

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 402 171**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2008 E 08737486 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 2142567**

(54) Título: **El antígeno ED-A del fibrinógeno está asociado con la neovasculatura de las metástasis tumorales**

(30) Prioridad:

**02.04.2007 US 909580 P
09.07.2007 US 948564 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.04.2013

(73) Titular/es:

**PHILOGEN S.P.A. (100.0%)
LA LIZZA 7
53100 SIENA, IT**

(72) Inventor/es:

**NERI, DARIO;
RYBAK, JASCHA;
ROESLI, CHRISTOPH;
VILLA, ALESSANDRA y
NERI, GIOVANNI**

(74) Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 402 171 T3

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

DESCRIPCIÓN

El antígeno ED-A del fibrinógeno está asociado con la neovasculatura de las metástasis tumorales

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a la detección y el tratamiento de metástasis, es decir, a la detección y el tratamiento de tumores secundarios que aparecen en un sitio distinto del sitio de un tumor primario. La invención supone el uso de un anticuerpo que se une a la isoforma de la fibronectina con ED-A, especialmente un anticuerpo que se une al dominio ED-A de la fibronectina.
- 10 **[0002]** La mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer están relacionadas con la propagación metastásica de la enfermedad (Hanahan y Weinberg 2000) y una vigorosa neovasculatura es una propiedad característica de las metástasis tumorales agresivas.
- 15 **[0003]** Los tumores se clasifican como benignos o malignos. Los tumores malignos son capaces de propagarse desde el sitio primario (el tumor primario) a otras partes del cuerpo, mientras que los tumores benignos no pueden propagarse. Los tumores malignos pueden propagarse desde el sitio primario por invasión y metástasis. Los tumores formados como resultado de la metástasis se conocen, por ejemplo, como metástasis, tumores secundarios, lesiones metastásicas o focos metastásicos.
- 20 **[0004]** La angiogénesis describe el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes. Los tumores pueden inducir la angiogénesis a través de la secreción de diversos factores de crecimiento (por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular). La angiogénesis tumoral permite a los tumores crecer por encima de unos pocos milímetros de diámetro y es también un requisito previo para la metástasis tumoral. Los nuevos vasos sanguíneos formados como resultado de la angiogénesis forman la neovasculatura del tumor o de las metástasis tumorales.
- 25 **[0005]** La fibronectina (FN) es una glicoproteína que se expresa ampliamente en una diversidad de tejidos normales y fluidos corporales. Es un componente de la matriz extracelular (MEC) y desempeña un papel en muchos procesos biológicos, por ejemplo, adhesión celular, migración celular, hemostasia, trombosis, cicatrización de heridas, diferenciación de tejidos y transformación oncogénica.
- 30 **[0006]** Las diferentes isoformas de la FN se generan por corte y empalme alternativo de tres regiones (ED-A, ED-B, IIICS) del transcripto primario, pre-ARN de FN, un proceso modulado por citocinas y el pH extracelular (Balza 1988, Carnemolla 1989, Borsi 1990, Borsi 1995). La fibronectina contiene dos dominios globulares extra del tipo III que pueden experimentar un corte y empalme alternativo: ED-A y ED-B (ffrench-Constant 1995, Hynes 1990, Kaspar y col. 2006). Los ED-A de la fibronectina de ratón y de la fibronectina humana son idénticos en el 96,7% (solo hay tres aminoácidos diferentes entre las dos secuencias de 90 aminoácidos, véase la figura 5). Algunos anticuerpos dirigidos contra ED-A se describen en el documento EP0580859 y en Linnala y col. 1994, FEBS Letters, 337: 167-170 y Vartio y col. 1987, J. of Cell Science, 88: 419-430.
- 35 **[0007]** Se ha descrito la expresión del ED-A de la fibronectina en células tumorales y en tumores sólidos con respecto a ARNm (véase por ejemplo, Jacobs y col. 2002, Matsumoto y col. 1999, Oyama y col. 1989, Tavian y col. 1994), proteína aislada (Borsi y col. 1987) e inmunohistoquímica (Borsi y col. 1998, Heikinheimo y col. 1991, Koukoulis y col. 1993, Koukoulis y col. 1995, Lohi y col. 1995, Scarpino y col. 1999). También, Borsi y col. 1998, Exp. Cell Res., 240: 244-251, han descrito que ED-A está presente en la neovasculatura de los tumores primarios. Sin embargo no se ha proporcionado ninguna indicación con anterioridad de que ED-A esté asociado con la neovasculatura de las metástasis tumorales.
- 40 **[0008]** En este documento demostramos que el ED-A de la fibronectina se expresa selectivamente en la neovasculatura de las metástasis tumorales. Dado que los vasos sanguíneos de los tumores son fácilmente accesibles para la administración de agentes terapéuticos por vía intravenosa (Neri y Bicknell 2005, Rybak y col. 2006, Thorpe 2004, Trachsel y Neri 2006), algunas moléculas de unión, como moléculas de anticuerpos, que se unen a la A-FN y/o al ED-A de la fibronectina, representan agentes nuevos que pueden usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de metástasis tumorales y/o la metástasis tumoral. El tratamiento de la neovasculatura tumoral (reconocimiento específico de la vasculatura tumoral) es una estrategia prometedora para el tratamiento de las metástasis tumorales. El reconocimiento específico de la vasculatura tumoral tiene como objetivo la alteración de la vasculatura dentro del mismo tumor, con lo que se reduce el riego sanguíneo para privar al tumor de oxígeno y nutrientes y causar la muerte de las células tumorales.
- 45 **[0009]** En este documento se proporcionan anticuerpos dirigidos contra ED-A que reconocen selectivamente los vasos sanguíneos de nueva formación de las metástasis tumorales.
- 50 **[0010]** La presente invención es según se expone en las reivindicaciones.

5 [0011] En un aspecto, la invención se refiere a una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL y que se une a la isoforma de la fibronectina con el dominio extra A (ED-A) para uso en un procedimiento para el tratamiento de metástasis tumorales, en que el anticuerpo está conjugado con una molécula que tiene actividad biocida o citotóxica o con un radioisótopo.

10 [0012] En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL, en que la molécula de anticuerpo se une a la isoforma de la fibronectina con ED-A y está conjugada con una molécula, para la preparación de un medicamento para la administración a la neovasculatura de las metástasis tumorales de la molécula conjugada con el anticuerpo, en que la molécula tiene actividad biocida o citotóxica o es un radioisótopo.

15 [0013] En otro aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL y que se une a la isoforma de la fibronectina con ED-A para uso en un procedimiento *in vivo* para el diagnóstico de metástasis tumorales en un humano o un animal.

20 [0014] La invención también se refiere a un anticuerpo para uso según se expone anteriormente, en que el procedimiento para el diagnóstico de metástasis tumorales comprende las etapas de:

25 (a) administración al humano o animal de un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma de la fibronectina con ED-A y

30 (b) determinación de la presencia o ausencia del miembro de unión en un sitio distante del sitio ocupado actual o previamente por un tumor primario en el cuerpo del humano o el animal;

35 en que la localización del miembro de unión en un sitio distante del sitio ocupado actual o previamente por el tumor primario en el humano o animal indica la presencia de una metástasis tumoral.

40 [0015] La invención también se refiere a un anticuerpo para uso según se expone anteriormente, en que el procedimiento para el diagnóstico de metástasis tumorales comprende las etapas de:

45 (a) administración al humano o animal de un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de la fibronectina y

50 (b) determinación de la presencia o ausencia del miembro de unión en un sitio distante del sitio ocupado actual o previamente por un tumor primario en el cuerpo del humano o el animal;

55 en que la localización del miembro de unión en un sitio distante del sitio ocupado actual o previamente por el tumor primario en el humano o animal indica la presencia de una metástasis tumoral.

60 [0016] También se desvela un procedimiento para el tratamiento de una metástasis tumoral en un individuo que comprende la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión, por ejemplo una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma de la fibronectina con ED-A. Además se desvela un procedimiento para el tratamiento de una metástasis tumoral en un individuo que comprende la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión, por ejemplo una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de la fibronectina.

65 [0017] También se desvela un procedimiento para suministrar una molécula a la neovasculatura de metástasis tumorales en un humano o un animal que comprende la administración al humano o animal de un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma de la fibronectina con ED-A, en que el miembro de unión está conjugado con la molécula. Además se desvela un procedimiento para suministrar una molécula a la neovasculatura de metástasis tumorales en un humano o un animal que comprende la administración al humano o animal de un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de la fibronectina, en que el miembro de unión está conjugado con la molécula.

70 [0018] Un anticuerpo para uso en la invención puede ser un anticuerpo que se une a la isoforma de la fibronectina con ED-A y/o al ED-A de la fibronectina y que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9. Preferentemente, un anticuerpo para uso en la invención es un anticuerpo que se une a la isoforma de la fibronectina con ED-A y/o al ED-A de la fibronectina y que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos B2, C5, D5, C8, F8, B7 o G9. Con la mayor preferencia, un anticuerpo para uso en la invención es un anticuerpo que se une a la isoforma de la fibronectina con ED-A y/o al ED-A de la fibronectina y que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo F8 o variantes de las mismas.

[0019] Un anticuerpo para uso en la invención puede ser una molécula de anticuerpo humano. El anticuerpo comprende dominios de anticuerpo VH y VL. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL hay regiones determinantes de complementariedad (“CDR”) y regiones estructurales (“FR”). Un dominio VH comprende un conjunto de regiones HCDR y un dominio VL comprende un conjunto de regiones LCDR. Una molécula de anticuerpo comprende un dominio de anticuerpo VH que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de VH y una región estructural. También comprende un dominio de anticuerpo VL que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de VL y una región estructural. Los dominios VH y VL y las CDR de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9 se describen en este documento. Según se describe en este documento, un “conjunto de regiones CDR” comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Por lo tanto, un conjunto de regiones HCDR se refiere a HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y un conjunto de regiones LCDR se refiere a LCDR1, LCDR2 y LCDR3. A menos que se indique lo contrario, un “conjunto de regiones CDR” incluye regiones HCDR y LCDR.

[0020] Un anticuerpo para uso en la invención puede comprender un dominio de anticuerpo VH que comprende las regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región estructural, en que HCDR1 es SEQ ID NO: 3, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103 ó 113 y en que HCDR2 es SEQ ID NO: 4 y HCDR3 es SEQ ID NO: 5, según se expone en las reivindicaciones. Preferentemente, HCDR1 es SEQ ID NO: 23, 33, 43, 53, 73, 83 ó 103. Con la mayor preferencia, HCDR1 es SEQ ID NO: 83.

[0021] Un anticuerpo para uso en la invención puede comprender un dominio de anticuerpo VL que comprende las regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región estructural, en que LCDR1 es SEQ ID NO: 6, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106 ó 116 y en que LCDR2 es SEQ ID NO: 7 y LCDR3 es SEQ ID NO: 8, según se expone en las reivindicaciones. Preferentemente, LCDR1 es SEQ ID NO: 26, 36, 46, 56, 76, 86 ó 106. Con la mayor preferencia, LCDR1 es SEQ ID NO: 86.

[0022] Un anticuerpo para uso en la invención puede ser una molécula de anticuerpo aislada dirigida contra el ED-A de la fibronectina, que comprende un dominio VH y un dominio VL, en que el dominio VH comprende una región estructural y un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y en que el dominio VL comprende las regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región estructural y en que HCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103 ó 113, HCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5, LCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 6, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106 ó 116, LCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 y LCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8, según se expone en las reivindicaciones.

[0023] Una o más regiones CDR o un conjunto de regiones CDR de un anticuerpo pueden injertarse en una región estructural (por ejemplo, una región estructural humana) para proporcionar una molécula de anticuerpo para uso en la invención. Las regiones estructurales pueden comprender secuencias de segmentos génicos de la línea germinal humana. Por lo tanto, la región estructural puede adaptarse a la línea germinal, en lo que se cambian uno o más restos dentro de la región estructural para que se correspondan con los restos en la posición equivalente en la región estructural más similar de la línea germinal humana. Un anticuerpo para uso en la invención puede ser una molécula de anticuerpo aislada que tiene un dominio VH que comprende un conjunto de regiones HCDR en una región estructural de la línea germinal humana, por ejemplo, DP47. El anticuerpo tiene también un dominio VL que comprende un conjunto de regiones LCDR, por ejemplo, en una región estructural de la línea germinal humana. La región estructural de la línea germinal humana del dominio VL puede ser DPK22.

Un dominio VH según se describe en este documento puede tener la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101 ó 111. Preferentemente, un dominio VH según se describe en este documento tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 21, 31, 41, 51, 71, 81 ó 101. Con la mayor preferencia, un dominio VH según se describe en este documento tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 81. Un dominio VL según se describe en este documento puede tener la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102 ó 112. Preferentemente, un dominio VL según se describe en este documento tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 22, 32, 42, 52, 72, 82 ó 102. Con la mayor preferencia, un dominio VL según se describe en este documento tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 82.

[0024] Un anticuerpo para uso en la invención puede ser un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende un dominio VH y un dominio VL unidos mediante un enlazante peptídico. El experto en la técnica puede seleccionar una longitud y una secuencia apropiadas para el enlazante, por ejemplo, al menos cinco o diez aminoácidos de longitud y hasta 15, 20 ó 25 aminoácidos de longitud. El scFv puede constar de o comprender la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 9.

[0025] Alternativamente, un anticuerpo para uso en la invención puede ser un diacuerpo (documento WO94/13804; Holliger 1993a), que es una molécula que comprende un primer polipéptido con un dominio VH y un dominio VL unidos mediante un enlazante peptídico y un segundo polipéptido con un dominio VH y un dominio VL unidos mediante un enlazante peptídico, en que el dominio VH y el dominio VL del primer polipéptido se aparenan,

respectivamente, con el dominio VL y el dominio VH del segundo polipéptido. El primer y el segundo polipéptidos pueden ser iguales (con lo que el apareamiento resulta en una molécula bivalente) o diferentes (con lo que el apareamiento resulta en una molécula biespecífica). El experto en la técnica puede seleccionar una longitud y una secuencia apropiadas para el enlazante, por ejemplo, de cinco o menos aminoácidos de longitud. El enlazante 5 puede tener la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 28.

[0026] Las moléculas de anticuerpo se describen en más detalle en otra parte de este documento.

[0027] Un anticuerpo para uso en la invención puede estar conjugado con una molécula que tiene actividad 10 biocida o citotóxica. Alternativamente, un anticuerpo para uso en la invención puede estar conjugado con un radioisótopo. Como alternativa adicional, un anticuerpo para uso en la invención puede estar marcado con un marcador detectable.

[0028] Estos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0029]

Figura 1 A: muestra una representación esquemática de la metodología proteómica basada en perfusión usada para el análisis comparativo de las proteínas accesibles en el hígado de ratones sanos y en metástasis de células F9 en el hígado de ratones. B: muestra los grandes focos metastásicos desarrollados por las metástasis de células F9 en el hígado. 20 C: muestra la tinción selectiva y eficiente de los vasos sanguíneos de metástasis de células F9 en el hígado (metástasis), así como la intensa tinción de los vasos sanguíneos y el marcado de algunos sinusoides en el hígado normal (hígado). La tinción corresponde a las líneas más oscuras y se obtiene después de perfundir los ratones con tumores con 15 ml de una disolución de 6-[biotinamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo 1,8 mM (1 mg/ml) en PBS, pH 7,4, enriquecida con dextrano-40 al 10% como expansor de plasma, con anestesia terminal y 25 llevar a cabo después una tinción histoquímica con un conjugado de estreptavidina y fosfatasa alcalina.

