



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 128**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04711993 .8**

96 Fecha de presentación : **18.02.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1597367**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54

Título: **Antígeno de glucoproteína SIMA135 expresado en células de tumor humanas metastásicas.**

30

Prioridad: **19.02.2003 US 448828 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.12.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.12.2010**

73

Titular/es: **NOVARTIS AG.**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH**  
**NOVARTIS PHARMA GmbH y**  
**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE**

72

Inventor/es: **Quigley, James, P.;**  
**Testa, Jacqueline, E. y**  
**Hooper, John, D.**

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 349 128 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).

**ANTÍGENO DE GLUCOPROTEÍNA SIMA135 EXPRESADO EN CÉLULAS DE TUMOR HUMANAS METASTÁSICAS**

**DESCRIPCIÓN**

Campo de la Invención

10 La invención se relaciona generalmente con métodos para diagnosticar cáncer y para reducir la metástasis por células de cáncer en un mamífero, tal como un humano. Más específicamente, la invención se relaciona con el uso de una proteína marcadora de tumor para crear anticuerpos que se pueden utilizar para detectar la producción incrementada de la proteína en una célula, y uso de los anticuerpos para reducir la metástasis por células de cáncer que producen la proteína marcadora de tumor.

15 Antecedente de la Invención

Un tumor maligno muda células que migran a nuevos tejidos y crean tumores secundarios mientras que un tumor benigno no genera tumores secundarios. El proceso de generar tumores secundarios se denomina metástasis y es un proceso complejo en el que las células de tumor colonizan los lugares distintos del tumor principal. La metástasis de tumor sigue siendo la causa principal de la muerte de los pacientes con 20 cáncer, aún no se entienden claramente los mecanismos moleculares que subyacen a la diseminación de células de tumor.

La metástasis es un proceso multi-etapas en el que las células de tumor de se desprenden del tumor principal, invaden la matriz celular, penetran a través de los vasos sanguíneos, entran así en el sistema circulatorio (intravasado), se detienen en un lugar distante, salen del torrente circulatorio (extravasado), y 25 crecen. Ver, por ejemplo, G. L. Nicolson (1982) *Biochim. Biophys. Acta.* 695: 113-176; G. L. Nicolson y G. Poste (1983) *In. Rev. Exp. Pathol.* 25: 77-181; G. Poste y I. J. Fidler (1980) *Nature* 283: 139-145; y E. Roos (1984) *Biochim. Biophys. Acta.* 738: 263-284. Dada la complejidad del proceso, se piensa que numerosos genes median la metástasis de células de tumor. De hecho, se ha correlacionado el fenotipo metastásico con la expresión de una variedad de proteínas, que incluyen proteasas, moléculas de adhesión, y similares. Sin 30 embargo, falta evidencia o es difícil de probar que una proteína dada está involucrada directamente en la diseminación. L. A. Liotta y W. Stetler-Stevenson (1989) *J. Natl. Cancer Inst.* 81: 556-557.

El carcinoma epidermoide humano, HEp-3, proporciona un único sistema que se puede utilizar para detectar y caracterizar los genes que afectan la diseminación metastásica. Las células HEp-3 que se propagan mediante pasaje serial en la membrana corioalantoidea de pollo (CAM), son cancerígenas y 35 espontáneamente metastásicas (T+M+). L. Ossowski y E. Reich (1980a) *Cancer Res.* 40: 2300-2309. Sin embargo, cuando tales células se hacen crecer continuamente *in vitro*, forman fácilmente tumores principales, pero llegan con el tiempo a ser progresivamente no metastásicas (T+M-). L. Ossowski y E. Reich (1980b) *Cancer Res.* 40: 2310-2315. Con el cultivo prolongado *in vitro*, ellas eventualmente también llegan a ser no cancerígenas (T-M-). La pérdida de la capacidad metastásica es reversible. Las células T+M- 40 llevadas en la membrana corioalantoidea para dos o tres pasajes recuperan la capacidad de formar metástasis espontánea. Así, al alterar las condiciones de crecimiento, el potencial metastásico de estas células se puede manipular por el investigador.

Se muestra que el activador de plasminógeno tipo urocinasa humano (uPA) está involucrado directamente en la diseminación de HEp-3, cuando la metástasis espontánea de las células HEp-3 en los 45 embriones de pollo se inhibe por los anticuerpos que son específicos para el uPA humano. L. Ossowski y E. Reich (1983b) *Cell* 35: 611-619. Posteriormente, se observa que la inhibición de la actividad de uPA bloquea la infiltración del mesénquima CAM mediante las células HEp-3 individuales. L. Ossowski (1988a) *Cell* 52: 321-328. Sin embargo, el uPA activo parece ser requerido por la intravasación de células de tumor pero no la extravasación. L. Ossowski (1988a). Así, también algunos otros factores deben estar

5 involucrados en la diseminación de HEP-3 y en la diseminación de células de cáncer en general. J. P. Quigley et al. (1988) Ciba Foundation Symposium 141: 22-47, Brooks et al. (1993) J. Cell Biol. 122 (6): 1351-1359 y Testa, et al. En las Patentes Estadounidenses Nos 6,245,898 y 6,498,014 se describen la generación de anticuerpos monoclonales (mAbs), utilizando “inmunización sustractiva”, que reconoce los antígenos de la superficie celular expresados en células HEP-3 e inhibe la metástasis de tumor en el modelo  
10 de membrana corioalantoidea. No obstante, esos antígenos no se han correlacionado a metástasis in vivo ni han mostrado estar directamente involucrados en el proceso de metástasis in vivo.

Por consiguiente, hay una necesidad de identificar las moléculas biológicas que están involucradas funcionalmente en la diseminación de células de cáncer con el fin de desarrollar terapias que se puedan utilizar para inhibir la migración de las células de tumor a nuevos tejidos. También, son necesarios los  
15 métodos para inhibir metástasis de células de tumor y para diagnosticar cáncer para ayudar en la batalla para el control del cáncer al reducir o eliminar la propagación de células neoplásicas a través del cuerpo de un mamífero afligido con cáncer.

#### Resumen de la Invención

La presente invención se refiere a la identificación y caracterización de una proteína (SIMA135)  
20 (SEQ ID NO:1) que se produce en las células metastásicas. La SEQ ID NO:1 se describe como “NCSG135” en la base de datos EBI número de acceso AF 468010. Estas difieren en dos posiciones (residuos 525 & 827) de “B345” descritas en la WO 02/04508.

La invención se define en las reivindicaciones.

#### Breve Descripción del Dibujo

25 La Figura 1 ilustra la secuencia de aminoácido de SIMA135. La secuencia de señal está en letras minúsculas y el dominio de transmembrana está encerrado en un recuadro. Doce motivos de N-glucosilación consensos se indican con los triángulos sólidos. Los residuos de tirosina citoplasmáticos se encierran en círculos. Se subrayan los dominios CUB que se considera abarcan los residuos 221 a 348 y 417 a 544. Se soberrrayan los tres péptidos identificados de la digestión y secuenciación de tripsina. El residuo  
30 Arg que precede el péptido 2 y el Lys que precede el péptido 3 se encierran en recuadros para resaltar la consistencia con la especificidad de tripsina para los sustratos que contienen Arg/Lys. Se subrayan las secuencias PXXP del dominio citoplasmático. Un motivo de palmitilación de consenso, seguido por el dominio de transmembrana putativo, se indica por círculos sólidos.

#### Descripción Detallada de la Invención

35 La invención se relaciona con el descubrimiento de una proteína glucosilada que se purifica a partir de células HEP3 metastásicas a través de inmunización sustractiva que utiliza un anticuerpo monoclonal designado 41-2. La proteína se designa SIMA135 (inmunización sustractiva de proteína 135 kDa asociada M+ HEP3).

La SIMA135 se refiere a una proteína que puede estar físicamente aislada de las células, en lugar  
40 de ser una proteína putativa predicha de traducción de una secuencia de ácido nucleico. El aislamiento físico de la proteína SIMA135 es significativo por un número de razones. Una razón es que el aislamiento de la proteína indica que el mRNA se traduce actualmente en un polipéptido. En segundo lugar, el aislamiento y la caracterización de la proteína como se reporta aquí indica que la proteína es glucosilada. El aislamiento físico de la proteína glucosilada confirma que los lugares de glucosilación dentro del  
45 polipéptido están disponibles para glucosilación y no se entierran dentro de la proteína plegada para llegar a ser inaccesibles a las glucosiltransferasas. Tal conformación es importante debido a la función conocida que cumple la glucosilación en el plegado de la proteína y la inmunogenicidad. Por lo tanto, el aislamiento de la proteína SIMA135 es un avance significativo cuando se compara con una secuencia de polipéptido predicha de una secuencia de ácido nucleico.

5 Se muestra aquí que el cADN SIMA135 codifica una proteína de superficie celular de transmembrana tipo I de 135 kDa que inmunorreacciona específicamente con mAb 41-2. La inmunopurificación y secuenciación de aminoácido confirma que la proteína madura comienza en Phe30 luego de la remoción de un péptido de señal de aminoácido 29. El análisis inmunocitoquímico confirma la localización de la proteína en la superficie celular y la orientación tipo I de esta proteína. Adicionalmente, 10 consistente con la presencia de los 12 sitios de glucosilación extracelular potenciales, el análisis de transferencia Western de los lisatos celulares desglucosilados indica que hasta 40 kDa de la diferencias entre el peso molecular evidente (~135 kDa) y teórico (~90 kDa) de la SIMA135 madura se debe a los glucanos ligados a N. El análisis de transferencia Western demuestra que la SIMA135 es una proteína de fosfotirosina, consistente con la presencia de 5 residuos de tirosina intracelulares. Adicionalmente, el 15 inhibidor PP2 se ha utilizado para demostrar que el miembro de la familia actúa para fosforilar las tirosinas de SIMA135 en las células HEP3.

La estructura de dominio de la SIMA135 indica que esta puede interactuar con las proteínas extracelulares tales como ligandos solubles, otras proteínas de superficie celular y/o componentes de matriz; potencialmente a través de dominios CUB putativos presentes dentro de su región terminal amino. 20 Se considera que estas estructuras median la unión a una variedad de ligandos de proteína. Por ejemplo, la homodimerización de las serina proteasas MASP que actúa dentro de la ramificación de lecitina de la cascada de complemento se estabiliza a través de las interacciones que involucran los dominios CUB (Chen and Wallis, 2001). También se considera que un número de serina proteasas de transmembrana tipo II que contienen dominios CUB median las interacciones de enzima-sustrato (Hooper et al., 2001). 25 Adicionalmente, los dominios CUB de cubilina median la unión de la cobalamina al factor intrínseco así como también la albúmina (Yammani et al., 2001). Como la SIMA135 se glucosila pesadamente dentro de su dominio extracelular, se considera que la unión del ligando será, por lo menos parcialmente, dependiente de los grupos funcionales carbohidrato como se ha demostrado por varias isoformas de la glucoproteína de superficie celular CD44 (Bajorath, 2000). También se considera que la glucosilación contribuye al plegamiento de proteína SIMA135, y al tráfico hacia y el mantenimiento en la superficie celular (Gorelik et 30 al., 2001; Grogan et al., 2002).

La SIMA135 exhibe diferencias en la secuencia de aminoácido de otras proteínas asociadas con el carcinoma de anillo de sello (entrada GenBank AK026622) y la estirpe celular del carcinoma macrocítico Calu 6 (entrada GenBank AY026461) (Scherl-Mostageer et al., 2001). Se considera que estas diferencias 35 afectan la capacidad de la SIMA135 para interactuar con otras moléculas, cuando se compara con proteínas conocidas previamente. El primer cambio de aminoácido, 525Arg→Gln, ocurre dentro de un dominio de unión de ligando potencial extracelular; el segundo de los dominios CUB potenciales de la SIMA135. El segundo cambio de aminoácido, 709Gly→Asp, se localiza 2 residuos después de un residuo de tirosina. Se puede esperar que este cambio de un aminoácido no polar a un residuo cargado tenga un impacto 40 significativo en la capacidad de la tirosina próxima a la fosforilada, y por lo tanto se considera que tiene un impacto en la capacidad de la SIMA135 para unirse a, por ejemplo, los dominios SH2. El último cambio, 827Ser→Asn, se localiza 4 residuos desde un motivo PXXP. De acuerdo con lo anterior, este cambio también puede hacer impacto en la capacidad de la SIMA135 para interactuar con otras proteínas; en este caso las proteínas que contienen el dominio SH3.

