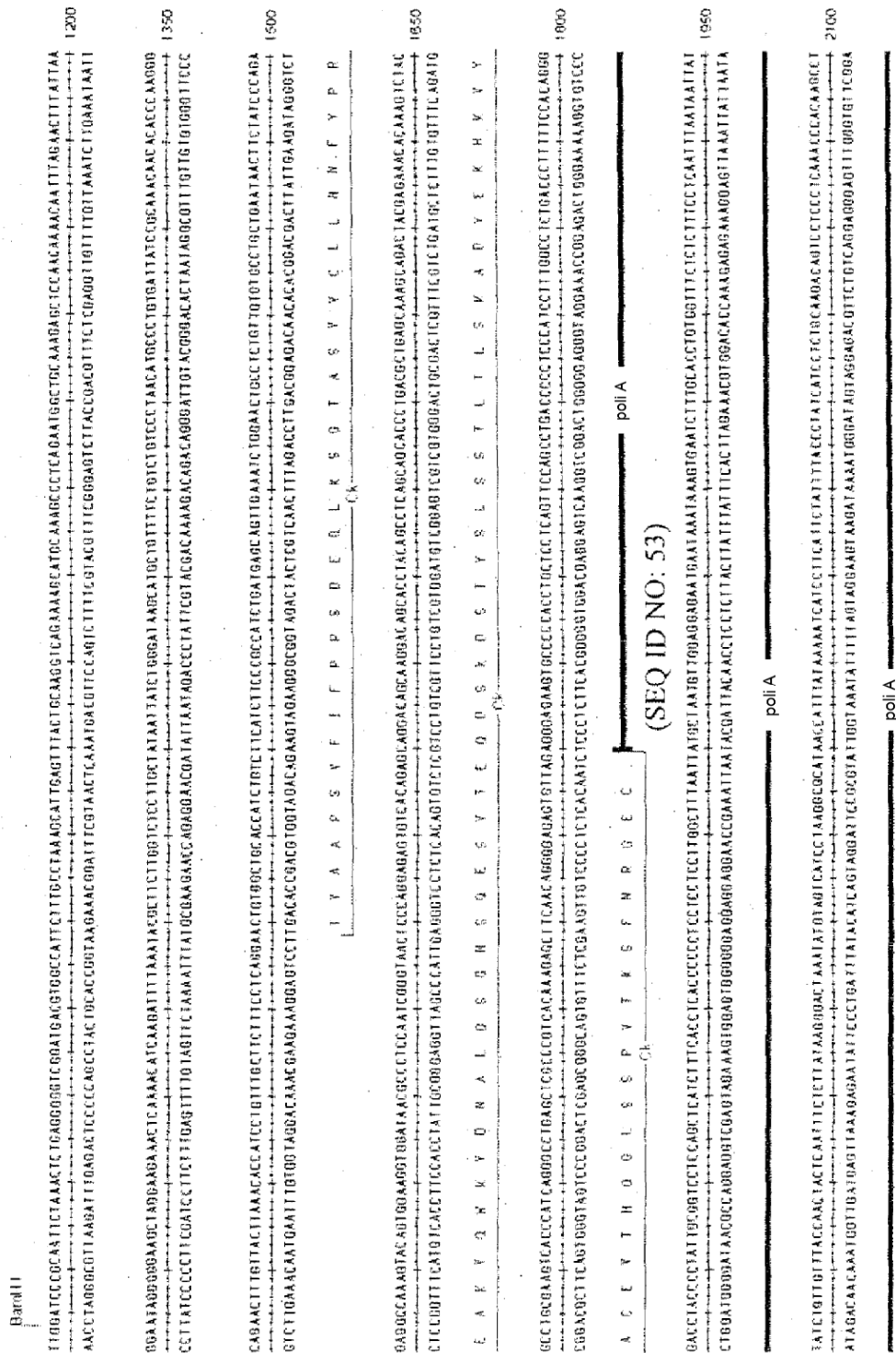


FIG. 35B

[illegible]