Figura 2 A: muestra la localización de los péptidos de la fibronectina identificados en el análisis proteómico del hígado de ratón normal (normal) y de metástasis de células F9 en el hígado de ratones (tumor) en la estructura de dominios de la fibronectina. B: los péptidos identificados en el análisis proteómico de muestras de hígado normal de ratón y de metástasis de células F9 en el hígado de ratones se sometieron a un experimento de CL-EM/EM. Los péptidos se separaron primeramente por HPLC y seguidamente se eluyeron en 192 fracciones. Cada una de las 30 fracciones se aplicó en un punto diferente en una placa diana de MALDI y se obtuvieron espectros de EM por MALDI-TOF para cada fracción. Se muestran los espectros de masas de dos fracciones de HPLC concretas diferentes (fila superior y fila intermedia, respectivamente) para tres muestras repetidas de metástasis de células F9 en el hígado de ratón (véase el panel marcado: "metástasis de hígado") y tres muestras repetidas de hígado normal de ratón (véase el panel marcado: "hígado normal"). Las alturas de los picos iónicos están normalizadas con 35 respecto al estándar interno (véase Materiales y procedimientos), lo que permite una comparación semicuantitativa de los péptidos correspondientes en las distintas muestras. En la fila superior, el pico indicado con una flecha (marcado "FN" en la primera muestra mostrada) corresponde al péptido FLTTTPNSLLVSWQAPR (SEQ ID NO: 15), que deriva de una región constante de la fibronectina (dominio 16 del tipo III de la fibronectina). El pico iónico de este 40 péptido es mayor en las muestras de metástasis de células F9 en el hígado de ratón (metástasis de hígado), pero también está presente en las muestras de hígado normal de ratón (hígado normal), lo que indica que la molécula de fibronectina, en principio, está presente tanto en las metástasis de células F9 en el hígado de ratón como en el hígado normal de ratón, pero parece ser más abundante en las muestras de metástasis de células F9 en el hígado de ratón. En la fila intermedia, el pico indicado con la flecha a la derecha (marcado "EDA") corresponde al péptido 45 IAWESPQGQVSR (SEQ ID NO: 16), que deriva del dominio extra A de la fibronectina, de corte y empalme alternativo,. Este péptido ED-A solo se detecta en muestras de metástasis de células F9 en el hígado de ratón (metástasis de hígado) y no en las muestras de hígado normal de ratón (hígado normal). El péptido de referencia indicado con la flecha a la izquierda (marcado "ref") se usó para identificar la fracción de HPLC en la que se eluye el péptido ED-A. Esto significa que la presencia del pico del péptido de referencia en los espectros mostrados para las 50 muestras de hígado normal de ratón (hígado normal) es una prueba de que se muestran los espectros de masas de las fracciones en las que el péptido ED-A sería detectable si estuviera presente en las muestras de hígado normal de ratón. La fila inferior muestra una vista en detalle de los espectros de masas en la posición del pico iónico del péptido ED-A (indicado por la flecha), lo que demuestra la ausencia de este péptido en las muestras de hígado 55 normal.

Figura 3 A: la tinción inmunohistoquímica (líneas oscuras) de metástasis de células F9 en el hígado y de tejido de hígado normal de ratón adyacente con un anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con flag (anti-ED-A) reveló un patrón de tinción vascular intenso en las metástasis, mientras que en el tejido de hígado normal adyacente no pudo detectarse una tinción específica. En los controles negativos (control) se omitió el anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con flag. El patrón de tinción observado con el anticuerpo parental dirigido contra ED-

A marcado con flag es similar al patrón de tinción observado con el anticuerpo scFv(L19) dirigido contra ED-B marcado con flag (anti-ED-B) que reconoce el dominio extra B de la fibronectina, un marcador bien establecido de estructuras neovasculares. B: muestra los órganos (bazo, corazón, pulmón y una porción del hígado con dos metástasis) de ratones Sv190 a los que se les habían inyectado células tumorales F9DR y tres semanas después se les volvió a inyectar en la vena de la cola el anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con Alexa 750 (200 μ l/ratón, es decir, 60 μ g de anticuerpo por ratón) (en una concentración final de 0,3 mg/ml). Los órganos de los ratones se extirparon seis horas después de la inyección del anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con Alexa 750. La tinción con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con Alexa 750 se visualizó mediante un aparato de obtención de imágenes de fluorescencia infrarroja de fabricación propia (Birchler y col. 1999) equipado con una lámpara halógena de tungsteno, filtros de excitación y emisión específicos para Alexa 750 y una cámara CCD monocroma.

Figura 4: muestra la expresión de ED-A en metástasis humanas. Se usó el anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con flag para evaluar la expresión de ED-A en metástasis humanas por inmunohistoquímica. Mientras que en los controles negativos (control) sin el anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con flag no se detectó ninguna tinción y en las secciones de tejido de pulmón humano normal solo se observó una tinción de fondo muy débil con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con flag, las metástasis pulmonares humanas (metástasis pulmonares humanas de RCC [carcinoma de células renales]) mostraron una intensa tinción con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con flag (anti-ED-A), como muestran las líneas y sombras oscuras. El patrón de tinción del anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con flag es fundamentalmente vascular y similar al patrón de tinción observado con el anticuerpo scFv(L19) dirigido contra ED-B marcado con flag que reconoce el dominio extra B de la fibronectina, un marcador bien establecido de las estructuras neovasculares. Unos resultados similares se obtuvieron mediante el análisis inmunohistoquímico de metástasis de carcinoma colorrectal en el hígado humano (metástasis hepáticas humanas de CRC) con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con flag. El anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con flag muestra un intenso patrón de tinción vascular y estromal en las metástasis de carcinoma colorrectal en el hígado humano.

Figura 5: muestra un alineamiento entre el ED-A humano (secuencia superior) y el ED-A de ratón (secuencia inferior). Los asteriscos indican las posiciones de aminoácidos en las que los aminoácidos del ED-A humano y el ED-A de ratón son idénticos.

Figura 6 A: muestra la secuencia nucleotídica de la cadena pesada (VH) del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 12). La secuencia nucleotídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A está subrayada. La secuencia nucleotídica de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia nucleotídica de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A se muestra en negrita y subrayada. B: muestra la secuencia nucleotídica de la secuencia enlazante del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 14). C: muestra la secuencia nucleotídica de la cadena ligera (VL) del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 13). La secuencia nucleotídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A está subrayada. La secuencia nucleotídica de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia nucleotídica de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A se muestra en negrita y subrayada.

Figura 7 A: muestra la secuencia aminoacídica de la cadena pesada (VH) del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 1). La secuencia aminoacídica de la CDR1 (SEQ ID NO: 3) de la cadena pesada del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A está subrayada. La secuencia aminoacídica de la CDR2 (SEQ ID NO: 4) de la cadena pesada del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia aminoacídica de la CDR3 (SEQ ID NO: 5) de la cadena pesada del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A se muestra en negrita y subrayada. B: muestra la secuencia aminoacídica de la secuencia enlazante del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 11). C: muestra la secuencia aminoacídica de la cadena ligera (VL) del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 2). La secuencia aminoacídica de la CDR1 (SEQ ID NO: 6) de la cadena ligera del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A está subrayada. La secuencia aminoacídica de la CDR2 (SEQ ID NO: 7) de la cadena ligera del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia nucleotídica de la CDR3 (SEQ ID NO: 8) de la cadena ligera del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A se muestra en negrita y subrayada.

Figura 8: muestra la biodistribución del diacuerpo F8 en ratones con tumores de células F9. A cuatro ratones con tumores de células F9 se les inyectó por vía intravenosa el diacuerpo F8 marcado con ^{125}I . Los ratones se sacrificaron después de 24 horas y se extirparon el tumor, el hígado, el pulmón, el bazo, el corazón, el riñón, el intestino y la cola y se extrajo la sangre. Después se realizó un conteo radiactivo del tumor, el hígado, el pulmón, el bazo, el corazón, el riñón, el intestino, la cola y la sangre. En la figura 8 se muestra el porcentaje (%) de la dosis inyectada (DI) del diacuerpo F8 marcado con ^{125}I detectada por gramo (g) de tumor, hígado, pulmón, bazo, corazón, riñón, intestino, cola y sangre. Los tumores de células F9 (tumores) contenían aproximadamente cuatro veces más de la DI que cualquier otro de los tejidos de ratón analizados.

TERMINOLOGÍA*Fibronectina*

- 5 **[0030]** La fibronectina es un antígeno sometido a un corte y empalme alternativo y se conocen varias isofomas alternativas de fibronectina, según se describe en otra parte de este documento. El dominio extra A (EDA o ED-A) también se conoce como ED, repetición extra del tipo III A (EIIIA) o EDI. La secuencia del ED-A humano ha sido publicada por Kornblihtt y col. (1984), Nucleic Acids Res., 12: 5853-5868 y Paoletta y col. (1988), Nucleic Acids Res., 16: 3545-3557. La secuencia del ED-A humano también está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1631-1720 (dominio del tipo III de la fibronectina 12; dominio extra 2) de la secuencia aminoacídica depositada con el número de acceso P02751. La secuencia del ED-A de ratón está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1721-1810 (dominio del tipo III de la fibronectina 13; dominio extra 2) de la secuencia aminoacídica depositada con el número de acceso P11276.
- 10 **[0031]** La isoforma de la fibronectina con ED-A (A-FN) contiene el dominio extra A (ED-A). La secuencia de la A-FN humana puede deducirse de la correspondiente secuencia precursora de la fibronectina humana disponible en la base de datos SwissProt con el número de acceso P02751. La secuencia de la A-FN de ratón puede deducirse de la correspondiente secuencia precursora de la fibronectina de ratón disponible en la base de datos SwissProt con el número de acceso P11276. La A-FN puede ser la isoforma con ED-A de la fibronectina humana. El ED-A puede ser el dominio extra A de la fibronectina humana.
- 15 **[0032]** El ED-A es una secuencia de 90 aminoácidos que se inserta en la fibronectina (FN) por corte y empalme alternativo y está situada entre los dominios 11 y 12 de la FN (Borsi y col. 1987, J. Cell Biol., 104: 595-600). Generalmente, el ED-A está ausente en la forma plasmática de la FN, pero es abundante durante la 20 embriogénesis, la remodelación de tejidos, la fibrosis, el trasplante cardíaco y el crecimiento de tumores sólidos.

Corte y empalme alternativo

- 25 **[0033]** El corte y empalme alternativo se refiere a la existencia de distintos patrones de corte y empalme de un transcripto primario de ARN a partir de ADN para producir distintos ARNm. Después de la escisión de los intrones, la selección puede determinar qué exones se empalan juntos para formar el ARN. El corte y empalme alternativo conduce a la producción de distintas isoformas que contienen distintos exones y/o distinto número de exones. Por ejemplo, una isoforma puede comprender una secuencia aminoacídica adicional correspondiente a uno o más exones, que puede comprender uno o más dominios.

Miembro de unión

- 30 **[0034]** Este término describe un miembro de una pareja de moléculas que se unen entre sí. Los miembros de una pareja de unión pueden ser derivados naturales o estar producidos de manera total o parcialmente sintética. Uno de los miembros de la pareja de moléculas tiene un área en su superficie o una cavidad que se une a una organización espacial y polar concreta del otro miembro de la pareja de moléculas, de la que por tanto es complementaria. Algunos ejemplos de tipos de parejas de unión son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor hormonal, receptor-ligando o enzima-sustrato. La presente invención se refiere a reacciones del tipo antígeno-anticuerpo.
- 35 **[0035]** Un miembro de unión comprende normalmente una molécula que tiene un sitio de unión a un antígeno. Por ejemplo, un miembro de unión puede ser una molécula de anticuerpo o una proteína que no es un anticuerpo y que comprende un sitio de unión a un antígeno.
- 40 **[0036]** Un sitio de unión a un antígeno puede obtenerse por medio de un ordenamiento de regiones determinantes de complementariedad (CDR) sobre armazones proteínicos que no son anticuerpos, como fibronectina o citocromo B, etc. (Haan y Maggos 2004, Koide 1998, Nygren y col. 1997) o por aleatorización o mutación de los restos aminoacídicos de un bucle dentro de un armazón proteínico para conferir especificidad de unión a una diana deseada. Los armazones para la construcción de nuevos sitios de unión en proteínas han sido revisados en detalle por Nygren y col. (1997). Algunos armazones proteínicos para miméticos de anticuerpos se desvelan en el documento WO/0034784, en el que los inventores describen proteínas (miméticos de anticuerpos) que incluyen un dominio de la fibronectina del tipo III con al menos un bucle aleatorizado. Un armazón adecuado en el que injertar una o más regiones CDR, por ejemplo, un conjunto de regiones HCDR, puede ser proporcionado por cualquier miembro de los dominios de la superfamilia génica de las inmunoglobulinas. El armazón puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de un armazón proteínico que no es un anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de unión a un antígeno en una molécula de armazón que es más pequeña y/o más fácil de preparar que al menos algunas moléculas de anticuerpo. El pequeño tamaño de un miembro de unión puede conferirle propiedades fisiológicas útiles, como la capacidad de entrar en las células, de penetrar en profundidad en los tejidos o de alcanzar dianas dentro de otras estructuras o de unirse dentro de cavidades proteínicas del antígeno

diana. El uso de sitios de unión a antígenos en armazones proteínicos que no son anticuerpos ha sido revisado por Wess, 2004. Son típicas las proteínas que tienen un esqueleto estable y uno o más bucles variables, en las que la secuencia aminoacídica del bucle o los bucles está mutada específica o aleatoriamente para crear un sitio de unión a un antígeno que se une al antígeno diana. Tales proteínas incluyen los dominios de unión a IgG de la proteína A de *S. aureus*, transferrina, tetranectina, fibronectina (por ejemplo, el dominio 10 del tipo III de la fibronectina) y lipocalinas. Otras estrategias incluyen "microcuerpos" sintéticos (Selecore GmbH), que están basados en ciclotidas, proteínas pequeñas con puentes disulfuro intramoleculares.

[0037] Además de las secuencias de anticuerpo y/o del un sitio de unión a un antígeno, un miembro de unión puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, que forman un péptido o polipéptido, como un dominio plegado, para impartir a la molécula otras características funcionales, además de la capacidad de unirse a un antígeno. Los miembros de unión pueden contener un marcador detectable o pueden estar conjugados con una toxina o con una fracción de reconocimiento específico o una enzima (por ejemplo, por medio de un enlace peptídico o un enlazante). Por ejemplo, un miembro de unión puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático), así como un sitio de unión a un antígeno, en que el sitio de unión al antígeno se une al antígeno y de este modo dirige el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo, por escisión.

[0038] Aunque, según se ha señalado, las regiones CDR pueden estar incorporadas en armazones que no son anticuerpos, generalmente la estructura a la que incorporar una región CDR o un conjunto de regiones CDR será una secuencia de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción sustancial de esta, en la que la región CDR o el conjunto de regiones CDR se localizan en una posición que se corresponde con la región CDR o el conjunto de regiones CDR de los dominios variables VH y VL naturales del anticuerpo, codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y posiciones de los dominios variables de la inmunoglobulina pueden determinarse con referencia a Kabat 1987 y sus actualizaciones, disponible actualmente en internet (en immuno.bme.nwu.edu o busque "Kabat" con cualquier buscador).

[0039] Con región CDR o CDR se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina según se definen en Kabat y col. (1987) (Kabat 1991a y ediciones posteriores). Típicamente, un anticuerpo contiene tres CDR en la cadena pesada y tres CDR en la cadena ligera. El término región CDR o CDR se usa en este documento para indicar, según el caso, una de estas regiones o varias o incluso la totalidad de estas regiones que contienen la mayoría de los restos aminoacídicos responsables de la unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epitopo que reconoce.

[0040] Entre las seis cortas secuencias CDR, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad, debida esencialmente a los mecanismos de ordenamiento de los genes que dan lugar a la misma). Su longitud puede ser de tan solo dos aminoácidos, aunque el mayor tamaño conocido son 26 aminoácidos. Desde el punto de vista funcional, la región CDR3 desempeña un papel en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal 1974, Amit 1986, Chothia 1987, Chothia 1989, Caton 1990, Sharon 1990a, Sharon 1990b, Kabat y col. 1991b).

Molécula de anticuerpo

[0041] Este término describe una inmunoglobulina ya sea natural o producida de manera parcial o totalmente sintética. El término abarca también cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión antígeno-anticuerpo. En este caso, debe entenderse que la invención no se refiere a los anticuerpos en su forma natural, es decir, que no se encuentran en su entorno natural, sino que han podido aislarse u obtenerse por purificación a partir de fuentes naturales u obtenerse de otra manera por recombinación genética o por síntesis química y que entonces pueden contener aminoácidos no naturales según se describirá más adelante. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión antígeno-anticuerpo incluyen, pero no se limitan a moléculas de anticuerpos como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd y diacuerpos.