45 En tejido de colon normal, se observa la proteína SIMA135 en las superficies basal y apical de las células epiteliales que recubren el lumen del colon y en la superficie apical de las células epiteliales del folículo. En contraste a esta localización inconfundible en el colon normal, la distribución de la SIMA135 en el tejido de tumor de colon es desordenada y heterogénea, que aparece desregulada con el teñido de la membrana plasmática y citoplasmática. Parece que la expresión de la SIMA135 es más intensa en las

5 glándulas que se invaden más profundo que en las serosas colónicas y dentro del drenaje de vasos  
sanguíneos. Estos resultados indican que la expresión de proteína SIMA135 incrementada se asocia más  
con las últimas etapas de la carcinogénesis, tales como la invasión local y metástasis. Esta proposición se  
soporta parcialmente por el análisis de transferencia Western de pares de estirpes celulares de tumor  
humanas que se originan desde el mismo tejido. Por ejemplo, los niveles del SIMA-135 son más altos en  
10 células HEp3 M+ altamente metastásicas comparados con la variante congénica y metastásica baja, HEp3  
M-. Adicionalmente, las estirpes celulares del cáncer de próstata no oncogénicas PC-3 y el LNCaP  
muestran una tendencia similar; la anterior, una estirpe celular metastásica, muestra niveles mucho mayores  
de SIMA135 comparados con los últimos, un tipo de célula metastásica baja (Soos et al., 1997).

La observación de la SIMA135 aparentemente libre en la mucosa glandular de ambas glándulas  
15 normales y malignas es consistente con la observación de que una forma soluble de 110 kDa de esta  
proteína se libera in vitro por las células HEp3. La pérdida inconfundible de la ultraestructura del tejido  
glandular que es evidente durante la tumorigénesis puede permitir la liberación de la forma soluble de  
SIMA135/CDCP1 en el fluido y el sistema vascular del paciente con cáncer de colon. De acuerdo con lo  
anterior, se considera que la SIMA135 tiene utilidad como un marcador de fluido de tejido o suero como se  
20 ha propuesto para las proteínas de membrana MUC1 (Rye and McGuckin, 2001), CD44 (Adham et al.,  
1990) y ICAM-1 (Maruo et al., 2002).

I. La SIMA135 que se glucosila o no se glucosila.

La invención proporciona la proteína fosfotirosina SIMA135 (SEQ ID No:1) que puede ser  
glucosilada o no glucosilada. Estas proteínas se pueden utilizar como antígenos para inducir la producción  
25 de anticuerpos que se unen a SIMA135, por ejemplo los anticuerpos que se unen específicamente y/o  
selectivamente a SIMA135. Tales proteínas que se unen selectivamente a los anticuerpos incluyen aquellas  
que se unen a SIMA135, o una porción de SIMA135, pero que no se unen a proteínas y fragmentos de  
proteínas que no son SIMA135, o un fragmento de SIMA135. Estas proteínas también se pueden utilizar  
para seleccionar anticuerpos que se unen específicamente y selectivamente a SIMA135. Tales anticuerpos  
30 que se unen específicamente y selectivamente a los incluyen aquellas que se unen a SIMA135, o una  
porción de SIMA135, pero que no se unen a las proteínas y fragmentos de las proteínas que no son  
SIMA135, o un fragmento de SIMA135. En particular, la selectividad de tales anticuerpos significa que  
ellos se unen a SIMA135 o una porción de SIMA135 pero tampoco se unen a la proteína de 180kD  
producida a partir del lisato de célula Hep-3 metastásico como se describe en la Patente Estadounidense No.  
35 6,498,014 con una constante de disociación del mismo orden de magnitud como aquella que resulta de la  
unión a SIMA135 o un fragmento de la misma, aunque la unión de tales anticuerpos con la proteína de  
180kD puede ocurrir en una constante de disociación en por lo menos dos órdenes de magnitud mayores  
que aquel de la unión con SIMA135 o un fragmento del mismo. La especificidad de tales anticuerpos  
significa que la unión inmunogénica es el resultado de la interacción de región epitópica-hipervariable y no  
40 el resultado de la interacción proteína-proteína no específica. La interacción de proteína- proteína no  
específica típicamente tendrá una constante de disociación de por lo menos 3 órdenes de magnitud mayores  
que la constante de disociación para la unión específica de una interacción de región hipervariable  
epitópica. La constante de disociación para un par de inmunounión de anticuerpo-antígeno se puede medir  
de acuerdo con las técnicas descritas en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring  
45 Harbor Pub. 1988)).

Un fragmento de una proteína SIMA135 como se utiliza aquí, se refiere a un fragmento de péptido  
de una longitud suficiente para ser antigénico. En términos generales, el fragmento incluye por lo menos 5  
aminoácidos.

5 Las proteínas de la invención pueden ser glucosiladas o no glucosiladas. Las proteínas se pueden glucosilar in vivo al expresar las proteínas en una célula que es capaz de glucosilar la proteína recombinante. Alternativamente, las proteínas de la invención se pueden glucosilar in vitro a través del uso de las transferasas del azúcar. Las proteínas se pueden tratar para dividir cualesquier glucanos ligados a través del uso de enzimas disponibles comercialmente, por ejemplo PNGasa F (New England Biolabs, Beverly, MA). De acuerdo con lo anterior, las proteínas de la invención se pueden utilizar para producir anticuerpos que se unen a SIMA135 natural, SIMA135 desnaturalizada, porciones específicas de SIMA135, SIMA135 glucosilada, y a SIMA135 no glucosilada.

II. Un anticuerpo que se une selectivamente a SIMA135, o al fragmento de la reivindicación 2.

15 Los anticuerpos preferidos para ser utilizados en las composiciones farmacéuticas incluyen aquellos anticuerpos que inhiben la metástasis de tumor. La inhibición de la metástasis de tumor se puede determinar mediante un número de ensayos, tales como el ensayo de migración, el ensayo de invasión o el ensayo de membrana corioalantoidea de pollo.

Se pueden preparar los anticuerpos de tal manera que reconozcan la SIMA135 plegada naturalmente, o SIMA135 desnaturalizada al inmunizar un animal con SIMA135 natural o SIMA135 desnaturalizada respectivamente. Adicionalmente, se pueden preparar anticuerpos que reconocen la SIMA135 que es glucosilada, o SIMA135 que no es glucosilada al inmunizar un animal con SIMA135 que se glucosila o no se glucosila respectivamente. Los anticuerpos que reconocen las varias formas de SIMA135 (por ejemplo, natural vs. desnaturalizada, y glucosilada vs. no glucosilada) son útiles para determinar si una célula es capaz de plegarse adecuadamente y glucosilar SIMA135. Tales anticuerpos son útiles para determinar si un agente candidato es capaz de interferir con las acciones celulares que procesan la SIMA135 durante la metástasis. De acuerdo con lo anterior, se pueden utilizar tales anticuerpos para identificar la acción de los agentes que se pueden utilizar para inhibir la metástasis mediante células de cáncer.

El anticuerpo monoclonal 41-2 es un anticuerpo que se emplea inicialmente para aislar la SIMA135. Este reconoce la SIMA135 y adicionalmente varias otras proteínas de metástasis que incluyen la proteína 180 kD descrita en las Patentes Estadounidenses Nos. 6,245,898 y 6,498,014. Por esta razón, un anticuerpo preferido de acuerdo con la invención es un anticuerpo monoclonal que se une, por ejemplo selectivamente y/o específicamente, con la SIMA135, por ejemplo dicho anticuerpo no se une con otras proteínas de metástasis, por ejemplo dicho anticuerpo reconoce un epítipo de SIMA135.

35 Si se desea, se pueden purificar los anticuerpos monoclonales, por ejemplo, mediante unión a y elución de una matriz a la que se une el polipéptido o un péptido del que surgen los anticuerpos. Aquellos expertos en la técnica conocerán varias técnicas comunes en las técnicas de la inmunología para la purificación y/o concentración de anticuerpos monoclonales (Coligan, et al., Unit 9, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991).

40 La presente invención se refiere a un anticuerpo para uso como un tratamiento terapéutico del cuerpo humano y animal como se define en la reivindicación 5.

La preparación de anticuerpos monoclonales en forma similar es convencional (Kohler & Milstein, Nature, 256:495 (1975); Coligan et al., secciones 2.5.1-2.6.7; y Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, página 726 (Cold Spring Harbor Pub. 1988)). En resumen, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener al inyectar ratones con una composición que comprende un antígeno, que verifica la presencia de la producción de anticuerpo al remover una muestra de suero, remover el bazo para obtener los linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir los hibridomas, clonar los hibridomas, seleccionar los clones positivos que producen anticuerpos al antígeno, y aislar los anticuerpos de los cultivos de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar a partir de cultivos de

5 hibridoma mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Tales técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína-A Sefarosa, cromatografía de exclusión de tamaño, y cromatografía de intercambio de ión (Coligan et al., secciones 2.7.1-2.7.12 y secciones 2.9.1-2.9.3; Barnes et al., Purification of Immunoglobulin G (IgG), in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, pages 79-104 (Humana Press 1992)). Los métodos de multiplicación de anticuerpos monoclonales in vitro e in vivo son  
10 bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. La multiplicación in vitro se puede llevar a cabo en el medio de cultivo adecuado tal como Medio Eagle Modificado de Dulbecco o medio RPMI 1640, opcionalmente repuesto por un suero de mamífero tal como suero fetal bovino o elementos de traza y los suplementos que sostienen el crecimiento tales como células de exudado de peritoneo de ratón normal, células de bazo, macrófagos de médula ósea. La producción in vitro proporciona preparaciones de  
15 anticuerpo relativamente puras y permite a gran escala producir grandes cantidades de los anticuerpos deseados. Se puede llevar a cabo cultivo de hibridoma a gran escala mediante cultivo de suspensión homogénea en un reactor de aire, en un reactor de agitador continuo, o cultivo de célula inmovilizada o entrapada. La multiplicación in vivo se puede llevar a cabo al inyectar los clones de célula en mamíferos  
20 histocompatibles con las células progenitoras, por ejemplo, ratones osingeneicos, para generar el crecimiento de tumores que producen anticuerpos. Opcionalmente, los animales se ceban con un hidrocarburo, especialmente aceites tales como tetrametilpentadecano de prístina antes de la inyección. Después de una a tres semanas, el anticuerpo monoclonal deseado se recupera del fluido corporal del animal.

Un anticuerpo de la invención se puede derivar de un anticuerpo monoclonal “humanizado”. Los  
25 anticuerpos monoclonales humanizados se producen al transferir regiones de determinación de complementariedad de ratón de las cadenas de variable pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón en un dominio variable humano, y luego sustituir residuos humanos en las regiones de estructura de las contrapartes de murino. El uso de los componentes de anticuerpo derivados de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los problemas potenciales asociados con la inmunogenicidad de las regiones constantes  
30 de murino. Se describen las técnicas generales para clonar los dominios de variable de inmunoglobulina de murino (Orlandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3833 (1989)). Se describen las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales humanizados (Jones et al., *Nature*, 321:522 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534 (1988); Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.*, 12:437 (1992); y Singer et al., *J. Immunol.*, 150:2844 (1993)).

35 Adicionalmente, se pueden derivar los anticuerpos de la presente invención a partir de un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos se obtienen de ratones transgénicos que se han “hecho mediante ingeniería” para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a la inoculación antigénica. En esta técnica, los elementos de los locus de cadena ligera y pesada se introducen en las cepas de ratones derivadas de estirpes de citoblastos embrionarios que contienen interrupciones objetivadas de los  
40 locus de cadena pesada y ligera endógenos. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y los ratones se pueden utilizar para producir hibridomas que secretan el anticuerpo humano. Se describen los métodos para obtener los anticuerpos humanos de los ratones transgénicos (Green et al., *Nature Genet.*, 7:13 (1994); Lonberg et al., *Nature*, 368:856 (1994); y Taylor et al., *Int. Immunol.*, 6:579 (1994)).