FIG. 35C



FIG. 35D

ELISA de competición de GY4 – Muestra frente a IgG murino GY4 biotinilado

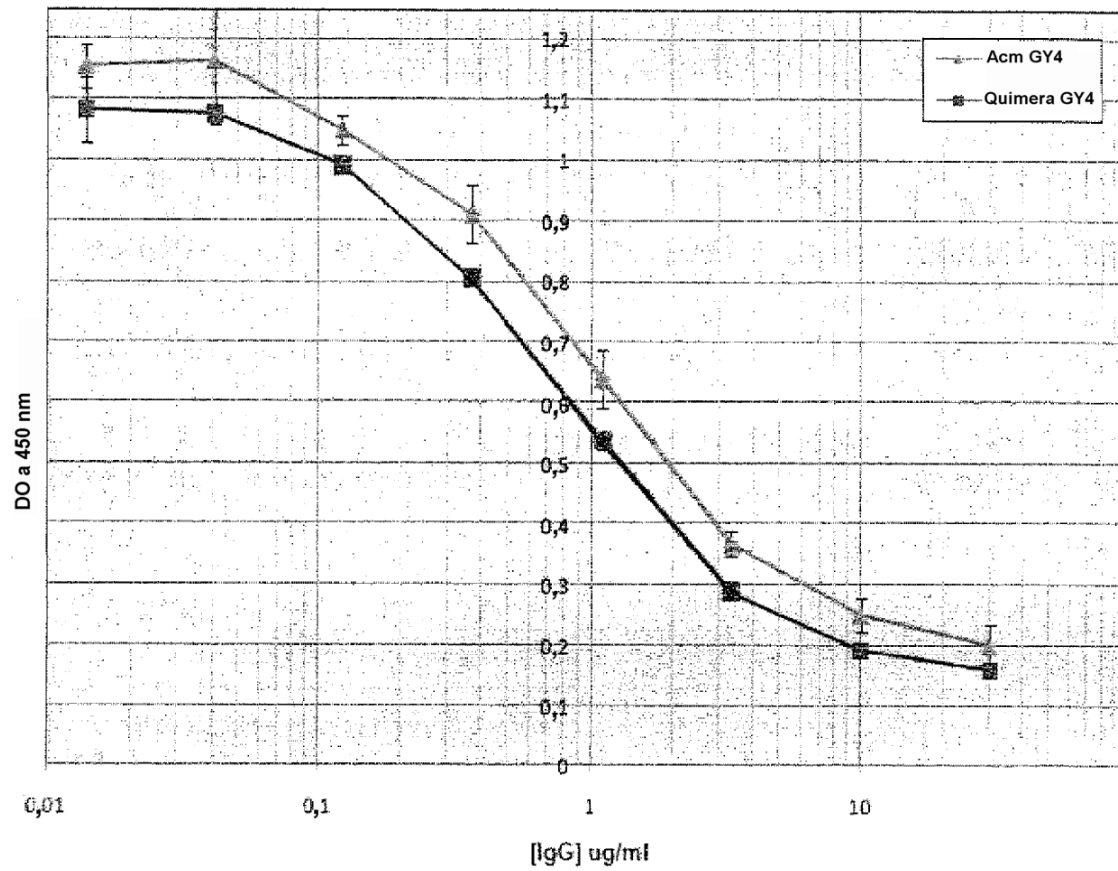


FIG. 36

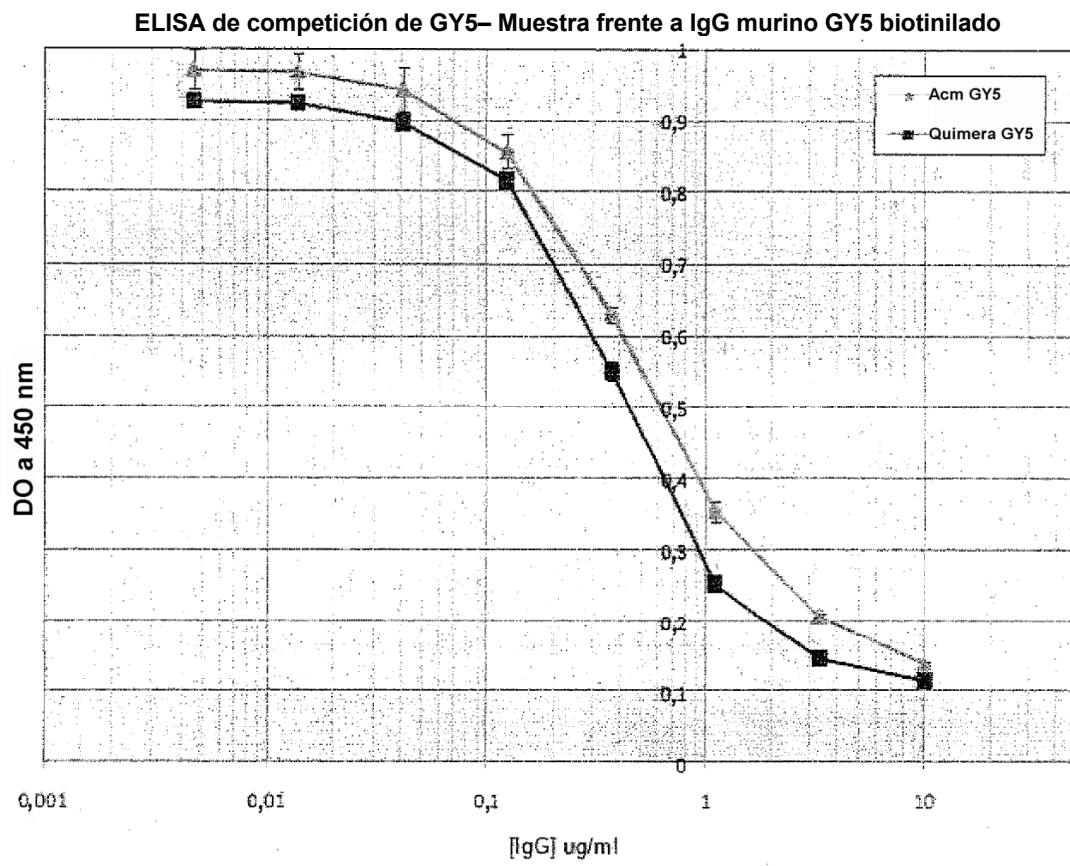


FIG. 37

CSR01-VK1 (cadena ligera kappa)

ATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCAGGGCGGCGGA	
N R V E A Q G L G L L L L L L L L P G A R	
TGTGATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCACTTTGTCTGGTTACCCCTGGGACAACCA	
C D V V M T Q S P L T L S V T L G Q P	
GCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAAATAGTGTGAAAGACATAT	
A S I S C K S S Q S L L N S D G K T Y	
TTGAATTGGTTGCAGCAGAGGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGGCCCTAATCTATCTGGTG	
L N W L Q Q R P G Q S P R R L I Y L V	
TCTAAATTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT	
S K L D S G V P D R F T G S G S G T D	
TTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTATTGCTGG	
F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C W	
CAAGGTACACATTTTCCGTTTCACGTTTCGGAGGGGGACCAAGGTGGAAATAAAACGT	(SEQ ID NO: 59)
Q G T H F P F T F G G G T K V E I K R	(SEQ ID NO: 60)

FIG. 38A

CSR01-VK2 (cadena ligera kappa)

ATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTGGCTCCAGGGCGGCGGA
M R V P A Q L L G L L L L L W L P G A R

TGTGATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCAGCTTGCCCTGTTACCTGGGACAAACCA
C D V V M T Q [S] P L [S] L [P] V T [L] G Q P

GCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAAATAGTGATGGAAGACATAT
A S I S C K S S Q S L L N S D G K T Y

TTGAATTGGTTGCAGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGGCCCTAATCTATCTGGTG
L N W L Q [Q] R P G Q S P [R] R L I Y L V

TCTAAATTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT
S K L D S G V P D R F T G S G S G T D

TTCACACTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGAGTTTATTATGCTGG
F T L K I S R V E A E D [V] G V Y Y C W

CAAGGTACACATTTTCGTTCCGTTCCGTTCCGAGGGGGACCAAGGTGGAAATAAACGTT (SEQ ID NO: 61)
Q G T H F P F T F G G G T K [V] E I K R (SEQ ID NO: 62)

FIG. 38B

CSR01-VK3 (cadena ligera kappa)
 ATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTGCTGCCAGGCGCGCGA
 M R V P A Q L L G L L L L L W L P G A R
 TGTGATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCAGCTTGCTGTTACCTGGGACAACCA
 C D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P
 GCCTCCATCTTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCCTCTTAAATAGTGATGGAAAGACATAT
 A S I S C K S S Q S L L N S D G K T Y
 TTGAATTGGTTGCAGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCGCCTAATCTATCTGCTG
 L N W L Q Q R P G Q S P R R L I Y L V
 TCTAAATTTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCTCTGCGAGTGGATCAGGGACAGAT
 S K L D S G V P D R F S G S G S G T D
 TTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTATTGCTGG
 F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C W
 CAAGGTACACATTTCCGTTTCAGTTCGGAGGGGGACCAAGGTGGAAATAAACGT (SEQ ID NO: 63)
 Q G T H F P F T F G G G T K V E I K R (SEQ ID NO: 64)

FIG. 38C

CSR01-VH4 (cadena pesada)
 ATGGGTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCTGCTGTTGCTACGGGTGTCCACTCC
 M G W S L I L L F L V A V A T R V H S
 GAGGTTGAGTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAGAAGCCAGGGCCCTCAGTCAAG
 E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K
 GTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTACTATATACACTGGGTGAGG
 V S C T A S G F N I K D Y Y I H W V R
 CAGGCCCTGGACAGGGCCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAAATGGTGAT
 Q A P G Q G L E W I G W I D P E N G D
 ATTGAATATGCCCGAAGTTCAGGGCAGGGCCACTATCAGTGCAGACACATCCACC
 I E Y A P K F Q G R A T I T A D T S T
 GATACAGCCTACATGGAGTTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCGCTATTAC
 D T A Y M E F S S L R S E D T A V Y Y
 TGTCTCTACCAAGAAGGCTCCTGGGGCCCAAGCACCACTGTGCAGTCTCTCTCA (SEQ ID NO: 65)
 C L Y Q E G S W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO: 66)

FIG. 38D

CSR01-VH5 (cadena pesada)

ATGGGTTGGAGCCCTCATCTTGCTCTTCCTTGTCGCTGTTGCTACGGCGTGTCCACTCC
M G W S L I L L F L V A V A T R V H S
GAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAGAAGCCAGGGGCCCTCAGTCAAG
E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K
GTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTACTATATACACTGGGTGAGG
V S C T A S G F N I K D Y Y I H W V R
CAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGATGGATTCCTGAGAATGGTGAT
Q A P G Q G L E W I G W I D P E N G D
ATTGAATATGCCCCGAAAGTTCAGGGCAGGGCCACTATCACTGCAGACACATCCACC
I E Y A P K F Q G R A T I T A D T S T
GATACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCCTGAGATCTGAGGACACTGCCGTCTATTAC
D T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y
TGCTCTACCAAGAAGGCTCCTGGGGCCCAAGGCACCACCTGTCAAGTCTCTCTCA (SEQ ID NO: 67)
C L Y Q E G S W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO: 68)

FIG. 38E

CSR02-VK2(cadena ligera kappa)

ATGAGGTCCTCCGCTCAGCTCCTGGGCTCCTGCTGCTGCTCCAGGCGCGGA
M R V P A Q L L G L L L L W L P G A R
TGTGATGTTGTGATGACCCCAATCTCCACTCTCCCTGCTGCTGCTGCTGACAGCCA
C D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P
GCCTCCATCTTTGCCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTCACAGTAATGGAAACACCTAT
A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y
TTACAGTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACACAGTT
L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y T V
TCCAACCGATTTCTGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACCGAT
S N R F S G V P D R F S G S G S G T D
TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGAGTTTATTTCTGCTCT
F T L K I S R V E A E D V G V Y F C S
CAAAGTACACATGTTCTTCTTTCACGTTCCGCCAGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGT (SEQ ID NO: 69)
Q S T H V P F T F G Q G T K L E I K R (SEQ ID NO: 70)

FIG. 39A

CSR02-VK3 (cadena ligera kappa)

ATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGGCTCTGGCTCCAGGCGGCGGA
M R V P A Q L L G L L L L L W L L P G A R
TGTGATGTTGTGATGACCCAAATCTCCACTCTCCCTGCTGCTGCTCTGGACAGCCA
C D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P
GCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTCCACAGTAATGGAACACCTAT
A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y
TTACAGTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACACAGTT
L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y T V
TCCAACCGATTTTCTGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGCCAGAT
S N R F S G V P D R F S G S G S G P D
TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGAGTTTATTACTGCTCT
F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C S
CAAAGTACACATGTTCCCTTTCACGTTCCGGCCAGGGGACAAAGTTGGAATAAAACGT (SEQ ID NO: 71)
Q S T H V P F T F G Q G T K L E I K R (SEQ ID NO: 72)

FIG. 39B

CSR02-VH4 (cadena pesada)

ATGGGTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGTGCTGCTGTGCTACGCGTGTCCACTCC
M G W S L L L L F L V A V A T R V H S
CAGGTCCAACTGGTGCAGTCTGGGTCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K
GTGTCTTGCAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCAACTACATAAACTGGGTGAGA
V S C K A S G Y T F T S N Y I N W V R
CAGGCCCTGGACAGGGCCCTTGAGTGGATCGGAAATATCTATCTCTGTGATGGTTT
Q A P G Q G L E W I G N I Y P S D G F
ACTAACTACAATCAAAAGTCAAGGACAGGGTGACAATCACTGTAGACAAATCCACC
T N Y N Q K F K D R V T I T V D K S F
AGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCGGTCTATTAC
S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y
TGTAAGAAGAACTTCGATGTCTGGGGCCCAAGGGACCAAGGTCACCGTCTCTCTCA (SEQ ID NO: 73)
C T R N N F D V W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO: 74)

FIG. 39C

CSR02-Vh5 (cadena pesada)

ATGGGTTGGAGCCTCATCTTGTCTTCTTGTCTGCTGTGCTACGGGTGTCCACTCC
 M G W S L I L L F L V A V A T R V H S
 CAGGTCCAACTGGTGCAGTCTGGGTCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K
 GTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCAACTACATAAACTGGGTGAGA
 V S C K A S G Y T F T S N Y I N W V R
 CAGGCCCCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATGGGAAATATCTATCCTTCTGATGGTTT
 Q A P G Q G L E W M G N I Y P S D G F
 ACTAACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAGGGTGACAATCACTGTAGACAAATCCACC
 T N Y N Q K F K D R V T I T V D K S T
 AGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGGGTCTATTAC
 S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y
 TGTACAAGAAACTTCGATGTCTGGGGCCCAAGGGACCACGGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 75)
 C T R N F D V W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO: 76)