[0042] Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas químicas que se unan al antígeno diana. Tales técnicas pueden suponer la incorporación del ADN codificante de la región variable de una inmunoglobulina o las CDR de un anticuerpo a las regiones constantes o las regiones constantes más las regiones estructurales de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400 y una extensa colección de bibliografía posterior. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo puede someterse a mutación genética o a otros cambios que pueden alterar o no la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

[0043] Dado que los anticuerpos pueden modificarse de muchas maneras, el término "molécula de anticuerpo" debe interpretarse como que abarca cualquier miembro de unión o sustancia que tiene un sitio de unión antígeno-anticuerpo de la especificidad requerida y/o que se une a un antígeno. Por lo tanto, este término abarca fragmentos y derivados de anticuerpos, incluido cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión antígeno-anticuerpo, ya

sea natural o total o parcialmente sintético. Por consiguiente, se incluyen las moléculas químéricas que comprenden un sitio de unión antígeno-anticuerpo o equivalente fusionado con otro polipéptido (por ejemplo, derivado de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpos). La clonación y la expresión de anticuerpos químéricos se describe en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y en una extensa colección de bibliografía posterior.

[0044] Otras técnicas disponibles en la tecnología de la construcción de anticuerpos han hecho posible el aislamiento de anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, pueden prepararse hibridomas humanos según describen Kontermann y Dubel (2001). La expresión en fagos, otra técnica establecida para generar miembros de unión ha sido descrita en detalle en numerosas publicaciones, como el documento WO92/01047 (discutido más adelante), las patentes de los EE. UU. US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404 y Kontermann y Dubel (2001). Para el aislamiento de anticuerpos humanos pueden usarse ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpos del ratón se inactivan y se sustituyen con genes de anticuerpos humanos, mientras se dejan intactos otros componentes del sistema inmunitario del ratón (Mendez 1997).

[0045] Es posible crear moléculas de anticuerpo sintéticas mediante la expresión de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados e incorporados en vectores de expresión adecuados, por ejemplo, según describen Knappik y col. (2000) o Krebs y col. (2001).

[0046] Se ha demostrado que fragmentos de un anticuerpo completo pueden desempeñar la función de unirse a抗ígenos. Algunos ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward 1989, McCafferty 1990, Holt 2003) que consta de un dominio VH o un dominio VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados; (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están enlazados mediante un enlace peptídico que permite a los dos dominios asociarse para formar un sitio de unión a un抗ígeno (Bird 1988, Huston 1988); (viii) dímeros Fv de cadena sencilla biespecíficos (documento PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (documento WO94/13804, Holliger 1993a). Los fragmentos Fv, scFv o las moléculas de diacuerpos pueden estabilizarse por la incorporación de puentes disulfuro que enlacen los dominios VH y VL (Reiter 1996). También pueden prepararse minicuerpos que comprenden un fragmento scFv unido a un dominio CH3 (Hu 1996). Otros ejemplos de fragmentos de unión son Fab', que difiere de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada, incluidas una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo y Fab'-SH que es un fragmento Fab' en el que el(s) resto(s) de cisteína de los dominios constantes tiene(n) un grupo tiol libre.

[0047] Los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse a partir de cualquiera de las moléculas de anticuerpo descritas en este documento, por ejemplo, moléculas de anticuerpo que comprenden los dominios VH y/o VL o regiones CDR o cualquiera de los anticuerpos descritos en este documento, por procedimientos como la digestión con enzimas, como pepsina o papaína y/o la rotura de los puentes disulfuro por reducción química. De otra manera, los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse por técnicas de recombinación genética igualmente bien conocidas por el experto en la técnica o además por síntesis peptídica, por ejemplo, por medio de sintetizadores de péptidos automáticos como los proporcionados por la empresa Applied Biosystems, etc. o por síntesis y expresión de ácidos nucleicos.

[0048] Los fragmentos de anticuerpo funcionales incluyen cualquier fragmento funcional cuya semivida se aumenta mediante una modificación química, especialmente una PEGilación, o mediante incorporación en un liposoma.

[0049] Un dAb (anticuerpo de dominio único) es un pequeño fragmento monomérico de un anticuerpo que se une a un抗ígeno, concretamente la región variable de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo (Holt 2003). Los dAB de VH se presentan naturalmente en camélidos (por ejemplo, camello, llama) y pueden producirse por inmunización de un camélido con un抗ígeno diana, aislamiento de los linfocitos B específicos para el抗ígeno y clonación directa de los genes del dAB a partir de linfocitos B individuales. Los dAB pueden producirse también en cultivo celular. Su pequeño tamaño, buena solubilidad y estabilidad térmica les hace particularmente útiles fisiológicamente y adecuados para la selección y la maduración de la afinidad. Un miembro de unión de la presente invención puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL, sustancialmente según se exponen en este documento, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de regiones CDR, sustancialmente según se exponen en este documento.

[0050] Según se usa en este documento, la frase "sustancialmente según se expone" se refiere a que la(s) característica(s) de las regiones CDR relevantes del dominio VH o VL de los miembros de unión descritos en este documento serán idénticas o muy similares a las regiones especificadas cuya secuencia se expone en este

documento. Según se describe en este documento, la expresión "muy similar" con respecto a una región especificada o regiones especificadas de uno o más dominios variables contempla que pueden llevarse a cabo de una a aproximadamente cinco, por ejemplo, de una a cuatro, incluidas de una a tres o una o dos o tres o cuatro sustituciones aminoacídicas en la región CDR y/o el dominio VH o VL.

- 5 [0051] Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales forman una segunda generación de anticuerpos monoclonales en la que se combinan dos regiones variables diferentes en la misma molécula (Holliger 1999). Su utilidad se ha demostrado tanto en el ámbito del diagnóstico como en el ámbito del tratamiento, a partir de su capacidad de incorporar nuevas funciones efectoras o de reconocer específicamente varias moléculas en la 10 superficie de las células tumorales. En los casos en que han de usarse anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden prepararse de diversas maneras (Holliger 1993b), por ejemplo, químicamente a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecíficos mencionados anteriormente. Estos anticuerpos pueden obtenerse por procedimientos químicos 15 (Glennie 1987, Repp 1995) o por procedimientos somáticos (Staerz 1986, Suresh 1986), pero igualmente por técnicas de ingeniería genética que permiten forzar la heterodimerización y de este modo facilitan el proceso de purificación del anticuerpo deseado (Merchand 1998). Algunos ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen los de la tecnología BiTE™, en la que pueden usarse los dominios de unión de dos anticuerpos de diferente especificidad y enlazarse directamente por medio de péptidos flexibles de poca longitud. Esto combina dos 20 anticuerpos en una única cadena polipeptídica de poca longitud. Los diacuerpos y fragmentos scFv pueden construirse sin una región Fc, usando solamente dominios variables, lo que potencialmente reduce los efectos de una reacción antiidiotípica.
- 25 [0052] Los anticuerpos biespecíficos pueden construirse como una IgG completa, como fragmentos Fab'2 biespecíficos, como Fab'PEG, como diacuerpos o además como fragmentos scFv biespecíficos. Además, dos 30 anticuerpos biespecíficos puede enlazarse por los procedimientos de rutina conocidos en la técnica para formar anticuerpos tetravalentes.
- 35 [0053] Los diacuerpos biespecíficos, al contrario que los anticuerpos biespecíficos completos, pueden ser también especialmente útiles porque pueden construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Es posible seleccionar fácilmente diacuerpos (y muchos otros polipéptidos como los fragmentos de anticuerpo) con las especificidades de unión adecuadas a partir de colecciones mediante expresión en fagos (documento WO94/13804). Si un brazo del diacuerpo ha de mantenerse constante, por ejemplo, con especificidad dirigida contra un antígeno diana, puede prepararse una colección en la que se varía el otro brazo y seleccionar un anticuerpo con la especificidad apropiada. Los anticuerpos biespecíficos completos pueden prepararse por procedimientos de construcción alternativos según se describe en Ridgeway 1996.
- 40 [0054] Existen diversos procedimientos disponibles en la técnica para obtener anticuerpos dirigidos contra un antígeno diana. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, especialmente de origen humano, murino, químico o humanizado, que pueden obtenerse de acuerdo con los procedimientos estándar bien conocidos por el 45 experto.
- 50 [0055] En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o de sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible referirse a técnicas que se describen en particular en el manual "Antibodies" (Harlow y Lane 1988) o a la técnica de preparación a partir de hibridomas descrita por Kohler y Milstein 1975.
- 55 [0056] Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de una célula animal inmunizada contra A-FN o uno de sus fragmentos que contiene el epítopo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo, un fragmento que comprende o consta de ED-A o un fragmento peptídico de ED-A. La A-FN o uno de sus fragmentos pueden producirse especialmente de acuerdo con los procedimientos de trabajo habituales, por recombinación genética a partir de una secuencia de ácido nucleico contenida en la secuencia de ADNc que codifica A-FN o un fragmento de esta, por síntesis peptídica a partir de una secuencia aminoacídica comprendida en la secuencia peptídica de la A-FN y/o un fragmento de esta.
- 60 [0057] Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden purificarse en una columna de afinidad en la que se han inmovilizado previamente A-FN o uno de sus fragmentos que contiene el epítopo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo, un fragmento que comprende o consta de ED-A o un fragmento peptídico de ED-A. Los anticuerpos monoclonales pueden purificarse por cromatografía sobre proteína A y/o G, seguida o no por cromatografía de intercambio iónico con el objetivo de eliminar los contaminantes proteínicos residuales así como el ADN y los LPS, en sí misma, seguida o no por cromatografía de exclusión en gel de sefarosa con el fin de eliminar los agregados potenciales debidos a la presencia de dímeros o de otros multímeros. Todas estas técnicas pueden usarse simultánea o sucesivamente.

Sitio de unión a un antígeno

[0058] Este describe la parte de una molécula que se une a y es complementaria de todo o a parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo se denomina el sitio de unión antígeno-anticuerpo y comprende la parte del anticuerpo que se une a y es complementaria de todo o parte del antígeno. Si el antígeno es de gran tamaño, un anticuerpo solo puede unirse a una parte concreta del antígeno, que se denomina epitopo. Un sitio de unión antígeno-anticuerpo puede ser proporcionado por uno o más dominios variables de un anticuerpo. Un sitio de unión antígeno-anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo (VH).

10 **Aislado**

[0059] Esto se refiere al estado en el que estarán generalmente los anticuerpos y miembros de unión descritos en este documento, así como los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos y miembros de unión. Por lo tanto, los miembros de unión, los dominios VH y/o VL pueden proporcionarse aislados y/o purificados, por ejemplo, a partir de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea o, en el caso de un ácido nucleico, sin o sustancialmente sin ácidos nucleicos o genes de un origen distinto de la secuencia codificante de un polipéptido con la función requerida. Los miembros aislados y los ácidos nucleicos aislados no contendrán o sustancialmente no contendrán material con el que normalmente están asociados, como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular), cuando tal preparación tiene lugar por tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y los ácidos nucleicos pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y estar aún aislados para fines prácticos. Por ejemplo, los miembros se mezclarán normalmente con gelatina u otros vehículos cuando se usen para recubrir placas de microtitulación para uso en inmunoensayos o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usen para diagnóstico o tratamiento. Los miembros de unión pueden estar glicosilados, bien de forma natural o por sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NSO (ECACC 85110503)) o pueden no estar glicosilados (por ejemplo, si se producen por expresión en una célula procariota).

30 **[0060]** También se describen preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpo. Por ejemplo, tales preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de la lisina C-terminal, con diversos grados de glicosilación y/o aminoácidos derivatizados, como la ciclación de un ácido glutámico N-terminal para formar un resto de ácido piroglutámico.

35 **[0061]** Es posible obtener uno o más anticuerpos para un antígeno, por ejemplo la A-FN o el ED-A de la fibronectina, poniendo en contacto una colección de anticuerpos correspondiente con el antígeno o un fragmento del mismo, por ejemplo, un fragmento que comprende o consta de ED-A o un fragmento peptídico de ED-A y seleccionando uno o más miembros de unión de la colección capaces de unirse al antígeno.

40 **[0062]** Una colección de anticuerpos puede cribarse mediante cribado iterativo de filtros de colonias (ICFS). En la técnica ICFS, se cultivan bacterias que contienen el ADN que codifica varias especificidades de unión en un medio líquido y, una vez que se ha alcanzado la fase de crecimiento exponencial, se distribuyen miles de millones de estas en un soporte de crecimiento que consta de un filtro de membrana pretratado adecuadamente que se incuba hasta que aparecen colonias de bacterias totalmente confluentes. Un segundo sustrato de retención consta de otro filtro de membrana, prehumidificado y cubierto con el antígeno deseado.

45 **[0063]** El filtro de membrana de retención se coloca después sobre una placa que contiene un medio de cultivo adecuado y se cubre con el filtro de crecimiento con la superficie cubierta con las colonias bacterianas hacia arriba. El sándwich así obtenido se incuba a temperatura ambiente durante 16 h. De este modo es posible obtener la expresión de los genes codificantes de fragmentos de anticuerpo scFv con una acción de propagación, de modo que aquellos fragmentos que se unen específicamente al antígeno presente en la membrana de retención quedan retenidos. La membrana de retención se trata después para señalar los fragmentos de anticuerpo scFv unidos con las técnicas colorimétricas usadas normalmente para este fin.

55 **[0064]** La posición de los puntos coloreados en el filtro de retención permite remitirse a las colonias bacterianas correspondientes que están presentes en la membrana de crecimiento y han producido los fragmentos de anticuerpo retenidos. Estas colonias se recogen y se cultivan y las bacterias – algunos millones – se distribuyen sobre una nueva membrana de cultivo, repitiendo los procedimientos descritos anteriormente. Después se llevan a cabo ciclos análogos hasta que las señales positivas en la membrana de retención corresponden a colonias positivas individuales, cada una de las cuales representa una fuente potencial de fragmentos de anticuerpo monoclonal dirigidos contra el antígeno usado en la selección. La técnica ICFS se describe, por ejemplo, en el documento WO20246455. Una colección también puede expresarse en partículas o complejos moleculares, por ejemplo, en paquetes genéticos replicables como partículas de bacteriófagos (por ejemplo, T7) u otros sistemas de expresión *in vitro*, en que cada partícula o complejo molecular contiene un ácido nucleico que codifica el dominio

variable de anticuerpo VH expresado en esta y, opcionalmente, también expresa un dominio VL si está presente. La expresión en fagos se describe en el documento WO92/01047 y en las patentes de los EE. UU. US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 y US6521404.

5 [0065] Despues de la selección de los anticuerpos capaces de unirse al antígeno y expresados en bacteriófagos o en otras partículas o complejos moleculares de colecciones, pueden obtenerse el ácido nucleico de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que expresa uno de dichos anticuerpos seleccionados. Este ácido nucleico puede usarse en la subsiguiente producción de un anticuerpo o de los dominios variables de anticuerpo VH o VL por expresión del ácido nucleico con la secuencia del ácido nucleico obtenido de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que expresan uno de dichos anticuerpos seleccionados.

10 [0066] Un dominio variable de anticuerpo VH con la secuencia aminoacídica de un dominio variable de anticuerpo VH de uno de dichos anticuerpos seleccionados puede proporcionarse en forma aislada, al igual que un anticuerpo que comprende un dominio VH tal.

15 [0067] La capacidad de unión a la A-FN o al ED-A de la fibronectina o a otro antígeno diana o isoforma puede analizarse adicionalmente, por ejemplo, la capacidad de competir, por ejemplo, con uno cualquiera de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9 dirigidos contra ED-A en la unión a la A-FN o a un fragmento de la A-FN, por ejemplo, el ED-A de la fibronectina.

20 [0068] Un anticuerpo para uso en la invención puede unirse específicamente a la A-FN y/o al ED-A de la fibronectina. Un anticuerpo para uso en la invención puede unirse a la A-FN y/o al ED-A de la fibronectina con la misma afinidad que los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9 dirigidos contra ED-A, por ejemplo en formato de scFv, o con una mejor afinidad. Un anticuerpo para uso en la invención puede unirse a la A-FN y/o el ED-A de la fibronectina con una K_D de 3×10^{-8} M o con una mejor afinidad. Preferentemente, un anticuerpo para uso en la invención se une a la A-FN y/o al ED-A de la fibronectina con una K_D de 2×10^{-8} M o con una mejor afinidad. Con mayor preferencia, un anticuerpo para uso en la invención se une a la A-FN y/o al ED-A de la fibronectina con una K_D de $1,7 \times 10^{-8}$ M o con una mejor afinidad. Con preferencia aún mayor, un anticuerpo para uso en la invención se une a la A-FN y/o al ED-A de la fibronectina con una K_D de $1,4 \times 10^{-8}$ M o con una mejor afinidad. Con la mayor preferencia, un anticuerpo para uso en la invención se une a la A-FN y/o al ED-A de la fibronectina con una K_D de 3×10^{-9} M o con una mejor afinidad.