45 Se pueden preparar los fragmentos de anticuerpo de la invención mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante la expresión en *E. coli* de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener mediante digestión de pepsina o papaína de los anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir los fragmentos de anticuerpo mediante división enzimática de los anticuerpos con la pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado

5 F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento se puede dividir adicionalmente utilizando un agente de reducción de tiol, y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos de sulfhidrilo que resultan de la división de enlaces de disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3.5S. Alternativamente, una división enzimática que utiliza pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Se describen estos métodos (Goldenberg, Patentes Estadounidenses No. 4,036,945 y 4,331,647; y las referencias  
10 contenidas allí; Porter, *Biochem. J.*, 73:119 (1959); Edelman et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 1, página 422 (Academic Press 1967); y Coligan et al. en las secciones 2.8.1-2.8.10 y 2.10.1-2.10.4).

También se pueden utilizar otros métodos para dividir los anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, la división adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas, o genéticas, siempre y cuando los fragmentos se unan al  
15 antígeno que se reconoce por el anticuerpo intacto.

Por ejemplo, los fragmentos F<sub>v</sub> incluyen, una asociación de cadenas V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>. Esta asociación puede ser no covalente (Inbar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2659 (1972)). Alternativamente, las cadenas variables se pueden ligar mediante un enlace de disulfuro intermolecular o se reticula mediante químicos tales como glutaraldehído (Sandhu, supra). Preferiblemente, los fragmentos F<sub>v</sub> comprenden las  
20 cadenas de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> conectadas mediante un ligador de péptido. Estas proteínas de unión a antígeno de cadena única (sFv) se preparan al construir un gen estructural que comprende las secuencias de ADN que codifican los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que se introduce posteriormente en una célula anfitriona tal como E. coli. Las células anfitrionas recombinantes sintetizan una única cadena de polipéptido con un péptido ligador que conecta los  
25 dos dominios V. Los métodos para producir sFvs se describen (Whitlow et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, page 97 (1991); Bird et al., *Science*, 242:423 (1988), Ladner et al., Patente Estadounidense No. 4,946,778; Pack et al., *Bio/Technology*, 11:127 (1993); and Sandhu, supra).

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una región de determinación de complementariedad única (CDR). Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") se pueden  
30 obtener al construir genes que codifican el CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, al utilizar la reacción de cadena de polimerasa para sintetizar la región variable de ARN de las células que producen el anticuerpo (Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, page 106 (1991)).

III. Un método para tratar un tumor metastásico y para inhibir la metástasis mediante una célula de  
35 tumor.

Se puede utilizar la invención para tratar tumores metastásicos. "Tratar un tumor metastásico" significa que se impide, retrasa o inhibe la metástasis del tumor. Los tumores metastásicos incluyen ambos tumores en el sitio principal capaz de hacer metástasis y los tumores metastásicos en el sitio secundario. Tales tumores metastásicos pueden ser de un tejido de origen de tejido de pulmón, hígado, riñón, glándula  
40 mamaria, epitelial, de tiroides, leucémico, pancreático, del endometrio, de ovario, cervical, de piel, colon y linfoide. Un sujeto que se puede tratar puede ser cualquier sujeto mamífero, que incluyen humanos, perros, monos, vacas y similares, con la excepción de ratones.

Una realización son los métodos para tratar un tumor metastásico en un sujeto al administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que inhibe la metástasis de tumor de la  
45 presente invención. Los anticuerpos que inhiben la metástasis de tumor de la presente invención se han descrito anteriormente.

Un anticuerpo que inhibe la metástasis de tumor se puede administrar solo o junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye todos los disolventes, tales como grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, rellenos, medio de

5 dispersión, medio de cultivo celular, y similares, o combinaciones de los mismos, que no son tóxicos al sujeto receptor.

De acuerdo con la presente invención, los ingredientes activos se pueden combinar con el portador en cualquier manera práctica y conveniente, por ejemplo, mediante solución, suspensión, emulsificación, mezcla, encapsulación, absorción y similares, y si es necesario, al formar las composiciones combinadas en  
10 gránulos o comprimidos. Tales procedimientos son de rutina para aquellos expertos en la técnica.

Las dosificaciones de un anticuerpo para ser terapéuticamente efectivas dependen del estado de la enfermedad y otros factores clínicos, tales como peso y condición del sujeto, la respuesta del sujeto a la terapia, el tipo de formulaciones y la ruta de administración. La dosificación precisa de un compuesto para ser terapéuticamente efectiva puede ser determinada por aquellos expertos en la técnica. Como una regla  
15 general, la dosificación terapéuticamente efectiva de un anticuerpo puede estar en el rango de aproximadamente 0.5 µg a aproximadamente 2 gramos por forma de dosificación unitaria. Una forma de dosificación unitaria se refiere a unidades discretas físicamente adecuadas como dosificaciones unitarias para el tratamiento de mamíferos: cada unidad contiene una cantidad predeterminada del material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con cualquier portador farmacéutico  
20 requerido. Los métodos de la presente invención contemplan administraciones individuales así como también múltiples, dadas ya sea simultáneamente o durante un periodo de tiempo extendido.

La administración de un anticuerpo que inhibe la metástasis de tumor se puede llevar a cabo en una manera conveniente, que incluye inhalación con aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. Preferiblemente, los anticuerpos de la presente invención se administran a un paciente mediante  
25 inyección subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.), intra-arterial (i.a.), o intravenosa (i.v.).

IV. Un método para diagnosticar cáncer en un mamífero.

La invención también incluye métodos para diagnosticar tumores metastásicos al detectar la expresión de la SIMA135, como se define en la reivindicación 8.

Los tumores metastásicos incluyen los tumores en el sitio principal capaces de hacer metástasis y  
30 tumores metastásicos en un sitio secundario. Tales tumores metastásicos pueden ser de un tejido que se origina en los tejidos del pulmón, hígado, riñón, glándula mamaria, epitelial, tiroides, leucémico, pancreático, del endometrio, ovario, cervical, piel, colon y linfoide.

La expresión de la SIMA135 se puede detectar al utilizar un anticuerpo que une a SIMA135, o un fragmento de SIMA135. Se pueden emplear ambos anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales.

En una realización, se toma una muestra del sujeto, por ejemplo, se toma un espécimen de biopsia  
35 de un tejido que se sospecha tiene un tumor metastásico. Generalmente, la muestra se trata antes de que se desarrolle un ensayo. Los ensayos que se pueden emplear incluyen ELISA, RIA, EIA, análisis de transferencia Western, teñido inmunohistológico y similares. Dependiendo del ensayo utilizado, los antígenos o los anticuerpos se pueden etiquetar mediante una enzima, un fluoróforo o un radioisotopo. Ver, por ejemplo, Coligan et al. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons Inc., New York, N.Y. (1994); y Frye et al., Oncogen 4: 1153-1157, 1987.  
40

El tratamiento de la muestra puede variar dependiendo del ensayo que se utiliza para detectar la SIMA135. Por ejemplo, las células de la biopsia de tejido se pueden lisar y se utilizan los lisatos celulares en por ejemplo, análisis de transferencia Western. Para los ensayos tales como el ensayo ELISA de Célula  
45 Completa, las células se pueden lavar con, por ejemplo, PBS, y luego se fijan con 0.25% de glutaraldehído en PBS antes del ensayo.

Se puede utilizar inmunohistoquímica para diagnosticar un tumor metastásico en un organismo. En esta realización, se toma una muestra de un organismo, por ejemplo, se toma un espécimen de biopsia del tejido que se sospecha tiene un tumor metastásico. La muestra se puede fijar en un portaobjetos y poner en

5 contacto con los anticuerpos, como se describe aquí, que se unen a la SIMA135. Los anticuerpos se pueden marcar por una enzima, un fluoróforo o un radioisotopo. Ver, por ejemplo, Coligan et al. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons Inc., New. Luego de la unión de los anticuerpos a la SIMA135, la posición de los anticuerpos se determina a través del uso de técnicas conocidas. El teñido heterólogo, expresión extensa de la SIMA135 a través de la muestra de tejido, y el teñido dentro de las glándulas  
10 malignas en la serosa colónica indican cáncer metastásico.

V. Un equipo que contiene un anticuerpo que se une selectivamente al fragmento de la reivindicación 2, y material de empaque.

La invención proporciona un equipo que contiene un anticuerpo que se une al fragmento de SIMA135 de la reivindicación 2 y material de empaque. Tales equipos son útiles para el transporte y  
15 almacenamiento de los anticuerpos que se pueden utilizar para tratar y detectar cáncer. Específicamente, tales equipos se pueden utilizar por el personal médico en un laboratorio para detectar cáncer metastásico en una muestra de tejido obtenida de un organismo. Adicionalmente, tales equipos pueden ser útiles para el personal médico para la formulación de composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo de la invención.

20 El material de empaque proporcionará un ambiente protegido para el anticuerpo. Por ejemplo, el material de empaque puede evitar que se contamine el anticuerpo. Adicionalmente, el material de empaque puede evitar que se seque un anticuerpo en solución.

Ejemplos de materiales adecuados que se pueden utilizar para materiales de empaque incluyen vidrio, plástico, metal, y similares. Tales materiales se pueden silanizar para evitar la adhesión de un  
25 anticuerpo al material de empaque.

VI. Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo que se une selectivamente al fragmento de SIMA135 de la reivindicación 2 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Una composición farmacéutica de la invención incluye un anticuerpo que se formula como una composición farmacéutica y se administra a un anfitrión animal, tal como un paciente humano en una  
30 variedad de formas adaptadas a la ruta de administración escogida, es decir, oralmente o parenteralmente, mediante rutas intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

Así, un anticuerpo se puede administrar sistémicamente, por ejemplo, oralmente, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. Ello se pueden encerrar en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, se pueden comprimir  
35 en tabletas, o se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica, se puede combinar el anticuerpo con uno o más excipientes y utilizar en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elíxires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener por lo menos 0.1% del anticuerpo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones por supuesto, se pueden variar y puede estar de forma  
40 conveniente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 60% de peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad del uno o más anticuerpos en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación efectiva. Cuando se administra oralmente, las composiciones de la invención se pueden administrar preferiblemente en una cápsula de gelatina.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas, y similares también pueden contener lo siguiente:  
45 aglutinantes tales como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de calcio; se puede agregar un agente de desintegración, tal como el almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio, y un agente edulcorante tal como la sacarosa, fructosa, lactosa o el aspartame, o un agente saborizante como la menta, aceite de gaulteria, o sabor de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, esta puede contener,

5 adicionalmente a los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, como un aceite vegetal o una molécula de polietilenglicol. Varios otros materiales pueden estar presentes como revestimientos o modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, se pueden recubrir los comprimidos, píldoras, o cápsulas con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el anticuerpo o anticuerpos, sacarosa o fructosa como un agente edulcorante, metilo y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizantes, tal como el sabor a cerezo o a naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptables y sustancialmente no tóxicos en las cantidades empleadas. Además, el anticuerpo o anticuerpos se pueden incorporar y dispositivos de las preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

15 El anticuerpo o los anticuerpos también se pueden administrar intravenosamente o intraperitonealmente mediante infusión o inyección. Las soluciones del anticuerpo o anticuerpos se pueden preparar en agua, opcionalmente mezcladas con un tensoactivo no tóxico. También se pueden preparar las dispersiones en glicerol, polietilenglicoles, triacetina, y mezclas de los mismos y en aceites. Baja condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

20 Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el anticuerpo o anticuerpos que se adaptan para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infusibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación final debe ser estéril, de fluido y estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, a poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles, y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos, y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones o mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, amortiguadores o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso en las composiciones de los agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Los soluciones inyectables estériles se preparan al incorporar un anticuerpo o anticuerpos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, como se requiere, seguido por esterilización de filtro.