FIG. 39D

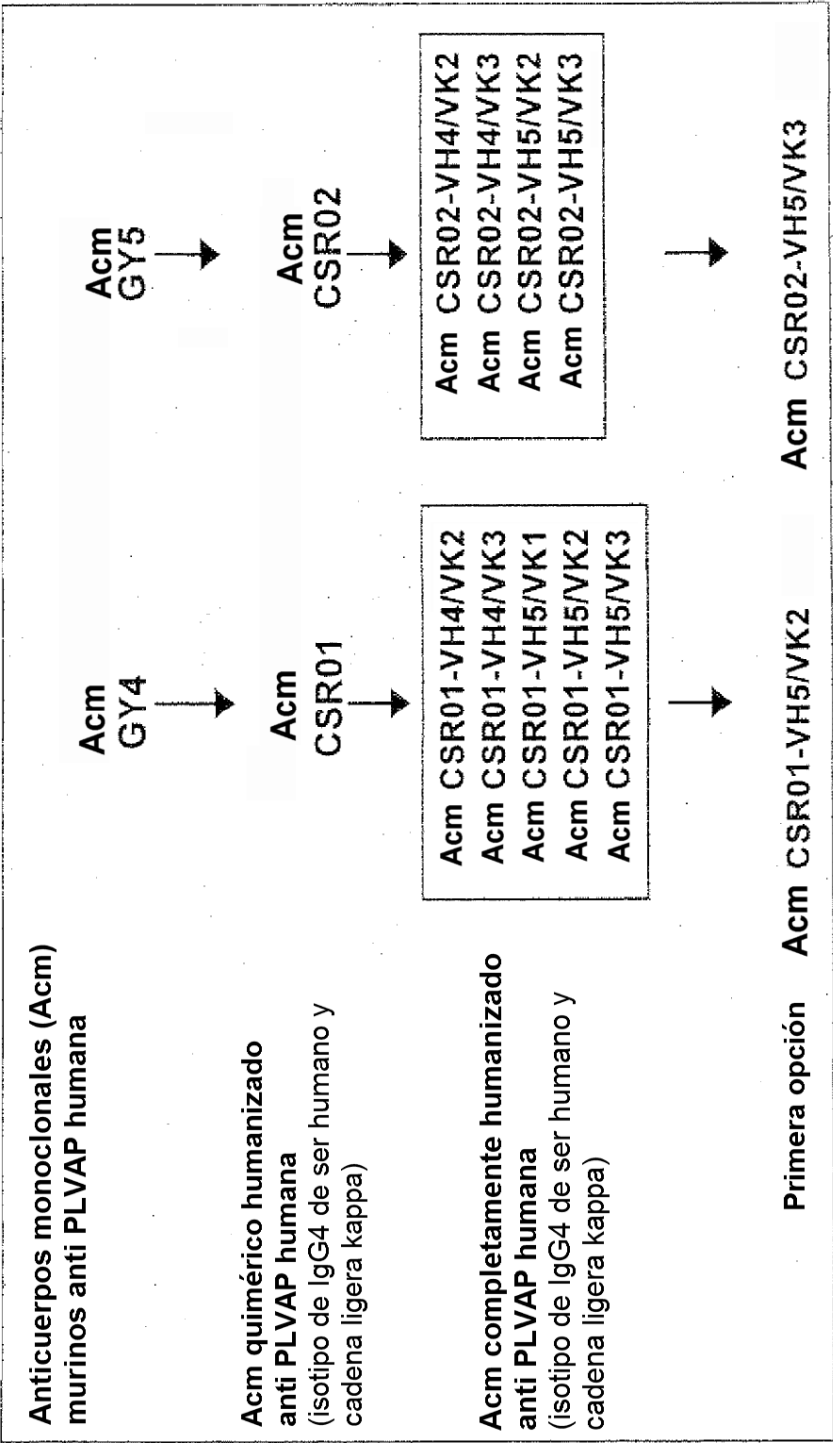


FIG. 40

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CAGGTCCAAGTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCAACTACA
Q V Q L V Q S G A E L K K P G A S V K L S C K A S G Y T F T S N Y
10      20      30
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TAACTGGGTGAACACAGGCCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATCGGAATATCTATCTCTGATGGTTTAACTAACTACAAATCAAAANGTTCAAGGACAG
I N W V K Q A P G Q G L E W I G N I Y P S D G F T N Y N Q K F K D R
40      50      60      70      80      90
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCACATTTGACTGTAGACAAATCCACGACAGCCCTACATGAGGCTCAGCAGCCCTGAGATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAGAACTTC
A T L T V D K S T S T A Y M E L S S L R S E D S A V Y Y C T R N F
70      80      90
310     320     330     340
GATGCTGGGGCCAGGACCCAGGTCAACCGTCTCTCTCA
D V W G Q G T T V T V S S
98 103      110      113

```

FIG. 41A

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CAGGTCCAAGTGGTGGTCTGGGTCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAAGCAACTACA
 Q V Q L V Q S G S E L K K K P G A S V K L S C K A S G Y T F T S N Y
 10 20 30
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TAACTGGGTGAACAGGCCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATCGGAATATCTATCCTTCGTGATGGTTTACTAATCAATCAAAAGTTCAAGGACAG
 I N W V K Q A P Q Q G G L E W I G N I Y P S D G F T N Y N Q K F K D R
 40 50 52 52a 60
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGCCACATTTGACTGTAGACAAATCCACAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGGGTCTATTACTGTACAAAGAACTTC
 A T L T V D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C T R N F
 70 80 82 82a b c 90
 310 320 330 340
 GATGCTGGGGCCAGGGACCAAGGTCACCGTCTCTCTCA (SEQ ID NO: 79)
 D V W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO: 80)
 98 103 110 113

FIG. 41B

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CAGGTCCTCAACTGGTGTGACAGTCTGGGTCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCAACTACA
 Q V Q L V Q S G S E L K K K P G A S V K L S C K A S G Y T F T S N Y
 10 20 30
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TAACTGGGTGAGACAGGCCCTCGACAGGGCCTTGAGTGGATCGGAATATCTATCTCTCTGATGGTTTACTAACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAG
 I N W V R Q A P Q A P G Q G L E W I G N I Y P S D G F T N Y N Q K F K D R
 40 50 52 52a 60
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGTGACATTTGACTGTAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGGGTCTATTTACTGTACAAGAACTTC
 V T L T V D K S T S T A Y M E L S S L R S E D F A V Y Y C T R N F
 70 80 82 82a b c 90
 310 320 330 340
 GATGCTGGGGCCAAAGGACACCGGTACCGTCTCCTCA
 D V W G Q G T T V T V S S
 98 103 110 113
 (SEQ ID NO: 81)
 (SEQ ID NO: 82)

FIG. 41C

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CAGGTCCAAC	TGGTGCAGTCTGGGTC	TGAGCTGAAGAAGCC	TGGGGCTTCAGTGAAGG	TCCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTT	CACCTTCAACCAGCAACTACA				
Q V Q L V Q S G S E L K K K P G A S V K V S C R A S G Y T F T S N Y									
	10				20				30
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TAAACTGGGTGAGACAGGCCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATCGGAATA	TATCTA	CTCTTCIGATGGTTT	TACTAACATCAAAAAGTTCAAGGACAG						
I N W V R Q A P G Q G L E W I G N I Y P S D G F T N Y N Q K F K D R									
	40			50	52	52a	60		
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
GGTGACAATCACTGTAGACAAATCCACCAGCACAGCTTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGGGCTCATTTACTGTACAGAAGAACTTC									
V T I T V D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C T R N F									
	70		80	82	82a	b c	90		
310	320	330	340						
GATGTC	TGGGCCAAGGACCA	CGGTCA	CCGCTCCTCA	(SEQ ID NO: 83)					
D V W G Q G T T V T V S S				(SEQ ID NO: 84)					
98 103		110	113						

FIG. 41D

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CAGGTCCAACTGGTGCAGTCTGGGTCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTGCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCCAGCAACTACA
 Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S N Y
 10 20 30
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TAAACTGGGTGAGACAGGCCCCCTGGACAGGGCCCTTGAGTGGATGGGAAATATCTATCCCTTCTGATGGTCTTACTACTCAATCAAAAGTTCAAGGACAG
 I N W V R Q A P Q A P G Q G L E W M G N I Y P S D G F T N Y N Q K F K D R
 40 50 52 52a 60
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGTGACAATCACTGTAGACAAATCCACAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGAGACACCGGGTCTATTACTGTACAAAGAACTTC
 V T I T V D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C T R N F
 70 80 82 82a b c 90
 310 320 330 340
 GATGCTGGGGCCCAAGGGACCCAGGTCCACCGTCTCTCTCA
 D V W G Q G T T V T V S S
 98 103 110 113

(SEQ ID NO: 85)
(SEQ ID NO: 86)

FIG. 41E

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																							
GATGTTGTGATGACCCCAATCTCCACTCTCCCTGGCTGTGACACTCTTGGACAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTCCACAGTAATG																																
D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N

110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																								
GAAACACCTATTTTACAGTGGTACCTGTCAGAGAGCCAGGCGAGTCTCCACAGCTCTCTGATCTACACAGTTTCCAAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT																																	
G	N	T	Y	L	Q	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	T	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F

210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																							
CAGTGGCAGTGGATCAGGGCCAGAGTTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGAGTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTCT																																
S	G	S	G	S	G	P	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	F	C	S	Q	S	T	H	V	P

310	320	330									
TTCACGTTTCGGCCAGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA											
F	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
106 106a											

(SEQ ID NO: 87)
(SEQ ID NO: 88)

FIG. 42A

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAGTTTGATGACCCCAATCTCCAC	TCTCCCTGCTGCTCCTTGGACAG	CGCCCTCCATCTCTTGCAGATCT	TCTTGCAGAGCCTTGTCACAGTA	TG					
D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L V H S N									

110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAAACACCTATTACAGTGGTACCT	GCAGAGCCAGCCAGTCCTCCACAG	CTCTGATCTACACAGTTTCCAA	CCGATTTCTGGGGTCCACAGAG	TT					
G N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I V T V S N R F S G V P D R F									

210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CAGTGGCAGTGGATCAGGGACCG	ATTTCACACTCAAGATCAGCAG	AGTGGAGGTGAGGATGTTGAG	GTCTCTCAAAAGTACACATG	TTCT					
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y F C S Q S T H V P									

310	320	330
TTCACGTTTCGGCCAGGGACAA	AGTTGGAAATAAAA	
F T F G G Q G T K L E I K		
100	106	106a

FIG. 42B

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GATGTTGTGATGACCCAAATCTCCACTCTCCCTGCTGCTCACTCTTGGACAGCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTCCACAGTAATG
 D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L V H S N

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GAAACACCTATTACAGTGGTACCTGCAGAGAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACACAGTTTCCACCGATTCTTGGGGTCCCAGACAGGTT
 G N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y T V S N R F S G V P D R F

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CAGTGGCAGTGGATCAGGGCCAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGTGAGGATTTTATTACTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTCT
 S G S G S G P D F T L K I S R V E A E D V G V Y C S Q S T H V P

310 320 330
 TTCACGTTTCGGCCAGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA
 F T F G Q G T K L E I K
 100 106 106a

(SEQ ID NO: 91)
 (SEQ ID NO: 92)

FIG. 42C

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAGGTTGAGTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGTTTAAGAAGCCAGGGGCTCAGTCAAGTTGTCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTTACTATA
 E V Q L V Q S G A E F K K P G A S V K L S C T A S G F N I K D Y Y
 10 20 30
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TACACTGGGTGAAGCAGGCCCCCTGGACAGGGCCCTGGAGTGGATGGATGATCCCTGAGAAATGGTGATATGAATATGCCCCGAAGTTCAGGGCAG
 I H W V K Q A P G Q G L E W I G W I D P E N G D I E Y A P K F Q G R
 40 50 52 52a 60
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGCCACTATGACTGCAGACACATCCACCAATACAGCCTACCTGGAGTTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGCTTATTACTTACTTACCAAGAA
 A T M T A D T S T N T A Y L E F S S L R S E D T A V Y Y C L Y Q E
 70 80 82 82a b c 90
 310 320 330 340
 GGCTCCTGGGCCAAGGCACCACTGTACACAGTCTCTCA
 G S W G Q G T T V T V S S
 98 103 110 113
 (SEQ ID NO: 93)
 (SEQ ID NO: 94)

FIG. 43A

[illegible]

FIG. 43B

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGACAGAGTGGAAGCCAGGGGCTCAGTCAGAGGTGTCCTGGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACTACTATA
E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C T A S G F N I K D Y Y
10      20
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TACACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGACAGGCCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCCTGAGAAATGGTGATATGAAATATGCCCCGAAAGTTCCAGGGCAG
I H W V R Q A P G Q G L E W I G W I D P E N G D I E Y A P K F Q G R
40      50      60      70      80      90
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCACTATCAGTCAGACACATCCACCAATACAGCCCTACATGGAGTTCAGAGCCCTGGAGATCTGAGGACACTGCGCTCTATTACTGTCTTACCAAGAA
A T I T A D T S T N T A Y M E F S S L R S E D T A V Y Y C L Y Q E
70      80      90      100      110      120      130      140      150      160
50 52 52a 60
310     320     330     340
GGCTCCTGGGGCCAGGCACCACTGTGCACAGTCTCTCA
G S W G Q G T T V T V S S
98 103      110      113

```

(SEQ ID NO: 97)
(SEQ ID NO: 98)