25 [0069] Un anticuerpo para uso en la invención puede unirse al mismo epítopo en la A-FN y/o el ED-A de la fibronectina que los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9 dirigidos contra ED-A.

30 [0070] Un anticuerpo para uso en la invención puede no mostrar ninguna unión significativa a moléculas distintas de la A-FN y/o el ED-A de la fibronectina. En particular, puede que un anticuerpo para uso en la invención no se una a otras isoformas de la fibronectina, por ejemplo, a las isoformas de la fibronectina con ED-B y/o con IIICS.

35 [0071] En la presente invención pueden producirse y usarse variantes de las moléculas de anticuerpo desveladas en este documento. Las técnicas requeridas para llevar a cabo sustituciones en las secuencias aminoacídicas de las regiones CDR, los dominios de anticuerpo VH o VL y los miembros de unión están disponibles generalmente en la técnica. Pueden prepararse secuencias variantes con sustituciones para las que puede predecirse o no un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad y analizarse en cuanto a su capacidad para unirse a la A-FN y/o el ED-A de la fibronectina y/o en cuanto a cualquier otra propiedad deseada.

40 [0072] De acuerdo con la presente invención, según se discute, pueden emplearse variantes de la secuencia aminoacídica de dominios variables de cualquiera de los dominios VH y VL, cuyas secuencias se desvelan específicamente en este documento. Algunas variantes concretas pueden incluir una o más alteraciones de la secuencia aminoacídica (adición, delección, sustitución y/o inserción de un resto aminoacídico), pueden ser menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de aproximadamente diez alteraciones o menos de aproximadamente cinco alteraciones, tal vez cinco, cuatro, tres, dos o una. Las alteraciones pueden llevarse a cabo en una o más regiones estructurales y/o una o más regiones CDR. Normalmente, las alteraciones no resultan en una pérdida de función, por lo que un miembro de unión que comprende una secuencia aminoacídica alterada de este modo puede mantener la capacidad de unión a la A-FN y/o al ED-A de la fibronectina. Por ejemplo, puede mantener la misma unión cuantitativa que un anticuerpo en el que no se ha llevado a cabo la alteración, por ejemplo, según se mide en un ensayo descrito en este documento. El anticuerpo que comprende una secuencia aminoacídica alterada de este modo puede tener mejor capacidad de unión a la A-FN y/o al ED-A de la fibronectina.

45 [0073] Es posible generar nuevas regiones VH o VL con las secuencias derivadas de CDR desveladas en este documento mediante mutagénesis al azar de uno o más genes seleccionados de VH y/o VL para generar

mutaciones en todo el dominio variable. Por ejemplo, se llevan a cabo una o dos sustituciones de aminoácidos en todo un dominio variable o conjunto de regiones CDR. Otro procedimiento que puede usarse es dirigir la mutagénesis a las regiones CDR de los genes VH o VL.

5 **[0074]** Según se ha señalado anteriormente, una secuencia aminoacídica de CDR, sustancialmente según se expone en este documento, puede estar contenida como CDR en un dominio variable de un anticuerpo humano o en una porción sustancial del mismo. Las secuencias de HCDR3, sustancialmente según se exponen en este documento, pueden estar contenidas como HCDR3 en un dominio variable de una cadena pesada humana o en una porción sustancial de la misma.

10 **[0075]** Los dominios variables pueden obtenerse o derivarse de cualquier dominio variable humano de la línea germinal o reordenado o puede ser un dominio variable sintético a base de secuencias consenso o reales de dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable puede derivarse de un anticuerpo no humano. Una secuencia de CDR (por ejemplo, CDR3) puede incorporarse en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (por ejemplo, CDR3) mediante la tecnología del ADN recombinante. Por ejemplo, Marks y col. (1992) describen procedimientos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que se usan cebadores consenso dirigidos o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable junto con cebadores consenso dirigidos a la tercera región estructural de los genes de VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de CDR3. Marks y col. describen además cómo puede combinarse este repertorio con una CDR3 de un anticuerpo concreto. Mediante técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención pueden mezclarse con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3 y los dominios VH y VL completos mezclados pueden combinarse con un dominio VL o VH afín para proporcionar miembros de unión. El repertorio puede expresarse después en un sistema huésped adecuado como el sistema de expresión en fagos del documento WO92/01047 o de cualquier documento de una extensa bibliografía posterior, por ejemplo Kay, Winter y McCafferty (1996), de modo que puedan seleccionarse los miembros de unión adecuados. Un repertorio puede constar de cualquier cantidad a partir de 10^4 miembros individuales, por ejemplo, al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 o al menos 10^{10} miembros.

30 **[0076]** De manera similar, una o más o las tres CDR pueden injertarse en un repertorio de dominios VH o VL que después se criba para identificar un miembro de unión o miembros de unión para la A-FN y/o el ED-A de la fibronectina.

35 **[0077]** Pueden emplearse una o más de las regiones HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9 o el conjunto de regiones HCDR y/o pueden emplearse una o más de las regiones X LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9 o el conjunto de regiones LCDR de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9.

40 **[0078]** De manera similar, pueden emplearse otros dominios VH y VL, conjuntos de regiones CDR y conjuntos de regiones HCDR y/o conjuntos de regiones LCDR desvelados en este documento.

45 **[0079]** La A-FN y/o el ED-A de la fibronectina pueden usarse en un cribado para identificar miembros de unión, por ejemplo, moléculas de anticuerpo, para uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de metástasis tumorales. El cribado puede ser un cribado de un repertorio según se describe en otra parte de este documento.

50 **[0080]** En algunas realizaciones, una porción sustancial de un dominio variable de una inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR junto con las regiones estructurales intercaladas. La porción puede incluir también al menos aproximadamente el 50% de una o dos de las regiones estructurales primera y cuarta, en que el 50% es el 50% C-terminal de la primera región estructural y el 50% N-terminal de la cuarta región estructural. Los restos adicionales en los extremos N-terminal y C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos que no se asocian normalmente con regiones de dominios variables naturales. Por ejemplo, la construcción de anticuerpos por técnicas de ADN recombinante puede resultar en la introducción de restos N o C-terminales codificados por enlazantes introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazantes para unir dominios variables de la invención con otras secuencias proteínicas, incluidas las regiones constantes de un anticuerpo, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o marcadores detectables/funcionales según se discute en más detalle en otra parte de este documento.

55 **[0081]** Aunque en la invención los miembros de unión comprenden una pareja de dominios VH y VL, también se desvelan dominios de unión únicos a base de secuencias de dominios VH o de dominios VL. Se sabe que dominios únicos de inmunoglobulina, especialmente dominios VH, son capaces de unirse a antígenos diana de manera específica. Por ejemplo, véase la discusión de los dAb anteriormente.

60 **[0082]** En el caso de cualquiera de los dominios de unión únicos, estos dominios pueden usarse en un cribado

para identificar dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión de dos dominios capaz de unirse a la A-FN y/o el ED-A de la fibronectina. Esto puede conseguirse por procedimientos de cribado por expresión en fagos usando la estrategia denominada combinatoria dual jerárquica, según se desvela en el documento WO92/01047, en la que una colonia individual que contiene un clon de la cadena H o L se usa para infectar una

5 colección completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión de dos cadenas resultante se selecciona mediante técnicas de expresión en fagos como las descritas en dicha referencia. Esta técnica también se desvela en Marks 1992.

10 **[0083]** Los anticuerpos para uso en la presente invención pueden comprender además regiones constantes de un anticuerpo o partes de las mismas, por ejemplo regiones constantes de un anticuerpo humano o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede unirse en su extremo C-terminal con dominios constantes de la cadena ligera de un anticuerpo, incluidas las cadenas Cκ y Cλ humanas, por ejemplo Cλ. De manera similar, un anticuerpo basado en un dominio VH puede unirse en su extremo C-terminal con la totalidad o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio CH1) derivada de cualquier isótipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, 15 IgE e IgM y cualquiera de las subclases de isótipos, en particular IgG1 e IgG4. Cualquier variante de la región constante, sintética u otra, que tiene estas propiedades y estabiliza las regiones variables también es útil en las realizaciones de la presente invención.

20 **[0084]** Los anticuerpos para uso en la invención pueden estar marcados con un marcador detectable o funcional. Un marcador puede ser cualquier molécula que produce o que puede ser inducida para producir una señal, incluidos pero sin limitarse a sustancias fluorescentes, radiomarcadores, enzimas, sustancias quimioluminiscentes o fotosensibilizantes. Por lo tanto, la unión puede detectarse y/o medirse mediante la detección de fluorescencia o luminiscencia, radiactividad, actividad enzimática o absorbancia de luz. Los marcadores detectables pueden unirse a los anticuerpos mediante procedimientos químicos convencionales conocidos en la 25 técnica.

30 **[0085]** Existen numerosos procedimientos por los que el marcador puede producir una señal detectable por medios externos, por ejemplo, por examen visual, radiación electromagnética, calor y reactivos químicos. El marcador puede unirse también a otro miembro de unión que se une al anticuerpo, o a un soporte.

[0086] Los anticuerpos marcados, por ejemplo, scFv marcado con un marcador detectable, pueden usarse para diagnóstico *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* y/o para tratamiento.

35 **[0087]** Por ejemplo, los anticuerpos radiomarcados (por ejemplo, anticuerpos conjugados con un radioisótopo) pueden usarse en radiodiagnóstico y en radioterapia. Los radioisótopos que pueden conjugarse con un miembro de unión de la invención incluyen isótopos como ^{94m}Tc, ^{99m}Tc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²⁰³Pb, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁴⁷Sc, ¹¹¹In, ⁹⁷Ru, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ¹²¹Sn, ¹⁶¹Tb, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁰⁵Rh y ¹⁷⁷Lu.

40 **[0088]** Por ejemplo, un anticuerpo para uso en la invención marcado con un marcador detectable puede usarse para detectar, diagnosticar o monitorizar metástasis tumorales y/o la metástasis tumoral en un humano o animal. El anticuerpo puede administrarse a un humano o animal, normalmente a un paciente humano, y puede determinarse la presencia o ausencia del anticuerpo en un sitio distante de un sitio ocupado actual o previamente por un tumor primario en el cuerpo del humano o el animal; la localización de la molécula de anticuerpo en un sitio 45 distante de un sitio ocupado actual o previamente por un tumor primario en el humano o el animal indica la presencia de metástasis tumorales y/o la metástasis tumoral.

[0089] Un anticuerpo para uso en la presente invención puede usarse para la preparación de un producto de diagnóstico para uso en el diagnóstico de metástasis tumorales.

50 **[0090]** En este documento también se desvela un procedimiento para la detección o el diagnóstico de una metástasis tumoral en un humano o un animal que comprende las etapas de:

(a) administración al humano o animal de un miembro de unión de la presente invención, por ejemplo, marcado con un marcador detectable, que se une a la isoforma de la fibronectina con ED-A y/o el ED-A de la fibronectina y

55 (b) determinación de la presencia o ausencia del miembro de unión en un sitio distante del sitio ocupado actual o previamente por un tumor primario en el cuerpo del humano o el animal;

60 en que la localización del miembro de unión en un sitio distante del sitio ocupado actual o previamente por el tumor primario en el humano o animal indica la presencia de una metástasis tumoral. Cuando el miembro de unión está marcado con un marcador detectable, la presencia o ausencia del marcador detectable puede determinarse mediante la detección del marcador.

[0091] Un anticuerpo según se describe en este documento puede usarse también para medir los niveles de

antígeno en un ensayo de competición, es decir, un procedimiento para la medición del nivel de antígeno en una muestra mediante el empleo de un miembro de unión según proporciona la presente invención en un ensayo de competición. Esto puede ser cuando no se requiera la separación física del antígeno unido del antígeno no unido. Una posibilidad es el acoplamiento de una molécula indicadora al anticuerpo de modo que se produzca un cambio

5 físico u óptico al tener lugar la unión. La molécula indicadora puede generar de manera directa o indirecta señales detectables que pueden ser cuantificables. El acoplamiento de las moléculas indicadoras puede ser directo o indirecto, covalente, por ejemplo, por medio de un enlace peptídico, o no covalente. El acoplamiento por medio de un enlace peptídico puede ser el resultado de la expresión recombinante de una fusión génica que codifica el anticuerpo y la molécula indicadora.

10 [0092] Los ensayos de competición pueden usarse también en el mapeo de epítopos. En un caso particular, el mapeo de epítopos puede usarse para identificar el epítopo al que se une un anticuerpo. Un epítopo tal puede ser lineal o conformacional. Un epítopo conformacional puede comprender al menos dos fragmentos diferentes de la A-FN o del ED-A de la fibronectina, en que dichos fragmentos se sitúan próximos entre sí al plegarse la A-FN o el ED-A de la fibronectina en su estructura terciaria o cuaternaria para formar un epítopo conformacional que es reconocido por un anticuerpo dirigido contra la A-FN o el ED-A de la fibronectina. Para ensayar la competición puede emplearse un fragmento peptídico del antígeno, especialmente un péptido que incluya o conste esencialmente de un epítopo de interés. Puede usarse un péptido que tenga la secuencia epítópica más uno o más aminoácidos en cada extremo. Los anticuerpos para uso en la presente invención pueden ser tales que su unión al antígeno sea inhibida por un péptido que tenga o incluya la secuencia dada.

15 [0093] Otros aspectos de la presente invención emplean un conjugado o una fusión entre un anticuerpo y una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre las células diana en las lesiones y un anticuerpo dirigido contra un componente de la matriz extracelular que está presente en tales lesiones. Por ejemplo, la molécula biocida o citotóxica puede ser interleucina 2 (IL-2), doxorubicina, interleucina 12 (IL-12), interferón y (IFN-γ), el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) o el factor tisular (preferentemente truncado). Tales conjugados pueden usarse terapéuticamente, por ejemplo, para el tratamiento de metástasis tumorales y/o tumores según se menciona en este documento. La producción y el uso de fusiones o conjugados de anticuerpos con moléculas biocidas o citotóxicas se describe, por ejemplo, en el documento WO01/622988.

20 [0094] En este documento se desvela un procedimiento para el tratamiento de la metástasis tumoral y/o metástasis tumorales, en que el procedimiento comprende la administración a un individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión. El miembro de unión puede ser un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre las células diana por interacción celular y (ii) un miembro de unión para la isoforma de la fibronectina con ED-A y/o el ED-A de la fibronectina.

25 [0095] En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo para la preparación de un medicamento para el tratamiento de metástasis tumorales y/o la metástasis tumoral. El anticuerpo puede estar conjugado o fusionado con una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico según se describe en este documento. El anticuerpo puede ser un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre las células diana por interacción celular y (ii) un anticuerpo dirigido contra la fibronectina humana.

30 [0096] En este documento también se desvela un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre las células diana por interacción celular y (ii) un miembro de unión para la fibronectina humana, para uso en un procedimiento para el tratamiento terapéutico del cuerpo de un humano o un animal. Tal tratamiento puede ser de metástasis tumorales y/o de la metástasis tumoral.

35 [0097] Además, en este documento se desvela un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico en las células diana por interacción celular y (ii) un anticuerpo dirigido contra la fibronectina humana. Preferentemente, un conjugado tal comprende una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y un dicho anticuerpo o, cuando el miembro anticuerpo es de cadena doble o múltiple, una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y una cadena polipeptídica componente de dicho anticuerpo. Preferentemente, el anticuerpo es un polipéptido de cadena sencilla, por ejemplo, una molécula de anticuerpo de cadena sencilla, como scFv. Por lo tanto, en otro aspecto más, se desvela una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y una molécula de anticuerpo Fv de cadena sencilla de la invención.

40 [0098] La molécula biocida o citotóxica que ejerce su efecto sobre las células diana por interacción celular puede interaccionar directamente con las células diana, puede interaccionar con un receptor unido a la membrana en la célula diana o perturbar el potencial electroquímico de la membrana celular. Las moléculas que interaccionan con un receptor unido a la membrana incluyen quimiocinas, citocinas y hormonas. Los compuestos que perturban el potencial electroquímico de la membrana celular incluyen hemolisina, ionóforos, fármacos que actúan sobre los canales iónicos. En realizaciones ejemplares preferidas, la molécula es interleucina 2, el factor tisular (preferentemente truncado) o doxorubicina. Otras realizaciones pueden emplear interleucina 12, interferón γ, IP-10 y el factor de necrosis tumoral α (TNF-α).