#### Ejemplo I

40 Estirpes Celulares e Hibridomas

Se obtienen células de adenocarcinoma cervical humano HeLa, fibrosarcoma HT1080, adenocarcinoma de colon DLD-1 y SW480, adenocarcinoma de mama MCF7, adenocarcinoma de próstata PC-3, metástasis de ganglio linfático de carcinoma de próstata LNCaP, carcinoma de pulmón A549 y tumor rabdoide de riñón G401 de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). Se proporcionan células de cáncer de hígado humano HuH7 y HLE, y cáncer gástrico MKN45 y STKM-1 por el Dr. Peter Vogt (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) y células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 por la Dr. Liliana Ossowski (Mount Sinai School of Medicine, NY). Las células de carcinoma epidermoide humano HEp3, se obtienen de tumores sólidos pasados en serie en la membrana corioalantoidea (CAM) de embriones de pollo (Testa, 1992; Brooks et al., 1993). La variante metastásica de las células HEp3, M+

5 HEp3, se cultiva durante menos de 20 días antes de uso. La variante metastásica baja, M- HEp3, se mantiene en el cultivo durante por lo menos 80 días antes de uso. Las células endoteliales microvasculares humanas (HEC) y fibroblastos dérmicos (HDF) se obtienen de Clonetics (San Diego, CA) y se mantienen en medios EGM-2 MV y FGM-2 (Clonetics) respectivamente. Las estirpes celulares de cáncer se mantienen como cultivos de monocapa en DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementados con 10% de FBS  
 10 (HyClone, Logan, UT), piruvato de sodio, penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales (Invitrogen) y crecimiento en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> humidificada a 37° C. Los hibridomas que producen MoAb 41-2 se generan mediante un método de inmunización sustractiva descrito previamente (Brooks et al., 1993). El cultivo de hibridoma y la purificación de mAbs se desarrolla por the Protein and Nucleic Acids Core Facility of The Scripps Research Institute utilizando procedimientos estándar.

15           Ejemplo II  
               Reactivos

Los inhibidores de proteasa, IgG de ratón normal, anti-FLAG M2 mAb, reactivo DAB y hematoxilina Gill se compran de Sigma (St. Louis, MO). Los reactivos de transcripción inversa y PCR y el vector Tipo II pCR son de Invitrogen. El PP2 se obtiene de Calbiochem (La Jolla, CA).

20           Ejemplo III

Purificación de Proteína, Secuenciación de Péptido y Análisis de Proteína

Se realizan inmunoprecipitaciones en lisatos de células HEp3 etiquetadas <sup>35</sup>S o no etiquetadas (5x10<sup>7</sup>). El etiquetado metabólico se realiza durante la noche en metionina/cisteína libre de DMEM que contiene la etiqueta Tran <sup>35</sup>S (100 PCi/ml; ICN, Costa Mesa, CA). Las células se lavan cuidadosamente con  
 25 PBS luego se lisan en un amortiguador que contiene Tris 0.1 M (pH 8.0), 0.1% de Triton X-100, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 10 μM de trans-epoxisuccinil-L-leucilamido (4-guanidino) butano, 20 μg/ml de inhibidor de tripsina de soya y 25 μg/ml de aprotinina. Los lisatos se preaclaran contra la proteína G-Sefarosa (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a 4° C durante 30 minutos luego se incuban durante la noche a 4° C con 20 μg de mAb 41-2 o, como control, nmIgG. El inmunocomplejo se precipita utilizando  
 30 proteína G-Sefarosa y los complejos se desnaturalizan mediante ebullición en amortiguador que carga SDS reducido antes del análisis mediante electroforesis de gel de poliacrilamida. Para las proteínas etiquetadas <sup>35</sup>S, el gel se seca y se expone a película a -80° C. Las proteínas en otra forma se transfieren a membranas de difluoruro de polivinilidina (PVDF) (Millipore, Bedford, MA). La banda de tinte comassie predominante, a 135 kDa, se corta luego de ser digerida con la tripsina. Los péptidos resultantes se separan mediante  
 35 cromatografía líquida de alta presión y se secuencian en un secuenciador de proteína Procise 494 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). La digestión de tripsina y la secuenciación de péptido se desarrollan mediante laq The Protein and Nucleic Acids Core Facility of The Scripps Research Institute. Las secuencias de péptido se utilizan para buscar la base de datos GenBank utilizando los algoritmos disponibles en la página web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). La secuencia de proteína  
 40 SIMA135 completa se analiza para dominios estructurales, señales de procesamiento de células y motivos de modificación post-traduccionales de consenso utilizando la base de datos Prosite (Falquet et al., 2002), el algoritmo SMART (Schultz et al., 1998), el algoritmo PSORT (Nakai y Kanehisa, 1992) y el algoritmo NetPhos 2.0 (Blom et al., 1999).

Ejemplo IV

45           Construcciones de Expresión y Transfecciones Transitorias

El cADN de SIMA135 en el vector de expresión eucariótico pME18S-FL3 (número de acceso GenBank AK026622) se genera como parte del proyecto de secuenciación de cADN humano NEDO Japonés y proporcionado amablemente por el Dr. Hiroko Hata (Dept. of Virology, Institute of Medical Science, University of Tokyo). La SIMA135FLAG en la construcción se genera mediante PCR que coloca

5 secuencias que codifican el epítipo FLAG (DYKDDDDK) inmediatamente antes del codón de detención de la construcción progenitora. Se secuencian ambas construcciones. Las células HeLa ( $4 \times 10^5$ ) se transfectan transitoriamente con SIMA135 o SIMA135FLAG en las construcciones de expresión utilizando el reactivo Superfect (Qiagen, Valencia, CA) como se describe por el fabricante. Las células se lisan en amortiguador enfriado con hielo que contiene 10 mM de Tris (pH 8.0), 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 5 mM de  
10 EDTA y 1x mezcla de inhibidor de proteasa libre de EDTA mini completo (Roche, Indianapolis, IN). El material insoluble se remueve mediante centrifugación a 14000 rpm durante 10 min.

#### Ejemplo V

##### Clonación del cADN de SIMA135 de las células HEp3

ARN total se aísla utilizando un equipo RNeasy (Qiagen) y 2  $\mu$ g sirven como plantilla en una  
15 reacción de transcripción inversa utilizando transcriptasa inversa Superscript II. El PCR se desarrolla en 1  $\mu$ l del cADN resultante utilizando los cebadores TCCCCACCGTCGTTTTCC (SEQ ID NO:2) y GGTTAGGAACACGGACGGGTG (SEQ ID NO:3) (designados con base en el acceso GenBank AK026622) y la polimerasa ADN Pfx de platino de enzima de lectura de prueba. Las condiciones de ciclización de PCR son 94° C durante 3 min, 30 ciclos de 94° C durante 30 seg, 55° C durante 30 seg y 72°  
20 C durante 150 seg seguido por una extensión final de 72° C durante 10 min. Los productos de PCR son adenosina purificada con gel (Qiagen) utilizando polimerasa de ADN de platino Taq luego se clonan en el vector Topo II pCR y se secuencian.

#### Ejemplo VI

##### Inmunofluorescencia

Las células HeLa se transfectan transitoriamente con la SIMA135FLAG la construcción de expresión y las células HEp3 se colocan en portaobjetos. Después de incubación durante 48 hr a 37° C las células se lavan con PBS luego se fijan en 2% de formaldehído. Las células HeLa a ser incubadas con anti-FLAG mAb no se permeabilizan o se permeabilizan al incubar en 0.5% de Triton X-100 en PBS durante 5  
30 min a temperatura ambiente. Ambos tipos de células se bloquean en 5% de BSA en PBS. Luego de incubación durante la noche a 4 ° C con mAb 41-2 (5  $\mu$ g/ml) o anti-FLAG M2 mAb (4  $\mu$ g/ml) en amortiguador de bloqueo, las células se lavan con PBS luego se incuban con IgG de anti-ratón de cabra conjugado Alexa Fluor 546 (2  $\mu$ g/ml) (Molecular Probes). Las células etiquetadas se visualizan y se fotografían utilizando un sistema de formación de imágenes confocales de barrido BioRad 1024 MRC2.

#### Ejemplo VII

35 Análisis de Transferencia Northern

Una transferencia Northern de tejido múltiple de línea 12 (Clontech) se hibrida con fragmentos de inserto de ADN EcoRI/HincII etiquetados [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (Ambion) del cADN de SIMA135 durante la noche en solución UltraHyb (Ambion) a 68° C. El blot se lava a una severidad final de 0.1 X SSC, 0.1% de SDS a 68° C luego se expone a película a -80° C. Los blot se resondean con cADN de  $\beta$ -actina para determinar la  
40 consistencia del ARN que se carga en cada línea.

#### Ejemplo VIII

##### Análisis de Transferencia Western

Los lisatos celulares, medios acondicionados libres de suero y proteínas inmunoprecipitadas se separan mediante electroforesis a través de 8% de geles de poliacrilamida-SDS luego se transfieren a  
45 membranas de nitrocelulosa (Millipore). Las membranas se bloquean en 5% de leche en polvo desnatada sin grasa en PBS luego se incuban durante la noche a 4° C con mAb 41-2 (2  $\mu$ g/ml), anti-FLAG M2 mAb (0.8P g/ml) o anti-fosfotirosina mAb (1  $\mu$ g/ml; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Luego las membranas lavadas extensamente se incuban durante 2 hr a temperatura ambiente con IgG de anti-ratón de

5 cabra (0.16 µg/ml, Pierce, Rockford, II) y las bandas inmunorreactivas se detentan por quimioluminiscencia mejorada (Pierce).

#### Ejemplo IX

##### Procedimientos de Caracterización Bioquímica

Para la remoción de glucanos ligados a N, los lisatos (50 µl) de células HEP3 M+ y células HeLa  
10 transfectadas transitoriamente con la SIMA135FLAG en la construcción de expresión se desnaturalizan y se reducen en 0.5% de SDS, 1% de β-mercaptoetanol durante 10 minutos a 100° C luego se incuban con PNGasa F (New England Biolabs, Beverly, MA) a 37° C durante 45 minutos. Para análisis del nivel basal de la fosforilación de tirosina de SIMA135, los cultivos subconfluentes de células HEP3 y HeLa (como control negativo) se incuban a 37° C durante 30 min con DMEM libre de suero que contiene 50 mM de NaF  
15 y 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> luego se lavan con PBS enfriado con hielo. Para la inhibición de la fosforilación de la familia Src cinasa, las células HEP3 se cultivan en DMEM libre de suero sin NaF y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> durante 30 minutos a 37° C con PP2 (50 µM). Las células luego se lisan en amortiguador enfriado con hielo que contiene 50 mM de Tris (pH 7.4), 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 1 mM de cloruro de fenilmetilsulfonilo, 1 mM de benzamidina, 25 µg/ml de aprotinina, 25 µg/ml de leupeptina, 50 mM de NaF  
20 y 1 mM de Na<sub>3</sub> VO<sub>4</sub>. El material insoluble se remueve mediante centrifugación a 14000 rpm durante 10 min. La inmunoprecipitación se realiza como se describió anteriormente en 300 µg de lisatos celulares utilizando 1 µg de mAb 41-2 o nmIgG (como control negativo). Para los ensayos para la presencia de SIMA135 soluble, células HEP3 que alcanzan confluencia, se lavan tres veces con PBS luego se incuban en medios acondicionados libres de suero durante 24 hr. Los medios se recolectan y se centrifugan a 4° C y  
25 10,000 g luego se concentran 10 veces utilizando filtros centrífugos de micras con un peso molecular de corte de 30,000 kDa (Millipore). Los lisatos celulares se recolectan como se describió anteriormente.

#### Ejemplo X

##### Inmunohistoquímica

Las secciones histológicas (6 µm) de muestra de tejido de adenocarcinoma de colon humano de  
30 archivo de tres pacientes se fijan en zinc-formalina durante 15 min, se enjuagan brevemente con PBS se unen a sitios no específicos bloqueados por la incubación en PBS que contiene 3% de BSA. El mAb 41-2 (5 µg/ml) se aplica a 4° C durante la noche. Se detecta la unión a anticuerpo específica mediante la adición de anticuerpos de anti-ratón conjugados con biotina (Pierce) seguido por peroxidasa conjugada a neutravidina (Pierce) se que visualiza utilizando el reactivo DAB. Las secciones se contratiñen utilizando hematoxilina  
35 Gill.