FIG. 43C

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																								
GAGGTT	CAGCTGGT	GCAGTCTGGGG	CAGAGGTGAAGA	CCAGGGCCCTCAGTCA	AGGTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTACTATA																												
E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	T	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	Y	
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																								
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																								
TACACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGACAGGGCCCTGGAGTGGATTGGATCCTGAGAAATGGTGATATGAATATGCCCCGAAGTTC																																	
I	H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	D	P	E	N	G	D	I	E	Y	A	P	K	F	Q	G	R
40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																	
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																								
GGCCACTATACATGCAGACACATCCACCGATACAGCCTACATGGAGTTACAGAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGCTTACTTACTTCTTACCAAGAA																																	
A	T	I	T	A	D	T	S	T	D	T	A	Y	M	E	F	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	L	Y	Q	E	
70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300										
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400																								
GGCTCTCTGGGGCCCAAGGCACCACTGTACAGTCTCCTCA																																	
G	S	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S																					
98	103	110	115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240	245	250	255	260	

FIG. 43D

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAGGTTGAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGCTGAAGAAGCCAGGGGCTCAGTCAAGGTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTACTATA
 E V Q L V Q S G A E V K K K P G A S V K V S C T A S G F N I K D Y Y
 10 20 30
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TACACTGGGTGAGGCAGGCCCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGATCCTGAGAATGGTGATATGAATATGCCCGAAGTTCAGGGCAG
 I H W V R Q A P G Q A P G Q G L E W I G W I G W I E Y A P K F Q G R
 40 50 52 52a 60
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGTGACTATCAGTGCAGACACATCCACCGATACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTCTTACCAAGAA
 V T I T A D T S T D T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C L Y Q E
 70 80 82 82a b c 90
 310 320 330 340
 GGCTCCTGGGGCCCAAGGCACCACTGTGCACAGTCTCTCA
 G S W G Q G T T V T V S S
 98 103 110 113

(SEQ ID NO: 101)

(SEQ ID NO: 102)

FIG. 43E

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCCTTGTGGTTTACCTGGGACAACACAGCCTCCATCTCTTGGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTTAAATAGTGAAG
D V V M T Q S F L T L S V T L G Q P A S I S C K S Q S L L N S D
10

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAAAGACATATTTGAATTGGTTGCAGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAATTTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTT
G K T Y L N W L Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F
30      40      50      60

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACACIGMAAATCAGCAGAGTGGAGGTGGAGTTTATTTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCG
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P
70      80      90