[0099] Según se discute más adelante, un miembro de unión específica se define en este documento como un anticuerpo. Convenientemente, el anticuerpo puede ser un polipéptido de cadena sencilla, como un anticuerpo de cadena sencilla. Esto permite la producción conveniente de una proteína de fusión que comprende el anticuerpo de cadena sencilla y la molécula biocida o citotóxica (por ejemplo, interleucina 2 o el factor tisular). En otras

5 realizaciones se proporciona un sitio de unión antígeno-anticuerpo por medio de la asociación de un dominio de anticuerpo VH y un dominio de anticuerpo VL en polipéptidos separados, por ejemplo, en un anticuerpo completo o en un fragmento de anticuerpo como Fab o un diacuerpo. Cuando el anticuerpo es una molécula de cadena doble o de cadena múltiple (por ejemplo, Fab o un anticuerpo completo, respectivamente), la molécula biocida o citotóxica puede estar conjugada como un polipéptido de fusión con una o más cadenas polipeptídicas en el anticuerpo.

10 **[0100]** El anticuerpo puede estar conjugado con la molécula biocida o citotóxica por medio de un enlace peptídico, es decir, dentro de un polipéptido de fusión que comprende dicha molécula y el miembro de unión específica o una cadena polipeptídica componente del mismo. Véase Taniguchi y col. (1983) *Nature*, 302: 305-310; MaED-A y col. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 115: 1040-1047; Devos y col. (1983) *Nucl. Acids Res.*, 11: 4307-4323, para información sobre la secuencia de IL-2 útil en la preparación de un polipéptido de fusión que comprenda IL-2. La información sobre la secuencia del factor tisular truncado la proporcionan Scarpatti y col. (1987) *Biochemistry*, 26: 5234-5238 y Ruf y col. (1991) *J. Biol. Chem.*, 266: 15719-15725. Otros modos de conjugación incluyen la conjugación química, especialmente el entrecruzamiento mediante un agente bifuncional (por ejemplo, mediante DOUBLE REAGENTSTM, Cross-linking Reagents Selection Guide, Pierce).

15 **[0101]** Cuando se desea una liberación lenta, por ejemplo, cuando la molécula biocida o citotóxica es doxorrubicina u otra molécula que perturba el potencial electroquímico de la membrana celular, la conjugación química puede tener lugar mediante la formación de una base de Schiff (imina) entre un grupo amino primario del anticuerpo y una fracción de azúcar oxidada (daunosamina) de la molécula biocida o citotóxica como doxorrubicina.

20 **[0102]** También se desvela un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN. Además se desvela un ácido nucleico que codifica una región CDR o un conjunto de regiones CDR o un dominio VH o un dominio VL o un sitio de unión antígeno-anticuerpo o una molécula de anticuerpo, por ejemplo scFv o IgG, por ejemplo IgG1. Las secuencias nucleotídicas preferidas son las secuencias nucleotídicas que codifican los dominios VH y/o VL desvelados en este documento.

25 **[0103]** También se desvelan construcciones en forma de plásmidos, vectores, cassetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido según se describe anteriormente.

30 **[0104]** También se desvela una célula huésped recombinante que comprende una o más construcciones según se describen anteriormente. También se desvela un ácido nucleico que codifica cualquier región CRD o conjunto de regiones CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión antígeno-anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG1 o IgG4, según se indican, al igual que un procedimiento para la producción del producto codificado, en que el procedimiento comprende la expresión a partir del ácido nucleico codificante. La expresión puede conseguirse convenientemente mediante el cultivo en las condiciones apropiadas de las células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, puede aislarse un dominio VH o VL o un miembro de unión y/o purificarse mediante cualquier técnica adecuada y después usarse según sea apropiado.

35 **[0105]** Un ácido nucleico puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia nucleotídica según se expone en este documento abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada, en la que T se sustituye por U, a menos que el contexto requiera lo contrario.

40 **[0106]** Además se desvela un procedimiento para la producción de un dominio variable de anticuerpo VH, en que el procedimiento incluye inducir la expresión del ácido nucleico codificante. Un procedimiento tal puede comprender el cultivo de las células huésped en las condiciones para la producción de dicho dominio variable de anticuerpo VH.

45 **[0107]** También se desvelan procedimientos análogos para la producción de dominios variables VL y miembros de unión que comprenden un dominio VH y/o VL.

50 **[0108]** Un procedimiento de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto. Un procedimiento de producción puede comprender la formulación del producto en una composición que incluye al menos un componente adicional, como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 **[0109]** Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de células huésped diferentes son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, células vegetales, hongos filamentosos, levaduras y sistemas de baculovirus y plantas y animales transgénicos. La

expresión de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpo en células procariotas está bien establecida en la técnica. Como revisión, véase, por ejemplo, Pluckthun 1991. Un huésped bacteriano común es *E. coli*.

- 5 [0110] La expresión en un cultivo de células eucariotas también es una opción disponible para los expertos en la técnica para la producción de un miembro de unión, por ejemplo Chadd y Chamow (2001), Andersen y Krummen (2002), Lerrick y Thomas (2001). Las líneas celulares de mamíferos disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células ováricas de hámster chino (CHO), células HeLa, células renales de cría de hámster, células de melanoma de ratón NS0, células de mieloma de rata YB2/0, células embrionarias humanas de riñón, células embrionarias humanas de retina y muchas otras.
- 10 [0111] Pueden elegirse o construirse vectores adecuados que contengan las secuencias reguladoras apropiadas, incluidas secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, por ejemplo, fagémidos, o víricos, por ejemplo, fagos, según sea apropiado. Para más detalles, véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001). Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, para la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica y análisis de proteínas, se describen en detalle en Ausubel 1999.
- 15 [0112] También se desvela una célula huésped que contiene un ácido nucleico según se desvela en este documento. Una célula huésped tal puede estar *in vitro* y puede estar en cultivo. Una célula huésped tal puede estar *in vivo*. La presencia *in vivo* de la célula huésped puede permitir la expresión intracelular de los miembros de unión desvelados en este documento como "intracuerpos" o anticuerpos intracelulares. Los intracuerpos pueden usarse para terapia génica.
- 20 [0113] También se desvela un procedimiento que comprende la introducción de un ácido nucleico en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción mediante retrovirus u otros virus, por ejemplo, el virus de la vacuna o, para insectos, baculovirus. La introducción de un ácido nucleico en una célula huésped, en particular en una célula eucariota, 25 puede usar un sistema a base de virus o plásmidos. El sistema plasmídico puede mantenerse en forma episómica o puede incorporarse en la célula huésped o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser por integración al azar o dirigida de una o más copias en locus únicos o múltiples. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección mediante bacteriófagos.
- 30 [0114] Después de la introducción puede inducirse o permitirse la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, mediante el cultivo de las células huésped en las condiciones para la expresión del gen. La purificación del producto expresado puede conseguirse por procedimientos conocidos por el experto en la técnica.
- 35 [0115] Un ácido nucleico según se describe en este documento puede integrarse en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración puede estimularse por la inclusión de secuencias que estimulan la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.
- 40 [0116] También se desvela un procedimiento que comprende el uso de una construcción según se expone anteriormente en un sistema de expresión con el fin de expresar un miembro de unión o un polipéptido según se 45 describe anteriormente.
- 45 [0117] Los anticuerpos según se describen en este documento están diseñados para su uso en procedimientos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, por ejemplo, humanos. Los anticuerpos pueden usarse en procedimientos para el diagnóstico o el tratamiento de metástasis tumorales y/o la metástasis tumoral.
- 50 [0118] También se desvelan procedimientos de tratamiento que comprenden la administración de un miembro de unión según se proporciona, composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo tal y el uso un anticuerpo tal en la preparación de un medicamento para administración, por ejemplo, en un procedimiento para la 55 preparación de un medicamento o composición farmacéutica que comprende la formulación del miembro de unión con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y serán adaptados por el experto en la técnica en función de la naturaleza y el modo de administración del(los) compuesto(s) activo(s) elegido(s).
- 60 [0119] Normalmente, los anticuerpos según se describen en este documento se administrarán en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del anticuerpo. Por lo tanto, las composiciones farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza exacta

del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, por inhalación o por inyección, por ejemplo, por vía intravenosa.

5 **[0120]** En la presente invención también se prevén composiciones farmacéuticas para administración por vía oral como, por ejemplo, nanocuerpos, etc. Tales formulaciones orales pueden ser en forma de comprimido, cápsula, polvo, líquido o semisólida. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un vehículo líquido como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse disolución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacáridos o glicoles como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

10 **[0121]** Para una inyección por vía intravenosa o una inyección en el sitio de la afección, el principio activo debe estar en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable, apirógena y con un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica serán capaces de preparar disoluciones adecuadas con el uso, por ejemplo, de vehículos isotónicos como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer con lactato. Pueden emplearse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/o otros aditivos, según se requiera. Los expertos en la técnica conocen numerosos procedimientos para la preparación de formulaciones farmacéuticas. Véase, por ejemplo, Robinson, 1978.

20 **[0122]** Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, de manera simultánea o secuencial o como una preparación combinada con otro u otros agentes terapéuticos, en función de la dolencia que se ha de tratar

25 **[0123]** Un anticuerpo dirigido contra la A-FN o el ED-A de la fibronectina puede usarse como parte de una terapia combinada junto con un componente medicinal adicional. Los tratamientos combinados pueden usarse para proporcionar efectos sinérgicos significativos, en particular la combinación de un anticuerpo que se une a la A-FN y/o el ED-A de la fibronectina con otro u otros fármacos. Un anticuerpo dirigido contra la A-FN y o el ED-A de la fibronectina puede administrarse simultánea o secuencialmente o como una preparación combinada con otro u otros agentes terapéuticos para el tratamiento de una o más de las dolencias listadas en este documento.

30 **[0124]** Por ejemplo, un anticuerpo según se describe en este documento puede usarse en combinación con un agente terapéutico existente para el tratamiento de metástasis tumorales y/o la metástasis tumoral. Los agentes terapéuticos existentes para el tratamiento de metástasis tumorales y/o la metástasis tumoral incluyen: doxorubicina, taxol, gemcitabina, sorafenib, melfalán y avastina.

35 **[0125]** Un anticuerpo según se describe en este documento y uno o más de los componentes medicinales adicionales anteriores pueden usarse para la preparación de un medicamento. El medicamento puede ser para una administración por separado o combinada a un individuo y, por consiguiente, puede comprender el miembro de unión y el componente adicional como una preparación combinada o como preparaciones separadas. Las preparaciones separadas pueden usarse para facilitar una administración por separado y secuencial o simultánea y permitir la administración de los componentes por vías diferentes, por ejemplo, administración por vía oral y parenteral.

45 **[0126]** De acuerdo con la presente invención, las composiciones proporcionadas pueden administrarse a mamíferos. La administración puede tener lugar en una "cantidad terapéuticamente eficaz", que es suficiente para mostrar un beneficio para el paciente. Tal beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad administrada en realidad y la velocidad y evolución temporal de la administración dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se trate, el mamífero concreto que se trate, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración de la composición, el tipo de miembro de unión, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos.

50 La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosis, etc., es responsabilidad de los médicos generales y otros médicos especialistas y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o la evolución de la enfermedad que se trata. Las dosis de anticuerpo apropiadas son bien conocidas en la técnica (Ledermann 1991 y Bagshawe 1991). Pueden usarse las dosis específicas indicadas en este documento o en Physician's Desk Reference (2003) como apropiadas para el tipo de medicamento que se administra. Una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis adecuada de un miembro de unión de la invención pueden determinarse por comparación de su actividad *in vitro* y su actividad *in vivo* en un modelo animal. Se conocen procedimientos para la extrapolación a humanos de las dosis eficaces en ratones y en otros animales de ensayo. La dosis exacta dependerá de una serie de factores, por ejemplo, si el anticuerpo es para diagnóstico, prevención o tratamiento, el tamaño y la localización de la zona que ha de tratarse, la naturaleza exacta del anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo completo, un fragmento o un diacuerpo) y la naturaleza de cualquier marcador detectable o de otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis típica de anticuerpo estará en el intervalo de 100 µg a 1 g para administraciones por vía sistémica, y de 1 µg a 1 mg para administraciones por vía tópica. Puede administrarse una dosis de carga inicial superior, seguida de una o más dosis inferiores. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo completo, por ejemplo, el isotipo IgG1 o IgG4. Esta es una dosis para un tratamiento único de un paciente adulto que puede ajustarse proporcionalmente para

niños y bebés y ajustarse también para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, de dos veces en semana, semanales o mensuales, a discreción del médico. Los tratamientos puede realizarse cada dos a cuatro semanas para la administración por vía subcutánea y cada cuatro a ocho semanas para la administración por vía intravenosa. En algunas realizaciones de la presente invención, el tratamiento es periódico y el intervalo entre administraciones es de aproximadamente dos semanas o más, por ejemplo, de aproximadamente tres semanas o más, de aproximadamente cuatro semanas o más o de aproximadamente una vez al mes. En otras realizaciones de la invención, el tratamiento puede administrarse antes y/o después de una intervención quirúrgica y puede administrarse o aplicarse directamente en el sitio anatómico del tratamiento quirúrgico.

[0127] Otros aspectos y realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la presente descripción, incluidos los ejemplos experimentales siguientes.

EXPERIMENTAL

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Modelo animal

[0128] Los experimentos con animales fueron aprobados por la Oficina Veterinaria Federal Suiza y realizados de acuerdo con la Ordenanza de Protección Animal Suiza. Los ratones se monitorizaron regularmente. Los animales que mostraron cualquier señal de dolor o sufrimiento se sacrificaron, así como en caso de pérdidas de peso corporal superiores al 15%. Ratones Sv129 macho (RCC, Fullingsdorf, Suiza) recibieron una inyección intravenosa de 10^6 células de teratocarcinoma murino F9 (Terrana y col. 1987), proporcionadas amablemente por Dario Rusciano (SIFI, Catania, Italia). Los ratones se usaron tres semanas después de la inyección de células tumorales para biotinilación *in vivo*, experimentos de reconocimiento específico o extirpación de órganos para inmunohistoquímica.

Biotinilación in vivo

[0129] Los experimentos de biotinilación *in vivo* se llevaron a cabo según se ha descrito previamente (Roesli y col. 2006, Rybak y col. 2005). Brevemente, el pecho del ratón anestesiado se abrió mediante un esternotomía mediana. El ventrículo izquierdo del corazón se perforó con una aguja de perfusión y se hizo un pequeño corte en la aurícula derecha para permitir la salida de las disoluciones de perfusión. Inmediatamente después, se llevó a cabo una perfusión de la circulación sistémica con una presión de 100 mm de Hg (13,33 kPa) y una tasa de flujo de 1,5 ml/min. En una primera etapa, la perfusión se llevó a cabo con 15 ml de una disolución biotinilada (precalentada a 38°C) que contenía 1 mg/ml de sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce, Rockford, IL, EE- UU.) en PBS, pH 7,4, enriquecida con dextrano-40 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) al 10% (p/v) como expansor de plasma. De este modo, los componentes sanguíneos que podrían competir con la reacción de biotinilación se eliminaron de la circulación en los primeros minutos de la perfusión y las proteínas que contenían aminas primarias accesibles (y ciertos glicolípidos y fosfolípidos) en los diferentes tejidos pudieron modificarse covalentemente con biotina. Para neutralizar el reactivo de biotinilación sin reaccionar, la biotinilación *in vivo* fue seguida de una etapa de lavado de 10 min con Tris 50 mM, dextrano-40 al 10% (p/v) en PBS, pH 7,4, precalentado a 38°C. Durante la perfusión con el reactivo de biotinilación (y durante los primeros tres minutos de la perfusión siguiente con la disolución de neutralización), la región alrededor del corazón se lavó con Tris 50 mM en PBS, pH 7,4 (38°C), para neutralizar el reactivo de biotinilación sin reaccionar del flujo de salida y evitar el marcado no deseado de moléculas en las superficies de los órganos. Después de la perfusión, se extirparon los órganos y tumores y las muestras se sometieron a congelación instantánea en fresco para la preparación de homogenados de los órganos o se incorporaron en un compuesto para crioincorporación (Microm, Walldorf, Alemania) y se congelaron en isopentano en nitrógeno líquido para la preparación de criosecciones para el análisis histoquímico. Como controles negativos para el análisis proteómico se usaron ratones sin perfundir.