#### Ejemplo XI

El mAb41-2 reconoce al antígeno 135 kDa Expresado en Niveles elevados de Células de Tumor Humanas Altamente Metastásicas HEP3

Se identifica y se caracteriza el antígeno reconocido por el anticuerpo mAb 41-2. Como una etapa  
40 inicial en la determinación del significado del antígeno reconocido por mAb 41-2, el análisis de transferencia Western se realiza utilizando mAb 41-2 en lisatos (20 µg) preparados a partir de células HEP3 metastásicas altas (M+) y metastásicas bajas (M-) a las que se les hace electroforesis bajo condiciones no reactivas. El anticuerpo monoclonal 41-2 (mAb), generado por la inmunización sustractiva, detecta una banda única de aproximadamente 135 kDa en ambos tipos celulares. Consistente con el método den  
45 inmunización sustractiva tomado en la generación de mAb 41-2, la proteína inmunorreactiva se expresa en niveles más altos en M+ que en las células HEP3 M-. Los geles teñidos con Coomassie paralelos de los lisatos preparados a partir de células HEP3 metastásicas altas (M+) y metastásicas bajas (M-) demuestran que el patrón de proteína general y el contenido es indistinguible para los extractos de célula HEP3 M+ y

- 5 M-. La diferencia en la inmunorreactividad de mAb 41-2 muestra una diferencia significativa en el nivel de la expresión de antígeno cognato entre las dos estirpes celulares.

#### Ejemplo XII

##### Identificación del Antígeno Reconocido por mAb 41-2 de las células HEp3 metastásicas

- El mAb 41-2 purificado se utiliza para inmunoprecipitar el antígeno del Ejemplo XI a partir de  
 10 células HEp3 M+. Las proteínas etiquetadas <sup>35</sup>S inmunoprecipitadas de las células HEp3 M+ con mAb 41-2 o IgG de ratón normal se analizan en SDS-PAGE bajo condiciones de reducción. El gel se seca y se expone a película a -80° C durante la noche. La proteína principal inmunoprecipitada de células HEp3 radioetiquetadas tiene un peso molecular de aproximadamente 135 kDa. Esto es consistente con el peso molecular del antígeno detectado en el Ejemplo XI. En un experimento paralelo utilizando células HEp3 no  
 15 etiquetadas, en las que las proteínas inmunoprecipitadas se transfieren a una membrana de PVDF, se corta la banda de proteína 135 kDa, se somete a digestión con tripsina y los fragmentos se secuencian a partir del terminal N. Se obtienen tres de las secuencias de péptido principales. Las búsquedas de las bases de datos de las proteínas no redundantes GenBank indican que cada una de las secuencias de péptido tiene emparejamientos exactos o casi exactos con la secuencia teórica de una entrada no publicada con número de  
 20 acceso BAB15511, traducida de la entrada de cADN no publicada AK026622.

Péptido 1	FEIALPRESQITVLG(I)KXGT	SEQ ID No: 4 SEQ
BAB15511	FEIALPRESNITVLIKXGT	ID No:5
Péptido 2	XXXXIPGSTTNPE	SEQ ID No:6
BAB15511	VEYYIPGSTTNPE	SEQ ID No:7
Péptido 3		SEQ ID No:8
BAB15511	XYXLQVPSDILH SYSLQVPSDILH	SEQ ID No:9

- La secuencia completa de la proteína identificada, que se designa M+ HEp3 inmunización sustractiva asociada con proteína 135 kDa (SIMA135), se muestra en la Figura 1. Para confirmar que la  
 25 SIMA135 es la misma proteína específicamente reconocida por mAb 41-2, se realiza la transferencia Western en lisatos de las células HEp3, células HeLa no transfectadas y células HeLa transfectadas transitoriamente con el cADN de SIMA135. El análisis de transferencia Western probado con mAb 41-2 de los lisatos celulares totales (25 µg) electroforizado bajo condiciones no reductoras de las células HEp3, simulacros de células HeLa transfectadas y HeLa transfectadas transitoriamente con el cADN de SIMA135.  
 30 El mAb 41-2 se hace reaccionar con la misma banda de proteína 135 kDa que está presente en las células HEp3 y en las células HeLa transfectadas transitoriamente con el cADN de SIMA135, pero está ausente en las células HeLa no transfectadas. Para proporcionar la confirmación adicional, se clona la proteína que codifica la región del mRNA de SIMA135 de las células HEp3 mediante PCR de transcripción de fase inversa. El análisis de secuencia de ADN de dos clones generados por este método confirman que el mRNA  
 35 de SIMA135 se expresa mediante estas células. Se identifican cuatro diferencias de nucleótidos entre la entrada GenBank AK026622 y la secuencia SIMA135 obtenida de las células HEp3: nucleótido 1684<sub>G→A</sub>, 1847<sub>T→C</sub>, 2236<sub>G→A</sub> y 2590<sub>G→A</sub>. la segunda transición es silenciosa y las otras resultan en cambios de aminoácidos 525<sub>Arg→Gln</sub>, 709<sub>Gly→Asp</sub> y 827<sub>Ser→Asn</sub> respectivamente.

#### Ejemplo XIII

- 40 Características Estructurales de la SIMA135

5 La secuencia de proteína SIMA135 incluye 836 aminoácidos (SEQ ID No. 1 - Figura 1) y tiene un peso molecular deducido de 92.9 kDa. El análisis de secuencia identifica las siguientes características estructurales. Un péptido de señal de terminal amino putativo con división predicha puede ocurrir luego de Ala<sup>29</sup>. Esta característica es consistente con la secuencia de péptido 1 que indica tal SIMA135 madura, con un peso molecular predicho de 90.1 kDa, se inicia en el Phe<sup>30</sup>. Un dominio de transmembrana potencial, que abarca los residuos 666 a 686 (encajados en la Figura 1), se predice (Hartmann et al., 1989) para orientar la SIMA135 con su terminal carboxi localizada intracelularmente. Doce motivos de consenso para N-glucosilación se indican en la Figura 1. Un motivo de palmitilación tipo 1 de consenso (IICCV) (Hansen et al., 1999) se localiza en los residuos 687 a 691. Cinco motivos PXXP que están presentes (Figura 1) en otras proteínas se han mostrado por mediar la unión a 3 dominios de homología de Src (SH) (Pawson 1995; Mayer, 2001). Cinco residuos de tirosina (encerrados en círculos Figura 1) pueden ser sitios de may be fosforilación. Dos residuos de tirosina poco separados (Tyr<sup>734</sup> y Tyr<sup>743</sup>) están presentes en motivos de consenso (YXXL/I) para la unión de dominio SH2 (Songyang et al., 1993). La SIMA135 que carece de homología con otras proteínas confirmadas en la base de datos no redundante GenBank. Sin embargo, la SIMA135 tiene alta homología con la proteína teórica CDCP1 como se determina para la traducción de la secuencia de ácido nucleico reportada (Scherl-Mostageer et al., 2001). Adicionalmente, dos regiones de la proteína SIMA135, que abarcan los residuos 221 a 348 y 417 a 544, se identifica que tiene baja homología al CUB (subcomponetes de proteína de complemento Clr/Clis, factor de crecimiento embrionario de urquina y dominios de proteína morfogenética ósea 1) (Bork y Beckmann, 1993). Estos dominios se han reportado por actuar en la mediación de interacción de proteína-proteína (Chen y Wallis, 2001; Sieron et al., 2000). Un tercer dominio CUB putativo descrito por Scherl-Mostageer y colaboradores que abarca los residuos 545 a 660 (Scherl-Mostageer et al., 2001) está por debajo del umbral de detección de homología de los algoritmos de búsqueda utilizados mediante el uso de escanear la secuencia SIMA135 de aminoácido y la secuencia teórica del aminoácido para CDCP1.

#### Ejemplo XIV

#### 30 Patrón de Expresión de SIMA135 en Células y Tejidos Normales y Malignos

Se desarrolla el análisis de transferencia Northern de poly A+ ARN (1 µg por línea) de 12 tejidos humano normales probados con una sonda de cADN de SIMA135 etiquetada <sup>32</sup>P. Los niveles de mRNA en β-actina se muestran como una medida de la carga. El patrón de expresión de mRNA SIMA135 en 12 tejidos humanos normales se examina por análisis de transferencia Northern al hibridar con una sonda de cADN de 2.8 kb de SIMA135 etiquetada <sup>32</sup>P. Una banda de aproximadamente 6.0 kb se detecta en niveles más altos en el músculo esquelético y el colon con niveles más bajos de expresión en el riñón, intestino delgado, placenta y pulmón. Una señal apenas perceptible a -6.0 kb también está presente en los leucocitos de la sangre periférica. Adicionalmente, una señal mucho más débil en aproximadamente 3.3 kb está presente en el músculo esqueleto, colon, placenta y pulmón. No se detecta el mRNA SIMA135 en el cerebro, corazón, timo, bazo o hígado. Con base sobre la alineación de SIMA135 con CADN<sup>7</sup> CDCP1 y las secuencias genómicas (datos no mostrados), parece más probable que las dos transcripciones SIMA135 detectadas por el Análisis de transferencia Northern resultan del uso de señales de poliadenilación alternativa dentro de la 3'UTR SIMA-135. Se considera que la transcripción más larga, más altamente expresada tiene el resultado de un uso de una señal de poliadenilación de más de 3' consensos (en el nucleótido 5950<sup>7</sup>), mientras que la transcripción más corta, más baja expresada probablemente resulta del uso de una señal de poliadenilación menos eficiente, variante, localizada en nucleótidos 3186<sup>7</sup>. También es posible que estas transcripciones variantes resulten del corte de empalme alterno del pre-mRNA SIMA135.

La expresión de la proteína SIMA135 en 16 estirpes celulares humanas, 14 estirpes celulares de tumor humano y dos estirpes celulares humanas normales que se prueban con mAb 41-2, se analiza por el

5 análisis de transferencia Western bajo condiciones no reducidas en el cual se hace electroforesis a cantidades iguales de lisato proteína celular (20 µg) para cada estirpe celular. La SIMA135 se expresa más altamente en células HEp3 metastásicas, con la estirpe celular del cáncer de próstata PC3, y la estirpe celular del cáncer de colon DLD-1 que también manifiesta altos niveles de expresión. Los niveles moderados del antígeno se detectan en la estirpe celular de fibrosarcoma HT1080, las estirpes celulares de 10 cáncer gástrico MKN45 y STKM-1, la estirpe celular de cáncer de colon SW480 y la estirpe celular de cáncer de próstata no metastásico LNCaP. Los niveles bajos de SIMA135 se detectan en 2 estirpes celulares de cáncer de hígado, 2 estirpes celulares de cáncer de mama, la estirpe celular de cáncer de pulmón A549 y la estirpe celular de tumor rabdoide de riñón G401. La SIMA135 no es detectable en células endoteliales microvasculares humanas normales y las células de fibroblastos dérmicos. Los niveles variantes de la 15 proteína SIMA135 se expresan en un número de estirpes celulares de tumor humano, mientras que dos tipos de células humanas normales no expresan la proteína.

#### Ejemplo XV

La SIMA135 es una Superficie Celular, Glucoproteína Fosforilada.

Se utiliza la inmunocitoquímica para determinar la ubicación celular de la SIMA135 en las células 20 HEp3, y también en las células HeLa que se transfectan transitoriamente con una construcción de expresión de SIMA135. La construcción de expresión contiene un epítipo FLAG fusionado después del terminal carboxi de la proteína SIMA135. Las células HEp3 incubadas con mAb 41-2 muestran fuerte teñido en la membrana de plasma. Las células HeLa transfectadas transitoriamente con SIMA135 etiquetada FLAG también muestran teñido fuerte de membrana similar cuando se incubaba con mAb 41-2. Adicionalmente, el 25 terminal carboxi SIMA135 se determina que es intracelular cuando las células HeLa transfectadas transitoriamente permeabilizadas utilizando 0.5% de Triton X-100 para permitir el acceso del anticuerpo a la etiqueta FLAG localizada intracelular e incubada con anti-FLAG mAb muestran teñido de membrana fuerte cuando se incuban con un epítipo mAb anti-FLAG, mientras que las células no permeabilizadas exhiben bajo o poco teñido de fondo con anti-FLAG mAb. Las células HeLa no transfectadas están 30 esencialmente libres de teñido cuando se incuban con mAb 41-2 o un epítipo mAb anti-FLAG. Estos datos confirman la ubicación de superficie celular predicha así como también la orientación tipo I de SIMA135. También, la coincidencia del teñido observado con mAb 41-2 y anti-FLAG mAb en las células HeLa transfectadas transitoriamente con la construcción de expresión de SIMA135-FLAG, adicionalmente confirman que la SIMA135 es el antígeno objetivo para mAb 41-2.