310     320     330
TTCACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGGTGGAAATTAATA
F T F G G G T K V E I K
100      106 106a

```

(SEQ ID NO: 103)
(SEQ ID NO: 104)

FIG. 44A

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTTGGATGACCCAGTCTCCACTCAGCTTGCCCTGTTACCTGGGACAACAGCCCTCCATCTCTTGC AAGTCAAGTCAGAGCCCTCTTAATAGTGATG									
D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S S Q S L L N S D									
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
27 27a b c d e									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAAAGACATATTTGAAATTGGTTGACAGAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCCTAAATCTATCTGGTGTCTAAATTTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTT									
G K T Y L N W L Q Q R P G Q S P R L I Y L V S K L D S G V P D R F									
30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTCAGGATGTGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCG									
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P									
70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
TTTACGTTTCGGAGGGGGACCAAGGTGGAAATAAAA									
F T F G G G T K V E I K									
100	110	120	130	140	150	160	170	180	190
106 106a									

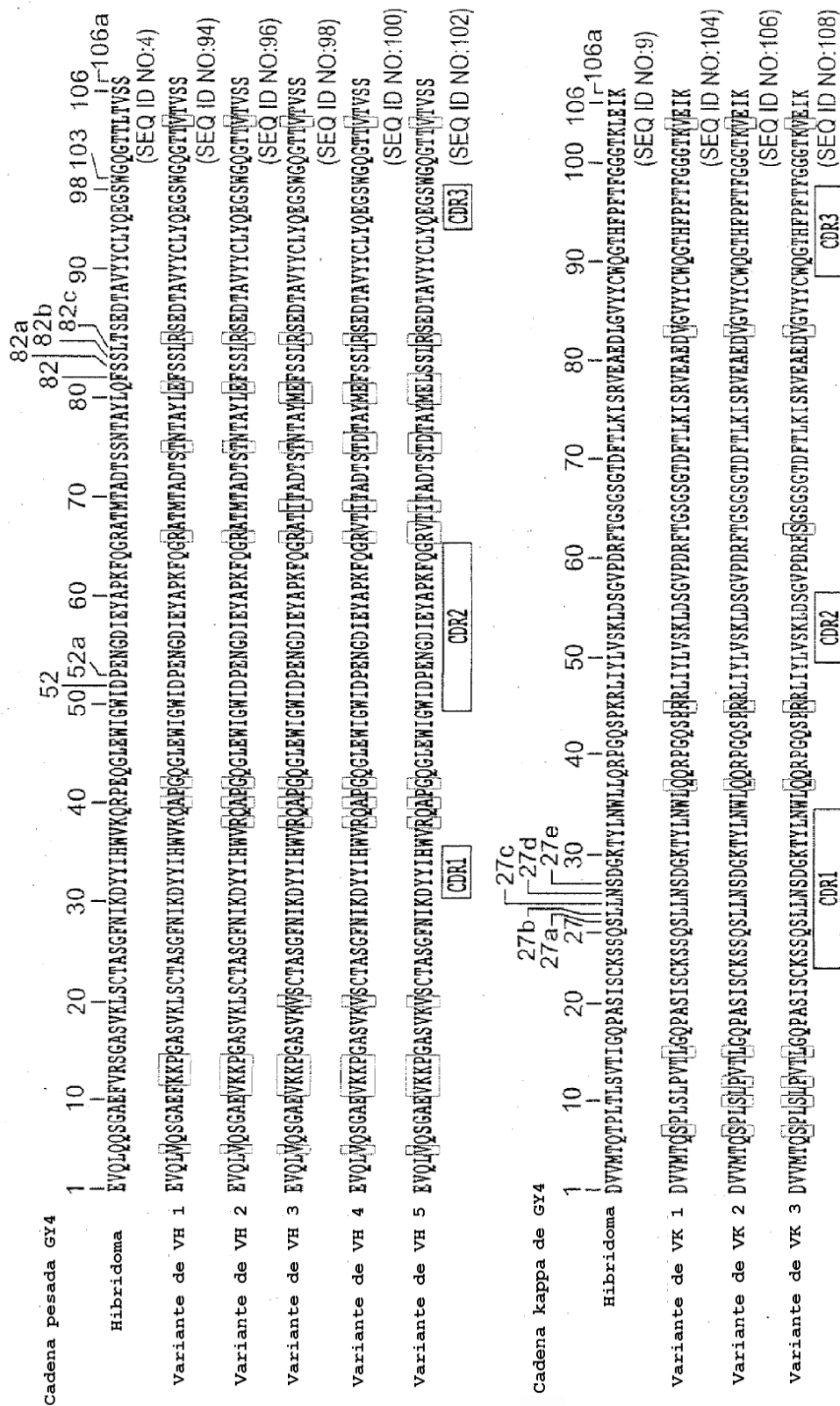
(SEQ ID NO: 105)
(SEQ ID NO: 106)

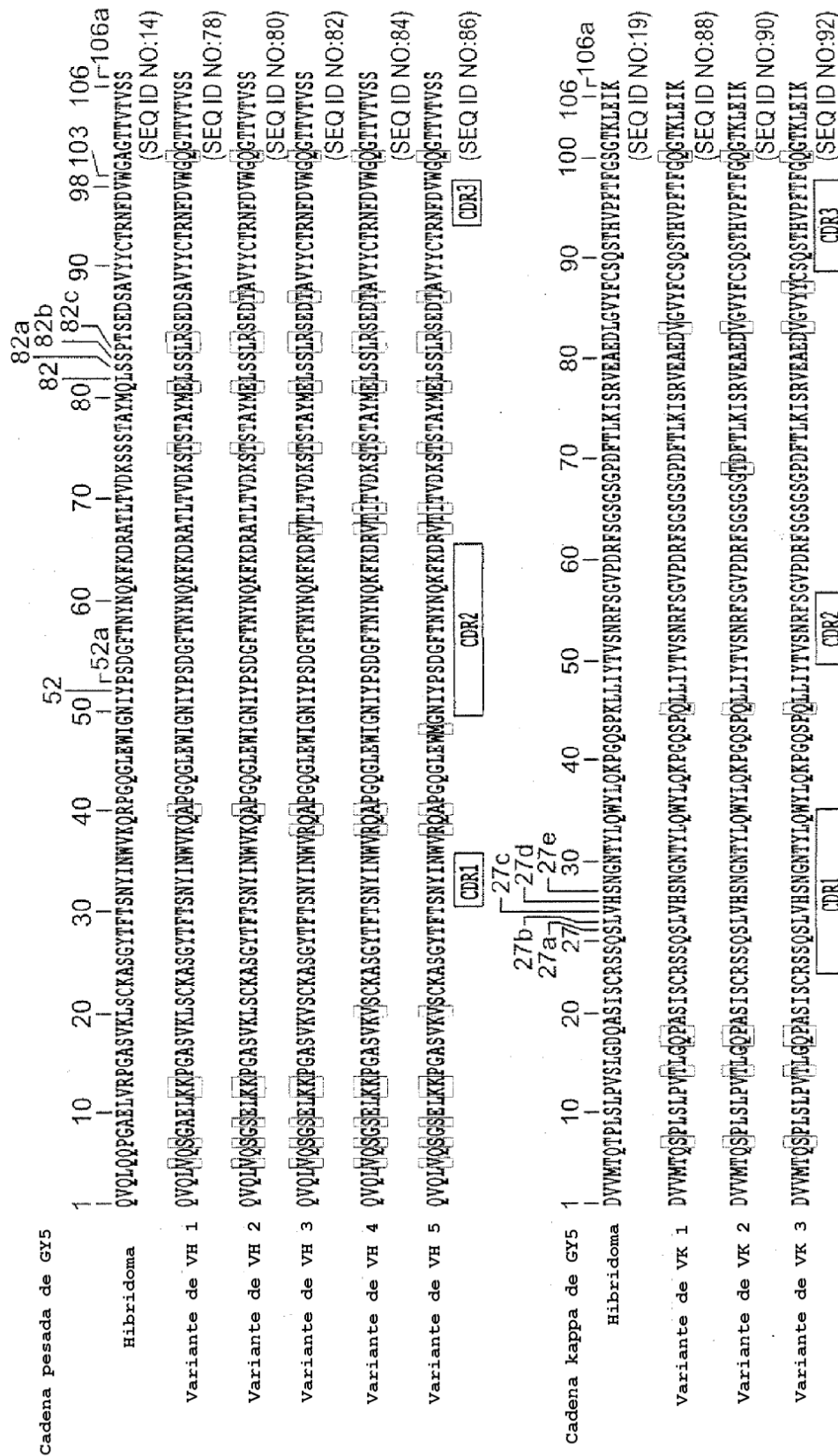
FIG. 44B

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GATGTTGATGACCCAGTCTCCACTCAGCTTGGCTTACCTGGGACAACCCAGCTCCATCTCTTGGCAAGTCAAGTCAGAGCCCTCTTAAATAGTGATG
 D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C K S Q S L L N S D
 10 20 27 27a b c d e
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GAAAGACATATTGAAATTGGTTGCAGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAMGGCGCTAACTAATCTAATCTGGTGTCTTAAATTTGGACTCTGGAGTCCCTTGACAGGTT
 G K T Y L N W L Q Q R P G Q S P R R L I Y L V S K L D S G V P D R F
 30 40 50 60