Preparación de extractos proteínicos para el análisis proteómico

[0130] Las muestras se resuspendieron en 40 µl por mg de tejido de tampón de lisis (SDS al 2%, Tris 50 mM, EDTA 10 mM, cóctel de inhibidores de proteinas Complete E (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en PBS, pH 7,4) y se homogeneizaron mediante un aparato dispersador Ultra-Turrax T8 (IKA-Werke, Staufen, Alemania). Los homogenados se sometieron a ultrasonidos mediante un aparato Vibra-cell (Sonics, New Town, CT, EE. UU.), a lo que siguió una incubación de 15 min a 99°C y 20 min de centrifugación a 15.000 x g. El sobrenadante se usó como extracto de proteína total. La concentración de proteína se determinó mediante el kit de reactivos para análisis de proteínas BCA (Pierce).

Purificación de proteínas biotiniladas

[0131] Para cada muestra, 960 µl de una lechada de estreptavidina-sefarosa (Amersham Biosciences,

Uppsala, Suecia) se lavaron tres veces en tampón A (NP40 al 1%, SDS al 0,1% en PBS), se sedimentaron y se mezclaron con 15 mg de extracto de proteína total. La captura de las proteínas biotiniladas se dejó proceder durante 2 h a temperatura ambiente en un mezclador agitador. Se eliminó el sobrenadante y la resina se lavó tres veces con tampón A, dos veces con tampón B (NP40 al 0,1%, NaCl 1 M en PBS) y una vez con bicarbonato de amonio 50 mM.

5 Finalmente, la resina se suspendió en 400 μ l de una disolución de bicarbonato de amonio 50 mM y se le añadieron 20 μ l de tripsina porcina modificada de calidad de secuenciación (disolución madre de 40 ng/ μ l en bicarbonato de amonio 50 mM) (Promega, Madison, WI, EE. UU.). La digestión con proteasa se llevó a cabo durante la noche a 37°C en agitación constante. Los péptidos se desalaron, purificaron y concentraron con microcolumnas C18 (ZipTip C18, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Después de su liofilización, los péptidos se almacenaron a -20°C.

10 *HPLC nanocapilar con aplicación automática de fracciones en línea sobre placas diana de MALDI*

[0132] Los péptidos trópicos se separaron por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) mediante el sistema de CL en nanoescala UltiMate y un microcargador de muestras automático FAMOS (LC Packings, Ámsterdam, Países Bajos) controlado por el software Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, CA, EE. UU.). La fase móvil A constó de acetonitrilo al 2% y ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%, la fase móvil B fue acetonitrilo al 80% y TFA al 0,1% en agua. La tasa de flujo fue de 300 nl/min. Los péptidos liofilizados derivados de la digestión de las proteínas biotiniladas, purificados por afinidad a partir de 1,5 mg de proteína total se disolvieron en 5 μ l de tampón A y se cargaron en la columna (diámetro interno: 75 μ m, longitud: 15 cm, rellena con C18 PepMap 100, 3 μ m y microesferas de 100 Å; LC Packings). Los péptidos se eluyeron con un gradiente del 0-30% de B durante 7 min, del 30-80% de B durante 67 min, del 80-100% de B durante 3 min y B al 100% durante 5 min; la columna se equilibró con A al 100% durante 20 min antes de analizar la muestra siguiente. Las fracciones de elución se mezclaron con una disolución de 3 mg/ml de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, 277 pmol/ml de neurotensina (estándar interno), TFA al 0,1% y acetonitrilo al 70% en agua y se depositaron en una placa diana de MALDI de 192 pocillos mediante un sistema Probot en línea (Dionex). El flujo de la disolución matriz de MALDI se fijó en 1,083 μ l/min. Por lo tanto, cada fracción recogida durante 20 s contenía 361 nl de la disolución matriz de MALDI y 100 nl de la muestra. La concentración final de neurotensina fue de 100 fmol por pocillo.

30 *Espectrofotometría de masas MALDI-TOF/TOF*

[0133] El análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF se llevó a cabo con el analizador proteómico 4700 (Applied Biosystems, Framingham, MA, EE. UU.). Para la selección de iones precursores se midieron todas las fracciones en el modo EM, antes de realizar la EM/EM. Se seleccionaron un máximo de 15 precursores por punto de muestra para una fragmentación posterior por disociación inducida por colisión. Los espectros se procesaron y analizaron mediante la Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems), que usa el software interno MASCOT (Matrix Science, London, Reino Unido) para comparar los datos de EM y EM/EM con bases de datos de proteínas digeridas por medios informáticos. Los datos obtenidos se cribaron por comparación con una base de datos de ratón descargada de la página de internet del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las identificaciones de proteínas realizadas por medio del software MASCOT se consideraron como resultados positivos dentro del intervalo de confianza del 95% para el mejor ión peptídico.

[0134] Los análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF se llevaron a cabo mediante el analizador proteómico 4700 (Applied Biosystems). Las masas peptídicas se obtuvieron en un intervalo de 750 a 4.000 m/z, con una masa foco de 2.000 m/z. Se sumaron los espectros de EM de 2.000 disparos de un láser de Nd:YAG que operaba a 335 nm y 200 Hz. Se llevó a cabo una calibración automática de las placas mediante cinco estándares peptídicos (masas de 900-2.400 m/z; Applied Biosystems) en seis pocillos de calibración. Esta calibración de placas se usó para actualizar la calibración de masas por defecto del instrumento que se aplicó a todos los espectros de EN y EM/EM. Además se llevó a cabo una calibración interna de cada espectro de EM mediante el péptido estándar interno añadido a la matriz de MALDI. Un máximo de 15 precursores por pocillo de muestra con una razón señal/ruido superior a 100 se seleccionó automáticamente para una fragmentación posterior por disociación inducida por colisión. Se sumaron los espectros de EM/EM de 2.500 a 5.000 disparos de láser. Los espectros se procesaron y analizaron mediante la Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems), que usa el software interno MASCOT (Matrix Science) para comparar los datos de EM y EM/EM con bases de datos de proteínas digeridas por medios informáticos. Los parámetros de búsqueda de MASCOT fueron (i) una base de datos de ratón descargada de la página de internet del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) el 9 de septiembre de 2006 (ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/SPproteomes/fasta/proteomes/59.M_musculus.fasta.gz); (ii) enzimas: tripsina y semitripsina; (iii) número permitido de sitios no cortados: 1; (iv) modificaciones postraduccionales variables: oxidación de metionina; (v) tolerancia para los péptidos: \pm 30 ppm; (vi) tolerancia de EM/EM: \pm 0,2 Da; (vii) carga de los péptidos: +1; (viii) mínimo % del IC de la puntuación iónica para péptidos: 95 y (ix) rango peptídico máximo: 1. Además, se usó una filtración de los picos de EM/EM con los siguientes parámetros: (i) intervalo de masas: 60 Da a 20 Da por debajo de la masa del precursor; (ii) mínima razón señal/ruido: 6; (iii) filtro de densidad de los picos: un máximo de 30 picos por 200 Da y (iv) máximo número de picos por espectro: 65.

Anticuerpos

5 [0135] El aislamiento del fragmento de anticuerpo scFv(L19) dirigido contra ED-B ha sido descrito previamente (Pini y col. 1998). El anticuerpo parental dirigido contra ED-A se aisló de la colección ETH-2 mediante procedimientos publicados (Giovannoni, Nucleic Acids Research, 2001, 29(5): E27). La maduración de la afinidad del anticuerpo parental dirigido contra ED-A, que produce los anticuerpos de gran afinidad dirigidos contra ED-A, se describe en la sección siguiente.

10 *Maduración de la afinidad del anticuerpo parental dirigido contra ED-A*

10 [0136] El anticuerpo parental dirigido contra ED-A (un anticuerpo derivado de la colección ETH-2) se usó como molde para la construcción de una colección para maduración de afinidad. La variabilidad de secuencia en la CDR1 de VH (DP47 de la línea germinal) y en la CDR1 de VL (DPK22 de la línea germinal) de la colección se introdujo por PCR mediante los cebadores parcialmente degenerados 5'-CTGGAGCCTGGCGGACCCAGCTCATMNNMNNMNGCTAAAGGTGAATCCAGA-3' (SEQ ID NO: 17) para VH y 5'-CCAGGTTCTGCTGGTACCCAGGCTAACNEPNMNNMNGCTAACACTCTGACTGGCCCTGC-3' (SEQ ID NO: 18) para VL (todos los nucleótidos se adquirieron de Operon Biotechnologies, Colonia, Alemania) en un proceso que genera mutaciones al azar en las posiciones 31, 32 y 33 de la CDR1 de VH y en las posiciones 31, 31a y 3% de la CDR1 de VL. Las combinaciones VH-VL se ensamblaron en formato scFv por ensamblaje por PCR mediante los cebadores LMB3long (5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3') (SEQ ID NO: 19) y fdseqlong (5'-GACGTTAGTAAATGAATTCTGTATGAGG-3') (SEQ ID NO: 20), con segmentos de VH y VL purificados por gel como moldes. Los fragmentos VH-VL ensamblados se sometieron a una doble digestión con *N*col/*N*otI y se clonaron en el vector fagémido pHEN1 (Hoogenboom y col. 1991) digerido con *N*col/*N*otI. El producto de ligación resultante se introdujo por electroporación en células TG-1 de *E. coli* electrocompetentes de acuerdo con (Viti y col 2000), para dar lugar a una colección que contenía $1,5 \times 10^7$ clones de anticuerpos individuales, la cual se cribó para la identificación de anticuerpos que se unieran a ED-A con una mayor afinidad.

20 *Selección de anticuerpos dirigidos contra ED-A*

20 [0137] La colección de anticuerpos descrita anteriormente se cribó para la identificación de anticuerpos que se unieran a ED-A con mayor afinidad que el anticuerpo parental dirigido contra ED-A mediante un análisis BIACore. El antígeno (11A12) usado en el análisis BIACore contenía el dominio ED-A de la fibronectina humana y tiene la secuencia aminoacídica siguiente (SEQ ID NO: 120):

35 MRSYRTEIDKPSQMVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTPKNGPGPTKTAGPDQ
 TEMTIEGLQPTVEYVVSVYAQNPSPGESQPLVQTAVTNIDRPKGLAFTDVVDVDSIKIAWES
 PQGQVSRYRVTYSSPEDGIHELPAPDGEEDTAELQGLRPGEYTVSVVALHDDMESQPL
 IGTQSTAIPAPTDLKFTQVTPTSLSAQWTPPNVQLTGYRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDS
 SSVVVSGLMVATKYEVSVYALKDTLTSRPAQGVVTLENVRSHHHHH

35 [0138] La secuencia nucleotídica del antígeno (11A12) (SEQ ID NO: 121) es la siguiente:

atgagatcctaccgaacagaaaattgacaaaccatcccagatgcaagtgaccgatgttcaggacaaca
gcattagtgtcaagtggctgccttcaagttccctgttactggttacagagtaaccaccactccaa
aaatggaccaggaccaacaaaaactaaaactgcaggtccagatcaaacagaaaatgactattgaaggc
ttgcagcccacagtggagtagtggtagtgcatacgatccaagcggagagactcagcc

ttccatcaaaattgtttggaaagcccacagggcaagttccaggtacagggtgacccatctcgagc
cctgaggatggaatccatgagctattccctgcacctgatggtaagaagacactgcagagctgcaag
gcctcagacgggttctgagtagcacacagttagtgggtgcctgcacgatgatggagagcc
cctgattggacccagtcacagctattccctgcaccaactgacactgaaagttcactcaggtcacaccc
acaaggctgagcgcacagtgacaccaccaatgttcaactgatcgagtgccgggtgaccc
ccaaggagaagaccggaccaatgaaagaaatcaacccctgctcctgacagctcatccgtgggtatc
aggacttatggggccaccaaataatgaaagttagtgcatacgatctttaaggacactttgacaaggcaga
ccagctcagggagttgtcaccactctggagaatgtcagatctcatcaccatcaccatcactaa

[0139] La secuencia nucleotídica del antígeno se amplificó por PCR con cebadores que contenían sitios de restricción para *Bam*HI y *Bgl*II en los extremos 5' y 3', respectivamente. El producto de PCR resultante y el vector 5 pQE12 (QIAGEN) se dirigieron con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Bgl*II y después se ligaron en una reacción que contenía una razón inserto/vector de 3:1. El vector resultante se secuenció para comprobar que la secuencia era correcta.

[0140] El antígeno se preparó de la manera siguiente:

[0141] Un precultivo electrocompetente de células TG1 en 10 ml de 2TY, Amp, glucosa al 1%, se sometió a electroporación en presencia de 1 μ l de una minipreparación de ADN de 11A12. Después, el precultivo se diluyó 1:100 (8 ml en 800 ml de 2YT, Amp, glucosa al 0,1%) y se incubó hasta alcanzar una DO_{600} de 0,4-0,6 y entonces se indujo con IPTG durante la noche. Al día siguiente, las células se sedimentaron por centrifugación y el sobrenadante 15 se filtró (Millipore 0,22 μ m). Después de la centrifugación y clarificación del cultivo, 11A12 se purificó mediante una columna Hitrap en un sistema de FPLC. La columna de Ni se regeneró de la manera siguiente: la columna se lavó con cinco volúmenes de la columna (VC) de H₂O, y a continuación se aplicaron 3 VC de EDTA 0,5 M, Tris 0,2 M, pH 8, para lixiviatar la columna el níquel antiguo. A esto siguió un lavado de la columna con 5 VC de H₂O. La columna se recargó después con 2 VC de NiSO₄ 100 mM, a lo que siguió un lavado de la columna con varios VC de H₂O. 20 Después, la columna se equilibró con 5 VC de tampón de lisis (imidazol 20 mM, NaCl 250 mM, PBS, pH 7,4. El lisado celular se filtró (Millipore 0,45 μ m) y se cargó en la columna (manualmente). La columna se puso de nuevo en el sistema de FPLC y el tampón de lisis se dejó fluir hasta que la señal UV fue estable (constante), aproximadamente 3 VC. Entonces se inició el programa de elución: un gradiente del 0% al 100% del tampón de elución (imidazol 400 mM, NaCl 250 mM, PBS, pH 7,4) en 5 VC. Las fracciones que contenían el antígeno eluido se reunieron y se 25 dializaron en PBS durante la noche.

Expresión y purificación de los anticuerpos dirigidos contra ED-A

[0142] Los anticuerpos dirigidos contra ED-A se expresaron y purificaron de la manera siguiente: un precultivo 30 electrocompetente de células TG1 en 10 ml de 2TY, Amp, glucosa al 1%, se sometió a electroporación en presencia de 1 μ l de una minipreparación de ADN de uno de los anticuerpos dirigidos contra ED-A. Después, el precultivo se diluyó 1:100 (8 ml en 800 ml de 2YT, Amp, glucosa al 0,1%) y se incubó hasta alcanzar una DO_{600} de 0,4-0,6 y entonces se indujo con IPTG durante la noche. Al día siguiente, las células se sedimentaron por centrifugación y el sobrenadante se filtró (Millipore 0,22 μ m). Los scFv se purificaron en una columna de proteína A-sefarosa, usando 35 trietilamina para eluir las fracciones de scFv de la columna. Las fracciones que contenían los scFv eluidos se dializaron en PBS durante la noche a 4°C. Después, las fracciones de scFv se cargaron en una columna Superdex 75 con un flujo de PBS de 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 0,25 ml. Las fracciones monoméricas se usaron para el análisis BIACore.

40 *Análisis BIACore 1*

[0143] El chip BIACore se sometió durante la noche a un flujo de 5 μ l/min del tampón HBS-EP de BIACORE,

Hepes 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005% (el mismo tampón usado en el ensayo). El antígeno (11A12) se diluyó hasta una concentración de 50 µg/ml en tampón de acetato (pH 4,0) y los grupos COOH del chip se activaron por la inyección de 50 µl de una mezcla de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y etil-*N*-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Un volumen de 40 µl del antígeno 11A12 se inyectó sobre el chip y los grupos COOH libres residuales se bloquearon con 30 µl de etanolamina. Después de una filtración a través de un filtro de 0,22 µm, se inyectaron sobre el chip 20 µl de cada sobrenadante bacteriano individual y la interacción con el antígeno se monitorizó en tiempo real.