35 El peso molecular teórico de la SIMA135 madura es 90.1 kDa. Sin embargo, el peso molecular aparente de la proteína detectada por mAb 41-2 es 135 kDa. Los lisatos celulares de las células HeLa transfectadas transitoriamente con una construcción de expresión de etiqueta FLAG SIMA135 se tratan con N-glucosidasa F bajo condiciones óptimas para la actividad enzimática para determinar si la diferencia en el peso molecular es debido a la N-glucosilación. Las proteínas se examinan mediante el análisis de 40 transferencia Western bajo condiciones de reducción utilizando un epítipo mAb anti-FLAG de (-) y N-glucosidasa F no tratada (PNGasa F) (+) lisatos tratados de células HeLa transfectadas transitoriamente con la SIMA135FLAG en la construcción de expresión. Se indican las bandas debido a la SIMA135. Una banda de reacción cruzada no específica es evidente en 80 kDa. El tratamiento de N-glucosidasa F resulta en la desaparición de la banda de la proteína SIMA135 en 135 kDa y el reemplazo con la banda ancha de bajo 45 peso molecular de aproximadamente 95 a 105 kDa (datos no mostrados). Los lisatos de las células HEp3 M<sup>+</sup> también se inmunoprecipitan con mAb 41-2 y se tratan con N-glucosidasa F. Las proteínas detectadas de acuerdo con este método también manifiestan una disminución similar de peso molecular. Por lo tanto, hasta 30-40 kDa del peso molecular aparente de la SIMA135 es debido a la N-glucosilación, consistente

5 con el gran número de sitios de glucosilación de consenso en la región extracelular de esta proteína (Figura 1, SEQ ID No.1).

La región intracelular de la SIMA135 contiene 5 residuos de tirosina (Figura 1). El análisis de transferencia Western bajo condiciones de reducción con un anticuerpo anti-fosfotirosina se desarrolla en las proteínas inmunoprecipitadas de los lisatos celulares HEP3 con mAb 41-2 para determinar si cualquiera de estos residuos son fosforilados, las inmunoprecipitaciones que se desarrollan con IgG de ratón normal (nmIgG) o mAb 41-2 de los lisatos celulares HEP3 y HeLa (control negativo). Las proteínas inmunoprecipitadas se sondean con un anticuerpo anti-fosfotirosina (Anti-P-Tyr) y con mAb 41-2 para indicar la presencia de SIMA135 fosforilada y total, respectivamente. Las proteínas de lisato celular se inmunoprecipitan con mAb 41-2. Los lisatos se preparan de las células HEP3 no tratadas (-) o (+) incubadas durante 30 minutos a 37° con PP2 (50 µM). El anticuerpo anti-fosfotirosina detecta una proteína de 135 kDa que se inmunoprecipita de las células HEP3 con mAb 41-2. La misma banda de proteína se detecta cuando las proteínas inmunoprecipitadas se sondean con mAb 41-2. El análisis de transferencia Western también se realiza en las proteínas inmunoprecipitadas de lisatos celulares HeLa con mAb 41-2, y las proteínas inmunoprecipitadas de lisatos celulares HEP3 con IgG de ratón normal como controles. Ambas inmunoprecipitaciones son libres de inmunorreactividad cuando se sondean con el anticuerpo anti-fosfotirosina o mAb 41-2, lo que demuestra la especificidad de las inmunorreacciones observadas con células HEP3. La participación de un miembro de la familia a Src cinasa en la fosforilación de tirosina de la SIMA135 se examina utilizando PP2, un inhibidor de tirosina cinasa selectivo de la familia Src (Hanke et al., 1996). El análisis de transferencia Western con un anticuerpo anti-fosfotirosina de proteínas inmunoprecipitadas de lisatos celulares HEP3 con mAb 41-2, muestra que las células HEP3 tratadas con PP2 durante 30 minutos tienen una reducción significativa (~75%) en el nivel de fosforilación de tirosina de la SIMA135 comparada con la proteína de células HEP3 no tratadas. El análisis de transferencia Western, utilizando mAb 41-2, de las mismas proteínas inmunoprecipitadas, indican que aproximadamente cantidades iguales de proteína SIMA135 están presentes en ambas líneas de la membrana. Estos datos sugieren que un miembro de la familia a Src cinasa actúa durante la fosforilación de tirosina de SIMA135 en las células HEP3.

Un número de proteínas superficie celular integrales, tal como c-met (Wajih et al., 2002) y CD44 (Goebeler et al., 1996), también se producen como moléculas solubles. El análisis de transferencia Western, sondeado con mAb 41-2, se emplea para examinar si las células HEP3 producen una forma soluble de SIMA135. Los cultivos celulares de HEP3 se lavan extensamente con PBS luego se incuban durante 20 hr con medio libre de suero (SF). El medio acondicionado (CM) se cosecha y el material celular se remueve mediante centrifugación y los medios Lugo se concentran 10 veces. El anticuerpo mAb 41-2 detecta una banda inmunorreactiva de aproximadamente 110 kDa en SFCM HEP3. La SIMA135 asociada a célula de los lisatos HEP3 se detecta a 135 kDa. En contraste, las células HeLa no transfectadas, que no producen produce SIMA135, proporcionan bandas no inmunorreactivas en el lisato o el SFCM concentrado. Estos datos indican que las células HEP3 liberan una forma soluble de SIMA135 y la forma soluble se presenta como una proteína inmunorreactiva de bajo peso molecular.

#### Ejemplo XVI

##### Expresión de SIMA135 en Colon Normal y Canceroso

45 Se realiza análisis inmunohistoquímico para determinar la localización in vivo de la SIMA135 en colon norma y canceroso. Las secciones (6 µm) se tiñen con mAb 41-2 como el anticuerpo principal. La mucosa colónica normal representativa muestra expresión epitelial de SIMA135 (rojo-marrón en fotografía a color, no mostrada). Los carcinomas de colon exhiben expresión heterogénea y extensa de la SIMA135. La SIMA135 se expresa por las células dentro de glándulas malignas invadidas en la serosa colónica. La

5 SIMA135 se expresa mediante células epiteliales malignas dentro del lumen de un drenaje de vaso  
sanguíneo en la serosa del colon. En la mucosa colónica normal, la SIMA135 se expresa exclusivamente  
por las células epiteliales cuando estas se presentan uniformemente en las superficies luminal y basal de las  
superficies de las células que revisten en el lumen colónico, y en las superficies apicales de las células que  
10 revisten los folículos glandulares (datos no mostrados). La presencia de tinte intenso en los contenidos de  
las células caliciformes de los folículos en la mucosa del lumen de las glándulas soporta la idea de que la  
SIMA135 se produce en una forma soluble por las células epiteliales colónicas. En el carcinoma de colon,  
los especímenes SIMA135 se expresan extensa y heterológicamente con alguna acentuación focal en la  
mucosa dentro de las glándulas malignas. Algunos grupos de células de cáncer invadidas, se tiñen  
15 pesadamente mostrando la presencia de SIMA135 en las membranas basal, apical y lateral así como  
también dentro de la mucosa glandular. Hay una tendencia definida hacia una asociación de tinte intenso  
con más células neoplásicas, que invaden glándulas como células de carcinoma más profundas en la serosa  
colónica y dentro del drenaje de los vasos sanguíneos es frecuentemente fuertemente positivo para el  
antígeno de SIMA135. Las secciones de control que se incuban con el anticuerpo secundario pero no el  
principal están libres de tinte.

#### 20 Ejemplo XVII

Luego de los procedimientos de transfección descritos anteriormente para las células HeLa, 7  
estirpes celulares diferentes se utilizan para estudiar y monitorear la expresión de mRNA SIMA-135. A  
partir de estas estirpes celulares, el clon no. 3 produce una señal de par base significativa, apropiada.

También se estudia la capacidad de estas estirpes celulares para el transporte en un estudio in vitro,  
25 para hacer metástasis y para formar tumores en ratones SCID y para colonizar órganos secundarios en  
ratones SCIP. Se determina que el clon 3 es capaz de separar y migrar a través de las membranas porosas e  
in vivo y colonizar los órganos secundarios. Estos resultados demuestran que la SIMA 135 es factor central  
clave que maneja la metástasis. Las células de clon no. 3 transformadas también son útiles como el sistema  
celular para la identificación de agentes que promueven o inhiben/minimizan la metástasis de las células  
30 malignas. De conformidad con los procedimientos de transfección bosquejados anteriormente, 7 estirpes  
celulares diferentes se emplean para estudiar los efectos de la expresión de SIMA-135. Estas estirpes  
celulares se ilustran en la Figura 8. Luego de los procedimientos analíticos para la detección de RMA  
SIMA-135 dados anteriormente, se analizan estas 7 estirpes celulares. La Figura 7 muestra los resultados  
del análisis RT-PCR de estas 7 estirpes celulares diferentes que monitorean el mRNA SIMA-135. Los  
35 controles y los datos de RT-PCR irrelevantes están en la particularmente izquierda de la Figura 1. La parte  
derecha de la figura muestra una señal amplificada 600 bp generada de cebadores específicos a SIMA-135.  
La HeLa no transfectada no produce señal, la HeLa no. 4 que tampoco produce señal y la Eff (2) no. 3 que  
es ahora denomina el clon no.3 y genera una señal de 600 bp sustancial. Estos datos indican que las células  
de clon no. 3 tienen niveles elevados de mRNA SIMA-135. Las muestras de estas 7 estirpes celulares se  
40 lisan y los contenidos celulares se analizan de acuerdo con un procedimiento de transferencia Western  
estánda para determinar la presencia de SIMA-135 a través de la unión con MoAb 41-2. La transferencia  
Western en lisatos se prepara de 7 estirpes celulares diferentes sondeadas con MoAb 41-2. Los resultados  
demuestran que el clon no.3 (Eff (2) no.3) produce niveles sustanciales de la proteína inmunorreactiva  
SIMA-135. Esta estirpe celular clonada produce más proteína SIMA-135 entonces aún nuestra estirpe  
45 celular HEp-3 altamente metastásica M+. Clon #4 y las células HeLa progenitoras producen proteína  
SIMA-135 no detectable. Una vez se confirma que se han obtenido las células negativas a SIMA-135 y las  
sobreexpresoras SIMA-135, estas células se prueban para su potencial maligno es decir su capacidad para  
hacer crecer y formar tumores en los ratones SCID y su capacidad para colonizar órganos secundarios en  
ratones SCID. La Tabla I es un resumen de dos tipos separados de ensayos: el Panel A muestra los

5 resultados de un ensayo de metástasis experimental donde se inoculan las células de interés (i.v.) directamente en la vena de cola de los ratones. Unas pocas semanas después, los órganos seleccionados de los ratones inoculados se analizan para la presencia de células humanas (ADN humano) en el fondo del ADN total de órgano de ratón. El análisis se desarrolla por PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos humanos basados en secuencias de repetición alu como se describe en la siguiente referencia (A. Zijlstra, et al., Cancer Research, 2002). Los resultados mostrados en el panel A indican que las células de clon no.3 se colonizan y/o se hacen crecer en pulmón y médula ósea de ratón en niveles sustancialmente más similares a aquellos de las células de clon no.4 inoculadas. También es evidente que el clon no.3 no solo se extiende sobre los ratones inoculados sino que también se extiende en otros órganos mostrados aquí, el páncreas, solo contiene pocos niveles de fondo de ambas células de clon no.3 y clon no.4.

15 El Panel B de la Tabla 1 contiene los resultados de un ensayo de metástasis espontáneo estándar donde las células se inoculan subcutáneamente en los flancos de los ratones SCID, se deja que los tumores se desarrollen sobre 100 mg y luego se seleccionan los órganos, usualmente los pulmones, se analizan para depósitos metastásicos secundarios. La metástasis secundaria se mide mediante procedimientos PCR alu en tiempo real que son específicos para ADN humano. Los resultados indican que el clon no.3 y clon no. 4 forman tumores principales de aproximadamente igual tamaño (peso en miligramos -mg). Sin embargo, el clon no. 3 parece tener metástasis a los pulmones en un nivel que es por lo menos 10 veces más grande que el clon no. 4. Puede ser más de 10 veces mayor ya que el nivel de las células en el clon de pulmón no. 4 es cercano al fondo (50-100 células) en niveles apenas detectables.