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CTTCTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACACTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCG
 S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C W Q G T H F P
 70 80 90
 310 320 330
 TTCACGTTTCGGAGGGGGACCAAGGTGGAATAAAAA
 F T F G G G T K V E I K
 100 106 106a

(SEQ ID NO: 107)
(SEQ ID NO: 108)

FIG. 44C





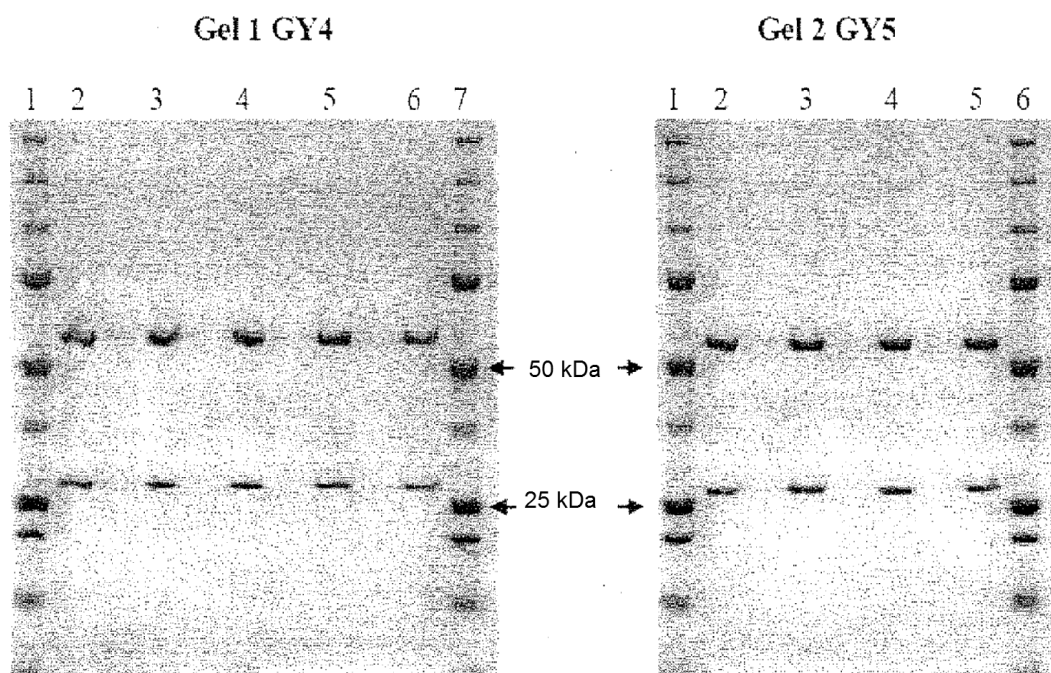


FIG. 47A

FIG. 47B

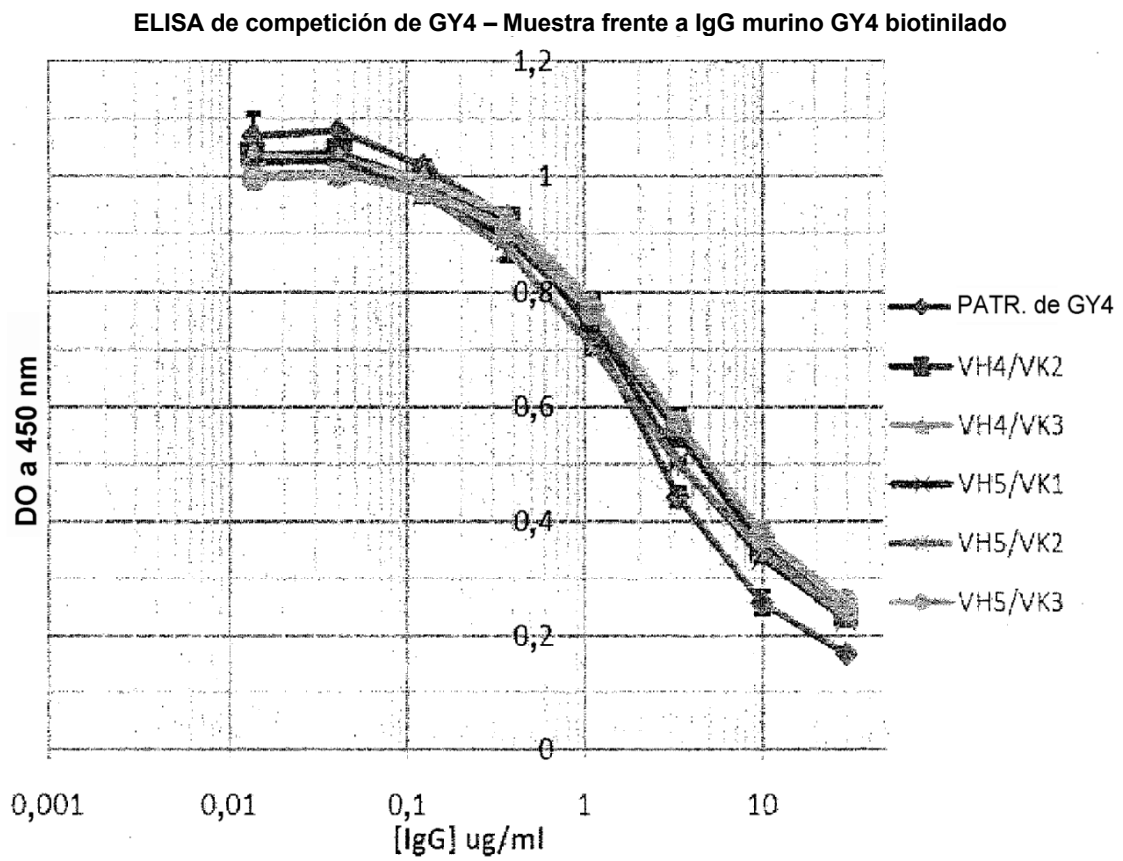


FIG. 48

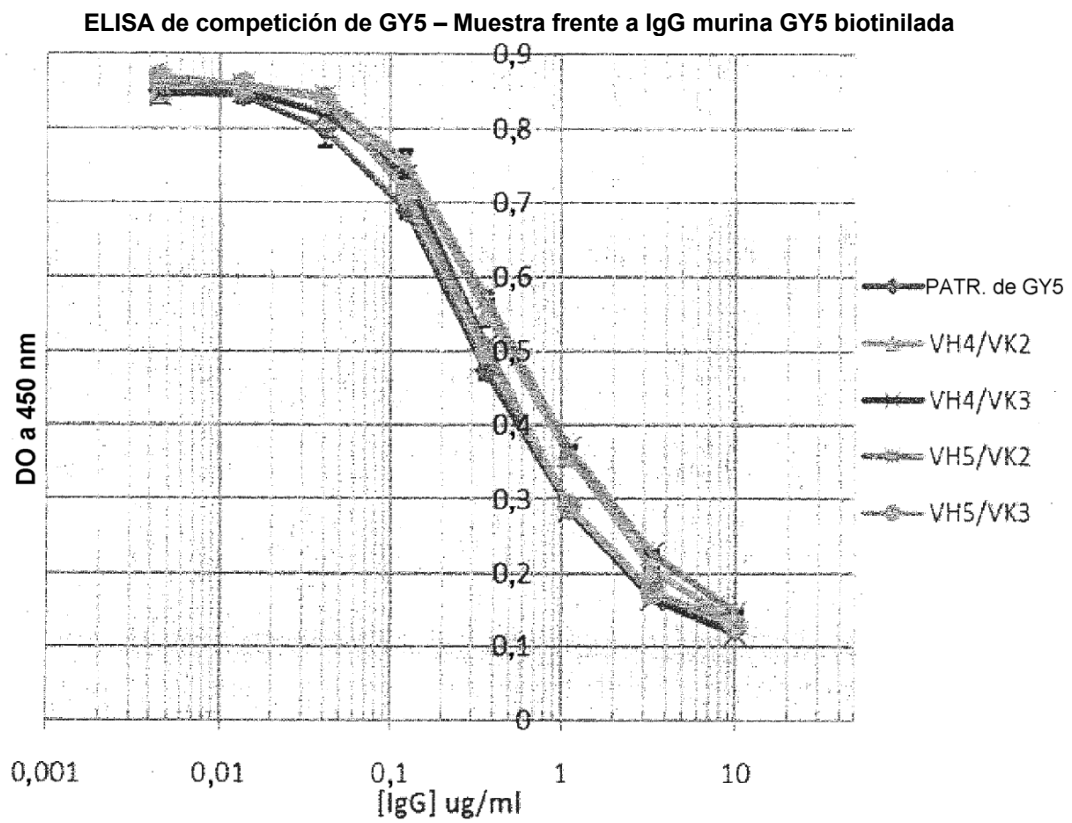


FIG. 49

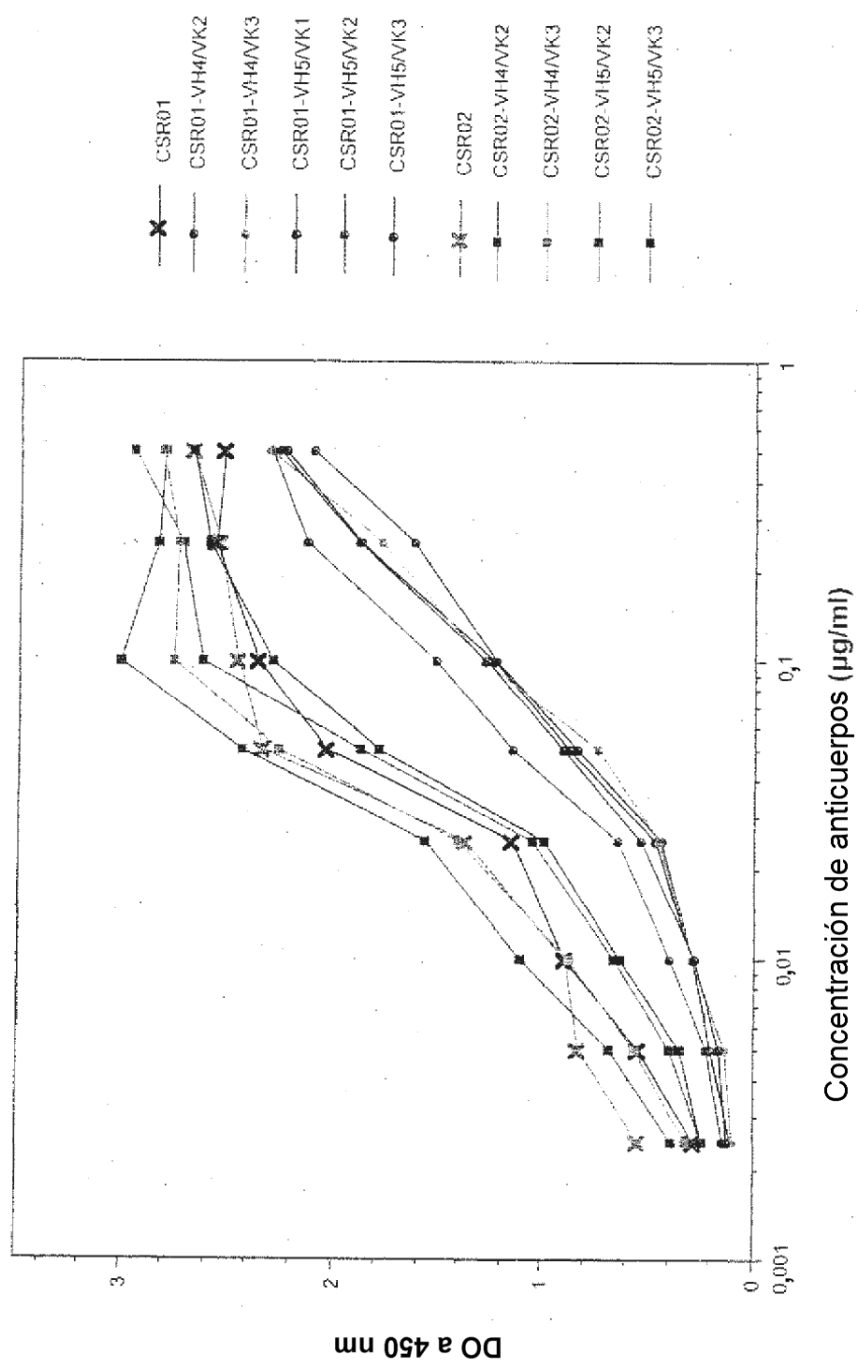


FIG. 50

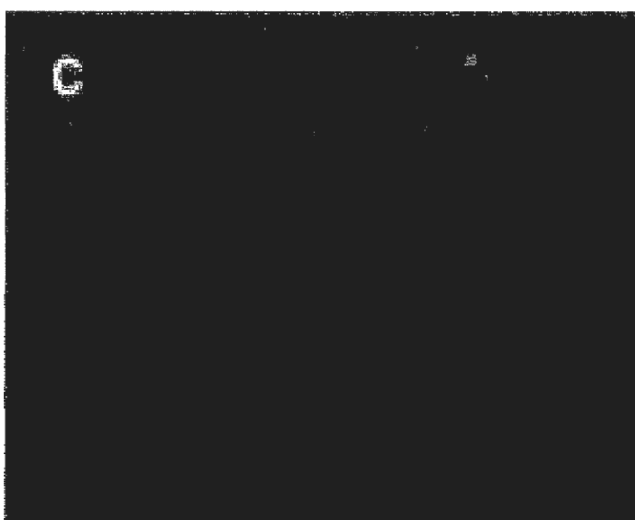
FIG. 51A



FIG. 51B



FIG. 51C



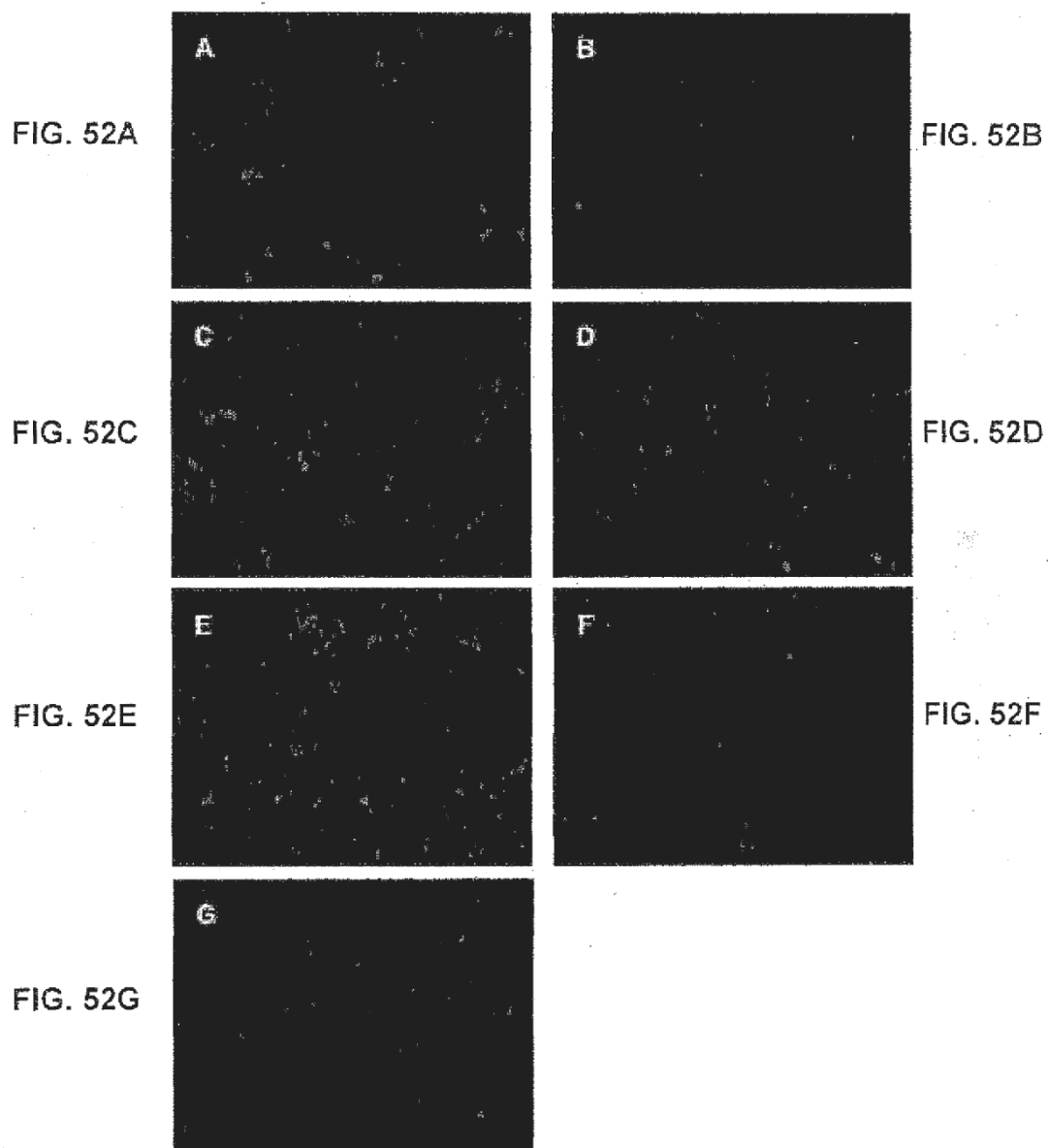


FIG. 53A



FIG. 53B



FIG. 53C

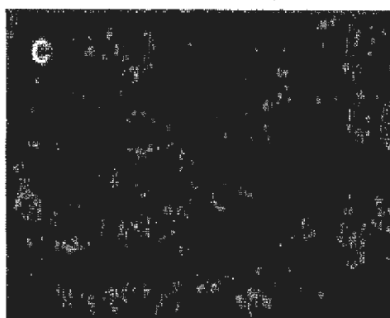


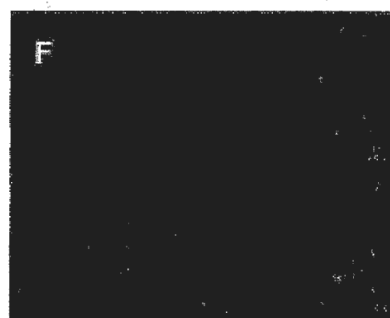
FIG. 53D



FIG. 53E



FIG. 53F



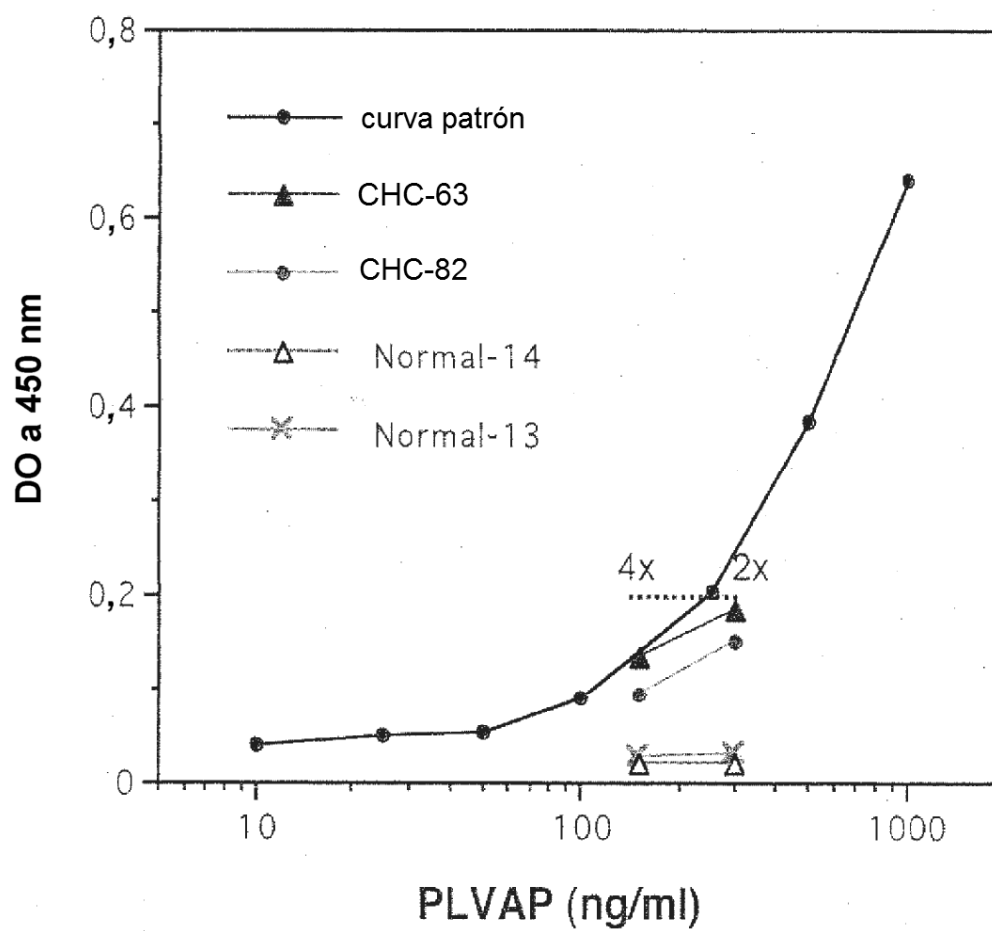


FIG. 54