10 Análisis BIACore 2

5 [0144] Las constantes k_{on} , k_{off} y K_D del anticuerpo parental dirigido contra ED-A y los anticuerpos B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 dirigidos contra ED-A se evaluaron mediante resonancia de plasma superficial. El chip se equilibró durante la noche con el mismo tampón usado durante el ensayo con una tasa de flujo de dicho tampón de 5 µl/min. Todo el procedimiento de recubrimiento se llevó a cabo con esta tasa de flujo. El antígeno 11A12 se diluyó 1:25 con 15 tampón de acetato pH 4,00 (proporcionado por BIACORE) hasta una concentración final de 20 µg/ml. Después se mezclaron NHS y EDC y se inyectaron 50 µl para activar los grupos COOH en el chip CM5. A continuación se inyectaron 40 µl del antígeno (esto dura aproximadamente 40 s). Después se inyectaron 30 µl de etanolamina para bloquear la reactividad de los posibles grupos COOH libres.

20 [0145] Todos los ejemplos se ensayaron con una tasa de flujo de 20 µl/min. Se inyectaron 20 µl de la proteína monomérica sin diluir (según se obtiene de la filtración en gel). La disociación se dejó proceder durante 25 aproximadamente 200 s. Después se inyectaron 10 µl de HCl 10 mM para regenerar el chip. La inyección de la proteína monomérica se repitió con diluciones diferentes, es decir, dilución 1:2 (en PBS), seguida de la regeneración con HCl. A continuación se llevó a cabo una tercera inyección de la proteína, a una dilución 1:4, seguida de nuevo por una regeneración con HCl. Los valores de k_{on} , k_{off} y K_D para cada anticuerpo dirigido contra ED-A se evaluaron con el software de evaluación BIAscenario.

Histoquímica

30 [0146] Con el fin de verificar una satisfactoria biotinilación *in vivo*, se llevó a cabo una tinción posterior de las estructuras biotiniladas según se describe en Rybak y col. 2005. Se cortaron secciones (10 µm) de muestras congeladas en fresco, se fijaron con acetona, se incubaron sucesivamente con un complejo de estreptavidina y 35 fosfatasa alcalina biotinilada (Biospa, Milán, Italia) y con Fast-Red TR (Sigma) (en presencia de levamisol 1mM para inhibir la fosfatasa alcalina endógena) y se tiñeron con una disolución de hematoxilina (Sigma) como contraste. La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos scFv, que contenían un marcador FLAG, se llevó a cabo según se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, Brack y col. 2006). Brevemente, se incubaron las secciones con los 40 fragmentos scFv (concentración final 2-10 µg/ml) y con el anticuerpo monoclonal M2 dirigido contra FLAG. Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo de conejo dirigido contra inmunoglobulina de ratón (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) seguido del complejo de anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra fosfatasa alcalina y fosfatasa alcalina (DakoCytomation). Como sustrato de la fosfatasa se usó Fast Red (Sigma) y las secciones se tiñeron con hematoxilina (Sigma) como contraste.

45 [0147] Todas las secciones se montaron con Glycergel (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) y se analizaron con un microscopio Axiovert S100 TV (Carl Zeiss, Feldbach, Suiza) mediante el software Axiovision (Carl Zeiss).

Reconocimiento específico *in vivo* con un anticuerpo dirigido contra ED-A

50 [0148] El anticuerpo parental scFv dirigido contra ED-A se marcó con el derivado fluoróforo infrarrojo éster de succinimidilo de ácido carboxílico, Alexa Fluor 750, disponible comercialmente (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del proveedor. El anticuerpo marcado se separó del colorante sin reaccionar por filtración en gel mediante una columna PD-10 (GE Healthcare). El grado de marcado, estimado de acuerdo con el protocolo de marcado de Invitrogen, fue de cinco moléculas de colorante por molécula de anticuerpo. El anticuerpo parental scFv dirigido contra ED-A marcado con Alexa 750 (en una concentración final de 0,3 mg/ml) se inyectó (200 µl/ratón, es decir, 60 µg de anticuerpo por ratón) en la vena de la cola de ratones Sv190, tres semanas después de la inyección de células tumorales F9DR. Los órganos de los ratones se extirparon seis horas después de la inyección del anticuerpo marcado y se obtuvieron imágenes con un aparato de obtención de imágenes de fluorescencia infrarroja de fabricación propia (Birchler y col. 1999) equipado con una lámpara halógena de tungsteno, filtros de excitación y emisión específicos para Alexa 750 y una cámara CCD monocromática.

60 Biodistribución del diacuerpo F8

[0149] El diacuerpo F8 comprende los mismos dominios VH y VL que el anticuerpo F8 dirigido contra ED-A, por ejemplo, según se emplea en formato scFv. El diacuerpo F8 y el anticuerpo scFv F8 dirigido contra ED-A tienen diferentes secuencias enlazantes entre los dominios VH y VL. La secuencia aminoacídica del enlazante del

diacuerpo F8 es GSSGG (SEQ ID NO: 28) (secuencia nucleotídica: gggccagtagcgg (SEQ ID NO: 29)). Por lo tanto, la secuencia enlazante del diacuerpo F8 tiene una longitud de cinco aminoácidos, mientras que en el scFv F8 dirigido contra ED-A, el enlazante tiene una longitud de 20 aminoácidos (véase SEQ ID NO: 11). La reducción de la longitud del enlazante entre los dominios VL y VH significa que se favorece el apareamiento intermolecular, más que intramolecular entre los dominios VL y VH. En consecuencia, es más probable el apareamiento del dominio VL de un polipéptido F8 con el dominio VH de otro polipéptido F8, que el apareamiento con el dominio VH del mismo polipéptido F8.

5 [0150] El diacuerpo F8 se expresó en células TG1 de *E. coli* de la manera siguiente: el ADN codificante del diacuerpo F8 se introdujo en células TG1 de *E. coli* por electroporación. Las células de *E. coli* electroporadas se precultivaron en 10 ml de medio 2YT, Amp, glucosa al 1%. El precultivo se diluyó 1:100 en 800 ml de medio 2YT, Amp, glucosa al 0,1% y el cultivo se incubó hasta alcanzar una densidad (DO₆₀₀) de 0,6. La expresión del diacuerpo F8 se indujo entonces con IPTG 1 mM.

10 [0151] El diacuerpo F8 expresado se marcó con ¹²⁵I de la manera siguiente: a un tubo de Iodogen (recubierto con 50 µl de Iodogen, 0,1 mg/ml en cloroformo) se añadieron 10 µl de PBS estéril, a lo que siguió la adición de 2 µl de ¹²⁵I yoduro de sodio (~200 µCi) y una incubación a temperatura ambiente (TA) durante 5 min.

15 [0152] Despues se añadieron al tubo de Iodogen 400 µl del diacuerpo F8 a una DO de 0,2 (~60 µg) y se incubó a TA durante 25 min. Se recogió 1/100 de esta mezcla para medir la radiactividad contenida en la mezcla (denominada "INPUT"). El diacuerpo F8 marcado se cargó después en una columna cromatográfica de exclusión por tamaños (PD10: Sephadex G-25M, GE Healthcare) con el fin de separar el diacuerpo yodado F8 del yodo libre. Se midió la radiactividad del diacuerpo F8 yodado recogido y el porcentaje de yodo incorporado en el diacuerpo F8 se calculó (CPM (cuentas por minuto) de diacuerpo F8 yodado / CPM INPUT) como del 30-40%.

20 [0153] Cuatro ratones con tumores de células F9 se pusieron en lugol durante dos días (600 µl en 300 ml) con el fin de bloquear la tiroides y a cada uno de los ratones se les inyectaron por vía intravenosa 200 µl del diacuerpo F8 yodado (aproximadamente 5-8 µg de diacuerpo F8 yodado (18 µCi) por ratón). Despues de 24 horas, los ratones se sacrificaron y se extirparon tumores, hígado, pulmón, bazo, riñones, intestino y cola y se extrajo la sangre (denominados colectivamente en este documento en este contexto como "tejidos" de ratón) y se usaron para el conteo radiactivo. El nivel de radiactividad en cada muestra de tejido se midió mediante un contador de rayos y Perkin. El resultado ("output") se calculó por división del porcentaje de la dosis inyectada (en CPM) entre el peso del tejido (en gramos) (% DI/g).

35 RESULTADOS

Identificación de proteínas y variantes de corte y empalme expresadas diferencialmente

40 [0154] La metodología química proteómica a base de perfusión usada para el análisis comparativo de las proteínas accesibles en el hígado y en metástasis de células F9 en el hígado (Terrana y col. 1987) se muestra en la figura 1A. Estos tumores desarrollan grandes focos metastásicos en la superficie y el interior del hígado de ratón (Figura 1B). Los ratones con tumores se perfundieron, con anestesia terminal, con 15 ml de una disolución de 6-[biotinamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo 1,8 mM (1 mg/ml) en PBS, pH 7,4, enriquecida con dextrano-40 al 10%, como expansor de plasma. El procedimiento, que típicamente duró diez minutos, permitió la eliminación de la sangre de todos los órganos de la circulación principal y la biotinilación selectiva de las proteínas accesibles en los lados tanto luminal como abluminal de los vasos sanguíneos. Prácticamente, todos los vasos sanguíneos de las metástasis de células F9 en el hígado se marcaron eficaz y selectivamente con este procedimiento, según confirma la tinción inmunohistoquímica con un conjugado de estreptavidina y fosfatasa alcalina (figura 1C). En el hígado normal, los vasos sanguíneos se tiñeron intensamente, pero también se detectó el marcado de algunos sinusoides, lo que es compatible con la función fisiológica de filtro del hígado (figura 1C). La biotinilación *in vivo* se detuvo por perfusión con una disolución que contenía aminas primarias. Posteriormente, se extirparon muestras de las metástasis del hígado, que se homogeneizaron y se usaron para la recuperación de proteínas biotiniladas en presencia del fuerte detergente SDS por cromatografía de afinidad en resina con estreptavidina (figura 1A). Con el fin de minimizar el riesgo de difusión de las proteínas metastásicas en el hígado del huésped, se usó el hígado de ratones sanos biotinilados *in vivo* para el estudio de la vasculatura del hígado normal. El uso del hígado del huésped de ratones con tumores de células F9 también habría sido problemático debido al poco tejido residual sano y porque habría sido difícil excluir macroscópicamente la ausencia de micrometástasis. En total, para el análisis proteómico se usaron muestras de siete ratones sanos biotinilados *in vivo* y nueve ratones con tumores de células F9 biotinilados *in vivo*. Además, se usaron muestras de dos ratones sanos y tres con metástasis no biotinilados como controles negativos. Mediante procedimientos de lavado restrictivo y digestión tríptica sobre resina de las proteínas capturadas por estreptavidina de metástasis de células F9 y de hígado normal (procesados en paralelo) se obtuvo una colección de péptidos que pudieron separarse, identificarse y compararse mediante nano-HPLC y procedimientos de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Roesli y col. 2006).

[0155] En total, se identificaron 1.291 péptidos diferentes (intervalo de confianza de MASCOT > 95%) que fueron agrupados por el software MASCOT en 480 conjuntos de péptidos diferentes. Algunos de estos conjuntos de péptidos también se encontraron en las muestras de los controles negativos de los ratones sin biotinilar (como carboxilasas que contienen biotina endógena como cofactor, queratinas como contaminantes o proteínas muy abundantes como seroalbúmina). De los restantes 435 conjuntos de péptidos identificados, 331 pudieron ser asignados por el software MASCOT sin ambigüedad a una única proteína, mientras que 104 conjuntos de péptidos se asignaron a varias proteínas (358 en total). En la mayoría de los casos, las varias proteínas asignadas al mismo conjunto de péptidos pertenecen a una familia de proteínas relacionadas (por ejemplo, inmunoglobulinas) o pueden ser incluso las mismas proteínas con diferentes números de acceso en las bases de datos. De los 435 conjuntos de péptidos diferentes, 117 se encontraron exclusivamente en muestras de metástasis, 193 solo en muestras de hígado sano y 125 en los dos tipos de tejidos. Por ejemplo, se encontraron péptidos que corresponden a la fibronectina (Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), número de acceso P11276) en cuatro muestras de hígado sano y ocho muestras de metástasis.

[0156] Las proteínas encontradas en las muestras de hígado sano y en las de metástasis (por ejemplo, fibronectina) pueden estar presentes en cantidades sustancialmente diferentes en las dos muestras. Si este fuera el caso, debería reflejarse en el número de muestras en que se detectaron las proteínas y/o en el número de péptidos (así como en la intensidad de la señal de los péptidos normalizada (Scheurer y col. 2005) observado en las muestras de hígado y de metástasis. Por ejemplo, 38 péptidos tripticos de fibronectina (NCBI, número de acceso P11276) se encontraron solo en muestras de metástasis, mientras que un péptido se encontró solo en las muestras de hígado sano. Once péptidos se encontraron en los dos tipos de muestras.

[0157] La notable abundancia de péptidos derivados de fibronectina detectados en las metástasis del hígado, a pesar del hecho de que el hígado es el lugar de biosíntesis de la fibronectina, nos impulsó a investigar diferencias en la abundancia relativa de los péptidos derivados de la fibronectina y la expresión en exceso de los dominios de corte y empalme alternativo. La tabla 1 resume todos los péptidos de fibronectina identificados en el análisis proteómico. La fibronectina de ratón contiene dos dominios globulares extra del tipo III que pueden experimentar un corte y empalme alternativo: ED-A y ED-B (ffrench-Constant 1995, Hynes 1990, Kaspar y col. 2006). Además, el segmento IIICS experimenta distintos patrones de corte y empalme en ratones y en humanos. De manera interesante, los tres péptidos derivados de ED-A, así como el péptido derivado de IIICS se observaron solo en las muestras tumorales.

[0158] Los péptidos derivados de ED-B no serían visibles en este análisis, ya que ED-B no contiene ningún resto de lisina y las dos argininas dan lugar a péptidos de un tamaño demasiado grande para su detección. La figura 2A muestra la localización de los péptidos identificados en las muestras tumorales (tumor) y en muestras de hígado sano (normal) en la estructura de dominios de la fibronectina. La figura 2B muestra la intensidad relativa de las señales de EM normalizadas para dos péptidos derivados de la fibronectina: IAWESPQGQVSR (SEQ ID NO: 16), que se localiza dentro del dominio ED-A y FLTTTPNSLLVSWQAPR (SEQ ID NO: 15), que se localiza en el dominio 14. Este último péptido fue más abundante en las muestras de metástasis, pero fue claramente detectable también en el hígado sano correspondiente. En contraste, los péptidos derivados de ED-A mostraron señales intensas en las muestras de metástasis, pero no fueron detectables en absoluto (es decir, una señal más de 100 veces inferior) en el hígado normal.

Inmunohistoquímica

[0159] La diferenciación más notable entre las estructuras hepáticas y la neovasculatura metastásica se observó para los dominios ED-A y ED-B de la fibronectina. En ambos casos se observó una tinción intensa y específica de los vasos sanguíneos metastásicos, mientras que el hígado normal y prácticamente todos los órganos normales (con excepción del endometrio en la fase proliferativa y algunos vasos de los ovarios) dieron resultado negativo en este análisis inmunohistoquímico (figura 3A). De manera importante, también se encontró que el ED-A se expresaba en gran medida en la neovasculatura de metástasis en el pulmón y en el hígado humanos (figura 3B).

*Reconocimiento específico *in vivo**

[0160] Con el fin de comprobar la utilidad de ED-A como diana para el reconocimiento vascular específico de metástasis basado en ligandos, se llevó a cabo un experimento de reconocimiento específico *in vivo* con la obtención de imágenes fluorescentes en el infrarrojo cercano. El anticuerpo parental scFv dirigido contra ED-A se marcó con Alexa Fluor 750 y se inyectó por vía intravenosa en ratones con metástasis de células F9. La obtención de imágenes fluorescentes en el infrarrojo cercano de los órganos extirpados reveló una notable acumulación del agente de reconocimiento en las lesiones metastásicas (figura 3B).

Selección de anticuerpos dirigidos contra ED-A

[0161] El análisis BIACore produjo un gráfico para cada anticuerpo dirigido contra ED-A que se analizó para deducir la afinidad de un anticuerpo por el antígeno de la manera siguiente: el eje x de cada gráfico corresponde al tiempo y el eje y corresponde a las unidades de resonancia (una medida que indica la afinidad de unión del anticuerpo ensayado por el antígeno que recubre el chip BIACore). Cada uno de los gráficos mostró 3 picos y una depresión, correspondientes a los cambios de tampón y por lo tanto irrelevantes para la interpretación de los resultados.

[0162] La parte ascendente de cada gráfico representa la fase de asociación. Cuanto más empinada es la curva en esta parte del gráfico, más rápida es la asociación del anticuerpo con el antígeno. La parte descendente de cada gráfico representa la fase de disociación del anticuerpo del antígeno. Cuanto más plana es la curva en esta parte del gráfico, más lenta es la disociación del anticuerpo del antígeno.