25 Los resultados demuestran que la introducción o expresión de la proteína SIMA-135 en las células que normalmente no las producen, transmiten propiedades malignas a las células. Con el fin de caracterizar estos dos clones para las propiedades que podrían indicar que ellas han ganado un potencial maligno se pueden llevar a cabo unos pocos ensayos biológicos celulares en los clones.

30 Un ensayo de crecimiento o proliferación celular se lleva a cabo en cultivos celulares de acuerdo con los procedimientos dados anteriormente. El crecimiento in vitro de estos dos clones es similar y también similar a las células HeLa progenitoras. Así, el índice de proliferación simple no es la razón para su potencial maligno diferencial.

35 También se lleva a cabo un ensayo de migración de trans-pozo por el cual las células de interés se fuerzan a migrar a través de un filtro poroso entre dos cámaras. El ensayo se conduce con medio de cultivo. Los resultados se muestran en la Figura 10. La cámara superior contiene las células en el medio mientras que la cámara inferior contiene el medio enriquecido con suero fetal bovino (FCS) para atraer a las células que migran. Los resultados muestran que las células de clon no.3 son muchos más migratorias que las células de clon #4. Esto podría ser una de las propiedades adquiridas de los sobreexpresores de SIMA-135 que les ayudan en su potencial maligno. Los datos preliminares también indican que las células de clon no.3 aparecen por ser más resistentes que las células de clon no.4 para apoptosis inducida químicamente por el compuesto ara C.

Malignidad In Vivo de los dos clones de HeLa; Clon #4 (SIMA-135 negativo) y clon #3 (sobreexpresores SIMA-135 inoculados en ratones SCID)		
A. Metástasis Experimental (inecuación i.v.en vena de cola ).		
Número calculado para células/órganos humanos *		
	#4	#3
Pulmón	150	2300
Médula ósea	<100	9,500

Páncreas	150	200
B. Metástasis Espontánea (inoculación sucutánea)		
	#4 ratones inoculados	#3 ratones inoculados
Peso de Tumor Principal (mg)	227.5 +/- 68 (n=8)	184.1 +/- 26 (n=7)
Células humanas en Pulmón (# células)*	250*	2800*
*basado en el PCR alu de tiempo real desarrollado en ADN total extraído de órganos cortados dos semanas después de inoculación i.v. y 4 semanas después de inoculación		

5

## Documentos

- Adham IM, Klemm U, Maier WM and Engel W. (1990). *Hum. Genet.*, 84, 125-8.
- Bajorath J. (2000). *Proteins*, 39, 103-111.
- 10 Blom N, Gammeltoft S and Brunak S. (1999). *J. Mol. Biol.*, 294,1351-1362.
- Bork P and Beckmann G. (1993). *J. Mol. Biol.*, 231, 539-545.
- Briner TJ, Kuo MC, Keating KM, Rogers BL and Greenstein JL. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7608-7612.
- Brooks PC, Lin JM, French DL and Quigley JP. (1993). *J. Cell Biol.*, 122, 1351-1359.
- 15 Chen CB and Wallis R. (2001). *J. Biol. Chem.*, 276, 25894-25902.
- Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K and Bairoch A. (2002). *Nucleic Acids Res.*, 30, 235-238.
- Goebeler M, Kaufmann D, Brocker EB and Klein CE. (1996). *J. Cell Sci.*, 109 (Pt 7), 1957-1964.
- Gorelik E, Galili U and Raz A. (2001). *Cancer Metastasis Rev.*, 20, 245-277.
- 20 Grogan MJ, Pratt MR, Marcaurelle LA and Bertozzi CR. (2002). *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 593-634.
- Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA and Connelly PA. (1996). *J. Biol. Chem.*, 271, 695-701.
- Hansen SG, Grosenbach DW and Hruby DE. (1999). *Virology*, 254, 124-137.
- 25 Hartmann E, Rapoport TA and Lodish HF. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5786-90.
- Hooper JD, Clements JA, Quigley JP and Antalis TM. (2001). *J. Biol. Chem.*, 276, 857-60.
- King SW and Morrow KJ, Jr. (1988). *Biotechniques*, 6, 856-861.
- Martin GS. (2001). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 467-475.
- Maruo Y, Gochi A, Kaihara A, Shimamura H, Yamada T, Tanaka N and Orita K. (2002). *Int. J. Cancer*, 100, 486-490.
- 30 Matthew WD and Patterson PH. (1983). *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 48 Pt 2, 625-631.
- Mayer BJ. (2001). *J. Cell Sci.*, 114, 1253-1263.
- Nakai K and Kanehisa M. (1992). *Genomics*, 14, 897-911.
- Nielsen-Preiss, SM and Quigley JP. (1993). *J Cell Biochem* 51:219-235
- 35 Ossowski L and Reich E. (1983). *Cell*, 33, 323-333.
- Pawson T. (1995). *Nature*, 373, 573-580.
- Resh MD. (1994) *Cell*, 76, 411-413.
- Riggott MJ and Matthew WD. (1996). *J. Neurosci. Methods*, 68, 235-245.
- Rye PD and McGuckin MA. (2001). *Tumour. Biol.*, 22, 269-272.

- 5 Scherl-Mostageer M, Sommergruber W, Abseher R, Hauptmann R, Ambros P and Schweifer N. (2001). *Oncogene*, 20, 4402-4408.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P and Ponting CP. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5857-5864.
- Sieron AL, Tretiakova A, Jameson BA, Segall ML, Lund-Katz S, Khan MT, Li S and Stocker W. (2000). *Biochemistry*, 39, 3231-3239.
- 10 Sleister HM and Rao AG. (2002). *J. Immunol. Methods*, 261, 213-220.
- Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, Neel BG, Birge RB, Fajardo JE, Chou MM, Hanafusa H, Schaffhausen B and Cantley LC. (1993). *Cell*, 72, 767-778.
- 15 Soos G, Jones RF, Haas GP, Wang CY. (1997). *Anticancer Res.*, 17, 4253-4258.
- Stocker JW and Nossal GJ. (1976). *Contemp. Top. Immunobiol.*, 5, 191-210.
- Testa JE. (1992). *Cancer Res.*, 52, 5597-5603.
- Testa JE, Brooks PC, Lin JM and Quigley JP. (1999). *Cancer Res.*, 59, 3812-3820.
- 20 Wajih N, Walter J and Sane DC. (2002). *Circ. Res.*, 90, 46-52.
- Williams CV, Stechmann CL and McLoon SC. (1992). *Biotechniques*, 12, 842-847.
- Yammani RR, Seetharam S and Seetharam B. (2001). *J. Biol. Chem.*, 276, 44777-44784.
- Zhang W, Tribble RP and Samelson LE. (1998). *Immunity*, 9, 239-246.
- Patente Estadounidense No: 6,245,898.
- 25 A. Zijlstra, et al., *Cancer Research*, 2002.
- Aunque en la anterior especificación se ha descrito esta invención con relación a ciertas realizaciones preferidas de las mismas, y se han establecido muchos detalles para propósitos de ilustración, será evidente para aquellos expertos en la técnica que la invención es susceptible a realizaciones adicionales y que ciertos de los detalles descritos aquí se pueden variar considerablemente sin apartarse de los principios básicos de la invención.
- 30

## LISTADO DE SECUENCIA

- <110> NOVARTIS AG
- <120> Métodos para diagnosticar cáncer y reducir la metástasis por células de cáncer.
- <130> 4-33290
- 35 <160> 9
- <170> Patentin version 3.2
- <210> 1
- <211> 836
- <212> PRT
- 40 <213> Humano
- <400> 1

Met Ala Gly Leu Asn Cys Gly Val Ser Ile Ala Leu Leu Gly Val Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Gly Ala Ala Arg Leu Pro Arg Gly Ala Glu Ala Phe Glu Ile  
 20 25 30  
 Ala Leu Pro Arg Glu Ser Asn Ile Thr Val Leu Ile Lys Leu Gly Thr  
 35 40 45  
 Pro Thr Leu Leu Ala Lys Pro Cys Tyr Ile Val Ile Ser Lys Arg His  
 50 55 60  
 Ile Thr Met Leu Ser Ile Lys Ser Gly Glu Arg Ile Val Phe Thr Phe  
 65 70 75 80  
 Ser Cys Gln Ser Pro Glu Asn His Phe Val Ile Glu Ile Gln Lys Asn  
 85 90 95  
 Ile Asp Cys Met Ser Gly Pro Cys Pro Phe Gly Glu Val Gln Leu Gln  
 100 105 110  
 Pro Ser Thr Ser Leu Leu Pro Thr Leu Asn Arg Thr Phe Ile Trp Asp  
 115 120 125  
 Val Lys Ala His Lys Ser Ile Gly Leu Glu Leu Gln Phe Ser Ile Pro  
 130 135 140  
 Arg Leu Arg Gln Ile Gly Pro Gly Glu Ser Cys Pro Asp Gly Val Thr  
 145 150 155 160  
 His Ser Ile Ser Gly Arg Ile Asp Ala Thr Val Val Arg Ile Gly Thr  
 165 170 175  
 Phe Cys Ser Asn Gly Thr Val Ser Arg Ile Lys Met Gln Glu Gly Val  
 180 185 190

Lys Met Ala Leu His Leu Pro Trp Phe His Pro Arg Asn Val Ser Gly  
 195 200 205  
 Phe Ser Ile Ala Asn Arg Ser Ser Ile Lys Arg Leu Cys Ile Ile Glu  
 210 215 220  
 Ser Val Phe Glu Gly Glu Gly Ser Ala Thr Leu Met Ser Ala Asn Tyr  
 225 230 235  
 Pro Glu Gly Phe Pro Glu Asp Glu Leu Met Thr Trp Gln Phe Val Val  
 245 250 255  
 Pro Ala His Leu Arg Ala Ser Val Ser Phe Leu Asn Phe Asn Leu Ser  
 260 265 270  
 Asn Cys Glu Arg Lys Glu Glu Arg Val Glu Tyr Tyr Ile Pro Gly Ser  
 275 280 285  
 Thr Thr Asn Pro Glu Val Phe Lys Leu Glu Asp Lys Gln Pro Gly Asn  
 290 295 300  
 Met Ala Gly Asn Phe Asn Leu Ser Leu Gln Gly Cys Asp Gln Asp Ala  
 305 310 315 320  
 Gln Ser Pro Gly Ile Leu Arg Leu Gln Phe Gln Val Leu Val Gln His  
 325 330 335  
 Pro Gln Asn Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Val Val Asp Leu Ser Asn Glu  
 340 345 350  
 Arg Ala Met Ser Leu Thr Ile Glu Pro Arg Pro Val Lys Gln Ser Arg  
 355 360 365  
 Lys Phe Val Pro Gly Cys Phe Val Cys Leu Glu Ser Arg Thr Cys Ser  
 370 375 380  
 Ser Asn Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Lys His Lys Ile Ser Phe Leu  
 385 390 395 400  
 Cys Asp Asp Leu Thr Arg Leu Trp Met Asn Val Glu Lys Thr Ile Ser  
 405 410 415  
 Cys Thr Asp His Arg Tyr Cys Gln Arg Lys Ser Tyr Ser Leu Gln Val  
 420 425 430  
 Pro Ser Asp Ile Leu His Leu Pro Val Glu Leu His Asp Phe Ser Trp  
 435 440 445  
 Lys Leu Leu Val Pro Lys Asp Arg Leu Ser Leu Val Leu Val Pro Ala  
 450 455 460

Gln Lys Leu Gln Gln His Thr His Glu Lys Pro Cys Asn Thr Ser Phe  
 465 470 475 480  
 Ser Tyr Leu Val Ala Ser Ala Ile Pro Ser Gln Asp Leu Tyr Phe Gly  
 485 490 495  
 Ser Phe Cys Pro Gly Gly Ser Ile Lys Gln Ile Gln Val Lys Gln Asn  
 500 505 510  
 Ile Ser Val Thr Leu Arg Thr Phe Ala Pro Ser Phe Arg Gln Glu Ala  
 515 520 525  
 Ser Arg Gln Gly Leu Thr Val Ser Phe Ile Pro Tyr Phe Lys Glu Glu  
 530 535 540  
 Gly Val Phe Thr Val Thr Pro Asp Thr Lys Ser Lys Val Tyr Leu Arg  
 545 550 555 560  
 Thr Pro Asn Trp Asp Arg Gly Leu Pro Ser Leu Thr Ser Val Ser Trp  
 565 570 575  
 Asn Ile Ser Val Pro Arg Asp Gln Val Ala Cys Leu Thr Phe Phe Lys  
 580 585 590  
 Glu Arg Ser Gly Val Val Cys Gln Thr Gly Arg Ala Phe Met Ile Ile  
 595 600 605  
 Gln Glu Gln Arg Thr Arg Ala Glu Glu Ile Phe Ser Leu Asp Glu Asp  
 610 615 620  
 Val Leu Pro Lys Pro Ser Phe His His His Ser Phe Trp Val Asn Ile  
 625 630 635 640  
 Ser Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gly Lys Gln Leu Asp Leu Leu Phe Ser  
 645 650 655  
 Val Thr Leu Thr Pro Arg Thr Val Asp Leu Thr Val Ile Leu Ile Ala  
 660 665 670  
 Ala Val Gly Gly Gly Val Leu Leu Leu Ser Ala Leu Gly Leu Ile Ile  
 675 680 685  
 Cys Cys Val Lys Lys Lys Lys Lys Lys Thr Asn Lys Gly Pro Ala Val  
 690 695 700  
 Gly Ile Tyr Asn Gly Asn Ile Asn Thr Glu Met Pro Arg Gln Pro Lys  
 705 710 715 720  
 Lys Phe Gln Lys Gly Arg Lys Asp Asn Asp Ser His Val Tyr Ala Val  
 725 730 735



5 Phe Glu Ile Ala Leu Pro Arg Glu Ser Gln Ile Thr Val Leu Gly Ile  
 1 5 10 15

Lys Xaa Gly Thr  
 20

10 <210> 5  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> humano  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(17)  
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural  
 <400> 5

Phe Glu Ile Ala Leu Pro Arg Glu Ser Asn Ile Thr Val Leu Ile Lys  
 1 5 10 15

Xaa Gly Thr

20 <210> 6  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> humano  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(4)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural  
 <400> 6

30 Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Pro Gly Ser Thr Thr Asn Pro Glu  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> humano

5 <400> 7

Val Glu Tyr Tyr Ile Pro Gly Ser Thr Thr Asn Pro Glu  
 1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

10 <213> humano

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural

15 <220>

<221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural

<400> 8

20

Xaa Tyr Xaa Leu Gln Val Pro Ser Asp Ile Leu His  
 1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

25 <213> humano

<400> 9

Ser Tyr Ser Leu Gln Val Pro Ser Asp Ile Leu His  
 1 5 10

5

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 1, en donde la proteína es una proteína de fosfotirosina.
2. Un fragmento inmunorreactivo soluble de la SEQ ID NO: 1 con un peso molecular de aproximadamente 110 kDa al reducir SDS-PAGE, y obtenible de medio acondicionado de un cultivo celular HEp3.
3. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al fragmento de la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo no es el anticuerpo monoclonal 41-2.
4. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo reconoce una proteína glucosilada que consiste de la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 1, pero no reconoce una proteína no glucosilada que consiste de la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 1.
5. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una proteína que consiste de la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento de carcinoma epidermoide o cáncer de próstata, en donde dicho anticuerpo no es el anticuerpo monoclonal 41-2.
6. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 y un portador farmacéuticamente aceptable.
7. Un equipo que comprende el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 y material de empaque.
8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 para uso en un método diagnóstico del cáncer que comprende (a) visualizar la unión de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones con una sección de tejido y (b) determinar si el anticuerpo que origina el teñido heterólogo de la muestra de tejido, indica expresión extensa de SIMA 135 de la SEQ ID No: 1 durante toda la muestra de tejido o glándulas malignas teñidas en la serosa colónica.

maglncgvaaiallgvlllgaaarlprgaearfEIALPRSSNITVLIKLGTP T 50  
 LLAkPCYIVISKKHITMLSIKSSGERIVFTFSQCQSPENHFVLEIQKNIDCM 100  
 SGPcPFGEVQLQPPSTSLPTL<sup>▲</sup>RTFIFW<sup>▲</sup>DVKAHKSIGLELQFSIPR<sup>▲</sup>LRQIG 150  
 FGE<sup>▲</sup>SCPDGVTHSISGRIDATVVRIGTFCSSNGT<sup>▲</sup>VSR<sup>▲</sup>IKMQEGVKMALHLPW 200  
 FHP<sup>▲</sup>RNVSGFSIANR<sup>▲</sup>SSIKR<sup>▲</sup>L<sup>▲</sup>CI<sup>▲</sup>IESVFE<sup>▲</sup>GE<sup>▲</sup>CSATLMSANYP<sup>▲</sup>EG<sup>▲</sup>FP<sup>▲</sup>ED<sup>▲</sup>ELM 250  
 T<sup>▲</sup>W<sup>▲</sup>Q<sup>▲</sup>F<sup>▲</sup>V<sup>▲</sup>Y<sup>▲</sup>PAHLRASVSEFLN<sup>▲</sup>FNLSM<sup>▲</sup>CF<sup>▲</sup>RE<sup>▲</sup>RY<sup>▲</sup>IF<sup>▲</sup>GS<sup>▲</sup>T<sup>▲</sup>NP<sup>▲</sup>EV<sup>▲</sup>FK<sup>▲</sup>LE<sup>▲</sup>DK 300  
 Q<sup>▲</sup>PG<sup>▲</sup>MA<sup>▲</sup>GV<sup>▲</sup>EN<sup>▲</sup>LSLQ<sup>▲</sup>CC<sup>▲</sup>DQ<sup>▲</sup>DA<sup>▲</sup>Q<sup>▲</sup>SE<sup>▲</sup>PC<sup>▲</sup>IL<sup>▲</sup>R<sup>▲</sup>L<sup>▲</sup>Q<sup>▲</sup>F<sup>▲</sup>V<sup>▲</sup>L<sup>▲</sup>V<sup>▲</sup>Q<sup>▲</sup>HP<sup>▲</sup>Q<sup>▲</sup>NES<sup>▲</sup>N<sup>▲</sup>K<sup>▲</sup>I<sup>▲</sup>Y<sup>▲</sup>V<sup>▲</sup>V<sup>▲</sup>DL<sup>▲</sup>S 350  
 NERAMSLTIEPRPVKQSRKFFVPCFVCL<sup>▲</sup>ESRT<sup>▲</sup>CSS<sup>▲</sup>N<sup>▲</sup>LT<sup>▲</sup>LT<sup>▲</sup>SG<sup>▲</sup>SK<sup>▲</sup>HK<sup>▲</sup>IS<sup>▲</sup>FL 400  
 CDDLTRLW<sup>▲</sup>MNV<sup>▲</sup>EKT<sup>▲</sup>IS<sup>▲</sup>CT<sup>▲</sup>DE<sup>▲</sup>RY<sup>▲</sup>CC<sup>▲</sup>QR<sup>▲</sup>K<sup>▲</sup>SY<sup>▲</sup>SL<sup>▲</sup>Q<sup>▲</sup>V<sup>▲</sup>PS<sup>▲</sup>DI<sup>▲</sup>L<sup>▲</sup>HP<sup>▲</sup>VEL<sup>▲</sup>H<sup>▲</sup>DE<sup>▲</sup>FS<sup>▲</sup>W<sup>▲</sup>KL 450  
 LVPKDRLSLVLP<sup>▲</sup>AQ<sup>▲</sup>KLQ<sup>▲</sup>QLQ<sup>▲</sup>HT<sup>▲</sup>HE<sup>▲</sup>K<sup>▲</sup>PC<sup>▲</sup>NT<sup>▲</sup>S<sup>▲</sup>FS<sup>▲</sup>YL<sup>▲</sup>V<sup>▲</sup>AS<sup>▲</sup>A<sup>▲</sup>IP<sup>▲</sup>S<sup>▲</sup>Q<sup>▲</sup>DL<sup>▲</sup>Y<sup>▲</sup>FG<sup>▲</sup>SP<sup>▲</sup>CP 500  
 GGSIKQIQ<sup>▲</sup>V<sup>▲</sup>K<sup>▲</sup>Q<sup>▲</sup>M<sup>▲</sup>IS<sup>▲</sup>V<sup>▲</sup>TL<sup>▲</sup>RT<sup>▲</sup>FA<sup>▲</sup>PS<sup>▲</sup>FR<sup>▲</sup>Q<sup>▲</sup>EAS<sup>▲</sup>R<sup>▲</sup>Q<sup>▲</sup>GL<sup>▲</sup>TV<sup>▲</sup>S<sup>▲</sup>FI<sup>▲</sup>PY<sup>▲</sup>FK<sup>▲</sup>EE<sup>▲</sup>GV<sup>▲</sup>FT<sup>▲</sup>VT 550  
 FDTKSKVYLRTFNWDRGLP<sup>▲</sup>SL<sup>▲</sup>TS<sup>▲</sup>V<sup>▲</sup>SW<sup>▲</sup>NI<sup>▲</sup>S<sup>▲</sup>V<sup>▲</sup>PR<sup>▲</sup>DD<sup>▲</sup>V<sup>▲</sup>AC<sup>▲</sup>LT<sup>▲</sup>FF<sup>▲</sup>K<sup>▲</sup>ERS<sup>▲</sup>GV<sup>▲</sup>VC<sup>▲</sup>Q 600  
 TGRAFMIIQEQRTRAEEIFSLDE<sup>▲</sup>DV<sup>▲</sup>LP<sup>▲</sup>K<sup>▲</sup>PS<sup>▲</sup>F<sup>▲</sup>HH<sup>▲</sup>HS<sup>▲</sup>FW<sup>▲</sup>V<sup>▲</sup>NI<sup>▲</sup>SN<sup>▲</sup>CS<sup>▲</sup>PT<sup>▲</sup>SG<sup>▲</sup>K<sup>▲</sup>Q 650  
 LDLLFSVTLTPRTVDLTVILIAAVGGGVLLLSALGLI<sup>●●●●●</sup>IC<sup>●●●●●</sup>V<sup>●●●●●</sup>KK<sup>●●●●●</sup>KT<sup>●●●●●</sup>NK 700  
 GPAVGI<sup>○</sup>Y<sup>○</sup>NG<sup>○</sup>NI<sup>○</sup>NT<sup>○</sup>EM<sup>○</sup>PR<sup>○</sup>Q<sup>○</sup>PK<sup>○</sup>TK<sup>○</sup>GR<sup>○</sup>K<sup>○</sup>RD<sup>○</sup>MS<sup>○</sup>H<sup>○</sup>V<sup>○</sup>AV<sup>○</sup>IE<sup>○</sup>DT<sup>○</sup>M<sup>○</sup>V<sup>○</sup>Y<sup>○</sup>G<sup>○</sup>H<sup>○</sup>L<sup>○</sup>L<sup>○</sup>Q<sup>○</sup>DS 750  
 SCSFLQPEVD<sup>○</sup>TY<sup>○</sup>RR<sup>○</sup>FF<sup>○</sup>Q<sup>○</sup>CT<sup>○</sup>M<sup>○</sup>GV<sup>○</sup>CF<sup>○</sup>PP<sup>○</sup>SP<sup>○</sup>FT<sup>○</sup>IC<sup>○</sup>SR<sup>○</sup>AP<sup>○</sup>TA<sup>○</sup>KL<sup>○</sup>ATE<sup>○</sup>EP<sup>○</sup>FR<sup>○</sup>SP<sup>○</sup>PE 800  
 SESEFY<sup>○</sup>TF<sup>○</sup>SH<sup>○</sup>FN<sup>○</sup>GD<sup>○</sup>V<sup>○</sup>SS<sup>○</sup>K<sup>○</sup>DT<sup>○</sup>DI<sup>○</sup>PLL<sup>○</sup>ST<sup>○</sup>Q<sup>○</sup>EP<sup>○</sup>ME<sup>○</sup>PAE 836

Figura 1