[0163] Los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 dirigidos contra ED-A mostraron todos una curva de disociación más plana que el anticuerpo parental dirigido contra ED-A del que derivan, lo que indica que se unen a ED-A, y por tanto, también a la A-FN, con una mayor afinidad que el anticuerpo parental dirigido contra ED-A. Los gráficos para los anticuerpos E5, F1, F8 y H1 mostraron las curvas de disociación más planas de todos los anticuerpos dirigidos contra ED-A ensayados. Las curvas de asociación de los anticuerpos H1, C5, D5, E5, C8, F8 y F1 fueron más planas que las observadas para el anticuerpo parental dirigido contra ED-A, mientras que la curva de asociación observada para los anticuerpos B2, B7, E8 y G9 fue tan empinada como la curva de asociación observada para el anticuerpo parental dirigido contra ED-A. Sin embargo, dado que para el análisis BIACore de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 se usaron sobrenadantes bacterianos de células TG-1 de *E. coli* inducidas por IPTG, la concentración de las muestras de anticuerpo ensayadas era desconocida, aunque probablemente inferior a la concentración de la muestra del anticuerpo parental dirigido contra ED-A usada como comparación. En consecuencia, las curvas de asociación de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 pueden ser artificialmente bajas, debido a la baja concentración de anticuerpo en las muestras usadas para el análisis BIACore. Sin embargo, dado que la concentración no afecta significativamente a la disociación de un anticuerpo de su antígeno diana en el análisis BIACore, las curvas de disociación planas observadas para los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 muestran que estos anticuerpos se unen a ED-A con una afinidad al menos igual, y probablemente mayor, que el anticuerpo parental dirigido contra ED-A. Por consiguiente, es más que probable que los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 dirigidos contra ED-A produzcan los mismos o mejores resultados al usarlos en los mismos estudios *in vivo* e inmunohistoquímicos llevados a cabo con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A según se describen en otra parte de este documento. Por lo tanto, los datos *in vivo* e inmunohistoquímicos obtenidos con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A proporcionan evidencia de que los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 dirigidos contra ED-A pueden usarse para el tratamiento de metástasis tumorales.

Análisis BIACore 2

[0164] Los valores de k_{on} , k_{off} y K_D para cada anticuerpo dirigido contra ED-A se evaluaron mediante el software BIevaluation. Los valores de k_{on} , k_{off} y K_D del anticuerpo parental dirigido contra ED-A y de los anticuerpos B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 dirigidos contra ED-A para el antígeno 11A12 se detallan en la tabla 3. Los anticuerpos B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 dirigidos contra ED-A tienen todos mejores valores de K_D para el antígeno 11A12 que el anticuerpo parental dirigido contra ED-A del que derivan, lo que indica que se unen a ED-A, y por tanto a la A-FN con una mayor afinidad que el anticuerpo parental dirigido contra ED-A. Por consiguiente, es más que probable que los anticuerpos B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 dirigidos contra ED-A produzcan los mismos o mejores resultados al usarlos en los mismos estudios *in vivo* e inmunohistoquímicos llevados a cabo con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A según se describen en otra parte de este documento. Por lo tanto, los datos *in vivo* e inmunohistoquímicos obtenidos con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A proporcionan evidencia de que los anticuerpos B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 dirigidos contra ED-A pueden usarse para el tratamiento de metástasis tumorales.

Biodistribución del diacuerpo F8

[0165] El porcentaje (%) de la dosis inyectada (DI) del diacuerpo F8 marcado con ^{125}I (yodado) detectado por gramo (g) de tejido de ratón fue muy similar para el hígado, pulmón, bazo, corazón, riñón, intestino, cola y sangre y todos, con excepción del riñón, mostraron menos del 2% DI/g (figura 8). Por el contrario, los tumores de células F9 contenían como media aproximadamente cuatro veces más de la DI que cualquiera de los otros tejidos de ratón analizados (figura 8). Esto demuestra que el diacuerpo F8 reconoce específica y selectivamente los tumores de células F9 de ratón. El porcentaje de la DI detectado en los otros tejidos representa muy probablemente una carga de fondo del diacuerpo F8 presente en los ratones o el marcado inespecífico de los otros tejidos de ratón. Según se describe en otra parte de este documento, el experimento de biodistribución se llevó a cabo con cuatro ratones y aunque el porcentaje de la DI detectado por tejido de ratón fue variable (véanse las barras de error en la figura 8), el porcentaje del diacuerpo F8 detectado en los tumores de células F9 fue consistentemente mayor que en cualquiera de los otros tejidos de ratón ensayados.

[0166] El estudio de biodistribución se realizó con tumores de células F9 primarios y los resultados indican que los anticuerpos dirigidos contra ED-A de acuerdo con la presente invención reconocen específica y selectivamente el tejido tumoral *in vivo*. Los resultados ofrecen una indicación adicional de que los anticuerpos dirigidos contra ED-A de la presente invención pueden usarse para alcanzar los mismos o mejores resultados al usarlos en los mismos estudios *in vivo* e inmunohistoquímicos llevados a cabo con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A según se describen en otra parte de este documento.

10 **Secuenciación**

[0167] Los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 dirigidos contra ED-A son todos anticuerpos scFv y se secuenciaron mediante procedimientos convencionales. La secuencia nucleotídica del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A se muestra en la figura 6. La secuencia aminoacídica del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A se muestra en la figura 7.

[0168] Las secuencias nucleotídicas preferidas que codifican los dominios VH y/o VL de los anticuerpos B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 dirigidos contra ED-A son idénticas a las secuencias nucleotídicas codificantes de VH y/o VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque las secuencias nucleotídicas que codifican las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) de H1 están sustituidas por las secuencias nucleotídicas que codifican las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) indicadas en la tabla 2, para el anticuerpo respectivo.

[0169] Algunas secuencias nucleotídicas preferidas que codifican los dominios VH y/o VL del diacuerpo F8 dirigido contra ED-A son idénticas a las secuencias nucleotídicas que codifican los dominios VH y/o VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque las secuencias nucleotídicas que codifican las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) de H1 están sustituidas por las secuencias nucleotídicas que codifican las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) indicadas en la tabla 2 para el diacuerpo F8 dirigido contra ED-A. Una secuencia nucleotídica preferida que codifica el enlazante que enlaza los dominios VH y VL del diacuerpo F8 dirigido contra ED-A es gggccagtgccgt (SEQ ID NO: 29).

[0170] Los anticuerpos B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 tienen secuencias aminoacídicas idénticas a la del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque excepto porque las secuencias aminoacídicas de las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) de H1 están sustituidas por las secuencias aminoacídicas de las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) indicadas en la tabla 2, para el anticuerpo respectivo. Las secuencias aminoacídicas de los dominios VH y VL del diacuerpo F8 dirigido contra ED-A son idénticas a las secuencias aminoacídicas del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque las secuencias aminoacídicas de las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) de H1 están sustituidas por las secuencias aminoacídicas de las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) indicadas en la tabla 2 para el diacuerpo F8 dirigido contra ED-A y la secuencia aminoacídica del enlazante en H1 está sustituida por la secuencia aminoacídica enlazante GSSGG (SEQ ID NO: 28).

40 La secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo B2 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 21) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 23.

[0171] La secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo C5 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 41) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 43.

[0172] La secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo D5 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 51) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 53.

[0173] La secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo E5 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 61) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 63.

[0174] La secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo C8 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 71) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 73.

[0175] La secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo F8 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 81) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 83. Los dominios VH del diacuerpo F8 dirigido contra ED-A tienen la misma secuencia aminoacídica que el dominio VH del anticuerpo scFv F8 dirigido contra ED-A (es decir, SEQ ID NO: 81).

- 5 [0176] La secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo F1 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 91) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 93.
- 10 [0177] La secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo B7 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 101) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 103.
- 15 [0178] La secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo E8 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 111) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 113.
- 20 [0179] La secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo G9 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 31) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 33.
- 25 [0180] La secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo B2 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 22) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 26.
- 30 [0181] La secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo C5 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 42) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 46.
- 35 [0182] La secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo D5 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 52) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 56.
- 40 [0183] La secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo E5 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 62) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 66.
- 45 [0184] La secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo C8 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 72) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 76.
- 50 [0185] La secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo F8 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 82) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 86. Los dominios VL del diacuerpo F8 dirigido contra ED-A tienen la misma secuencia aminoacídica que el dominio VL del anticuerpo F8 dirigido contra ED-A (es decir, SEQ ID NO: 82).
- 55 [0186] La secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo F1 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 92) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 96.
- 60 [0187] La secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo B7 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 102) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 106.
- 65 [0188] La secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo E8 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 112) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 116.
- 70 [0189] La secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo G9 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 32) es idéntica a la secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 36.
- 75 [0190] Opcionalmente, el aminoácido en la posición 5 del dominio VH de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 dirigidos contra ED-A puede ser un resto de leucina (L), más bien que un resto de valina (V), según se muestra en la figura 7A. Además o alternativamente, el aminoácido en la posición 18 del dominio VL de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 puede ser un resto de arginina (R), más bien que un resto de lisina (K), según se muestra en la figura 7C.

REFERENCIAS

[0191] Todas las referencias citadas en algún punto de esta memoria descriptiva, incluidas aquellas citadas en algún punto anteriormente.

- 5 Amit y col. (1986), *Science*, 233: 747-753.
 Andersen y col. (2002) *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 117.
 Ausubel y col. (1999) 4^a edición, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons.
- 10 Bagshawe K. D. y col. (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals*, 4: 915-922.
 Balza y col. (1988), *FEBS Lett.*, 228: 42-44.
 Birchler y col. (1999), *J. Immunol. Methods*, 231: 239-248.
 Bird y col. (1988) *Science*, 242: 423-426.
 Borsi y col. (1987), *J. Cell. Biol.*, 104, 595-600.
- 15 Borsi y col. (1990), *FEBS Lett.*, 261: 175-178.
 Borsi y col. (1995), *J. Biol. Chem.*, 270: 6243-6245.
 Borsi y col. (1998), *Exp. Cell Res.*, 240: 244-251.
 Brack y col. (2006), *Clin. Cancer Res.*, 12: 3200-3208.
 Carnemolla y col. (1989), *J. Cell. Biol.*, 108: 1139-1148.
- 20 Caton y col. (1990), *J. Immunol.*, 144: 1965-1968.
 Chadd y col. (2001), *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 188-194.
 Chothia y col. (1987), *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917.
 Chothia y col. (1989), *Nature*, 342: 877- 883.
 Devos y col. (1983), *Nucl. Acids Res.*, 11: 4307-4323.
- 25 ffrench-Constant (1995), *Exp. Cell Res.*, 221: 261-271.
 Giovannoni (2001), *Nucleic Acids Research*, 29(5): E27.
 Glennie M. J. y col., (1987), *J. Immunol.*, 139: 2367-2375
 Haan y col. (2004), *BioCentury*, 12(5): A1-A6.
 Hanahan y col. (2000), *Cell*, 100: 57-70.
- 30 Harlow y Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pág. 726.
 Kornblith y col. (1984), *Nucleic Acids Res.*, 12: 5853-5868.
 Heikinheimo y col. (1991), *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, 61: 101-109.
- 35 Holliger y Bohlen (1999), *Cancer and metastasis rev.*, 18: 411-419.
 Holliger y col. (1993a), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448.
 Holliger y col. (1993b), *Current Opinion Biotechnol.*, 4: 446-449.
 Holt y col. (2003), *Trends in Biotechnology*, 21: 484-490.
 Hoogenboom y col. (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19(15): 4133-7.
- 40 Hu y col. (1996), *Cancer Res.*, 56, 3055-3061.
 Huston y col. (1988), *PNAS USA*, 85: 5879-5883.
 Hynes, R. O. (1990), *Fibronectins* (Nueva York: Springer-Verlag).
 Jacobs y col. (2002), *Hum. Pathol.*, 33: 29-38.
 Kabat y col. (1987), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4^a edición. US Department of Health and Human Services.
- 45 Kabat y col. (1991a), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a edición. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington. (a)
 Kabat y col. (1991b), *J. Immunol.*, 147: 1709-1719.
 Kaspar y col. (2006), *Int. J. Cancer*, 118: 1331-1339.
- 50 Knappik y col. (2000), *J. Mol. Biol.*, 296: 57-86.
 Kohler y Milstein, (1975), *Nature*, 256: 495-497.
 Koide y col. (1998), *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151.
 Kontermann y col. (2001), *S, Antibody Engineering*, Springer-Verlag Nueva York, LLC; ISBN: 3540413545.
- 55 Koukoulis y col. (1993), *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 25: 285-295.
 Koukoulis y col. (1995), *Ultrastruct. Pathol.*, 19: 37-43.
 Krebs y col. (2001), *Journal of Immunological Methods*, 254: 67-84.
 Larrick J. W. y Thomas D. W. (2001), *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 411-418.
- 60 Ledermann J. A. y col. (1991), *Int. J. Cancer*, 47: 659-664
 Lohi y col. (1995), *Int. J. Cancer*, 63: 442-449.
 Maeda y col. (1983), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 115: 1040-1047.
 Matsumoto y col. (1999), *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 320-325.
 McCafferty y col., (1990), *Nature*, 348: 552-554.
 Mendez, M. y col., (1997), *Nature Genet*, 15(2): 146-156.
 Merchand y col. (1998), *Nature Biotech.*, 16: 677-681.
 Neri D. y Bicknell R. (2005), *Nat. Rev. Cancer*, 5: 436-446.

- Nygren y col. (1997), Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469.
Oyama y col. (1989), J. Biol. Chem., 264: 10331-10334.
Paoletta y col. (1988), Nucleic Acids Res. 16: 3545-3557.
Pini y col. (1998), J. Biol. Chem., 273 : 21769-21776.
5 Pluckthun (1991), Bio/Technology 9: 545-551.
Reiter y col. (1996), Nature Biotech, 14: 1239-1245.
Repp y col. (1995), J. Hemat., 377-382.
Ridgway y col. (1996), Protein Eng., 9: 616-621.
Robinson ed., (1978), Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
10 Roesli y col. (2006), Nature Protocols, 1: 192-199.
Ruf y col. (1991), J. Biol. Chem., 226: 15719-15725.
Rybak y col. (2005), Nat. Methods, 2: 291-298.
Rybak y col. (2006), ChemMedChem., 2: 22-40.
15 Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Scarpati y col. (1987), Biochemistry 26: 5234-5238.
Scarpino y col. (1999), J. Pathol., 188: 163-167.
Scheurer y col. (2005), Proteomics, 5: 3035-3039.
20 Segal y col. (1974), PNAS, 71: 4298-4302.
Sharon y col. (1990a), PNAS, 87: 4814-4817.
Sharon y col. (1990b), J. Immunol., 144: 4863-4869.
Silacci y col. (2003), Proteomics, 5: 2340-2350.
Staerz U. D. y Bevan M. J. (1986), PNAS, 83.
25 Suresh y col. (1986), Methods Enzymol. 121: 210-228.
Taniguchi y col. (1983), Nature, 302: 305-310;
Tavian y col. (1994), Int. J. Cancer, 56: 820-825.
Terrana y col. (1987), Cancer Res., 47: 3791-3797.
Thorpe (2004), Clin. Cancer Res., 10: 415-427.
30 Trachsel y col. (2006), Adv. Drug Deliv. Rev., 58: 735-754.
Viti y col. (2000), Methods Enzymol., 326: 480-505.
Ward y col. (1989), Nature, 341: 544-546.
Wess (2004), en: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42): A1-A7.

Tabla 1

Péptidos de la fibronectina identificados en hígado normal y/o en metástasis

Secuencia peptídica	Posición de la secuencia		¹Hígado (total = 6)	¹Metástasis (total = 8)
	Inicio	Final		
HYQINQQWER	59	68		6
VGDTYERPK	109	117		4
HALQSASAGSGSFTDVR	274	290		7
IGDQWDK	480	486		1
TFYQIGDSWEK	568	578	1	
WKEATIPGHLNSYTIK	654	669		2
EATIPGHLNSYTIK	656	669		1
GLTPGVIYEGQLISIQQYGH	670	690		7
WSRPQAPITGYR	830	841	2	3
SDNVPPPTDLQFVELTDVK	903	921		3
VTIMWTPPDSVSGYR	922	937		8
VEVLPVSLPGEHGQ	938	952		8
NTFAEITGLSPGVTYLFK	958	975		7
VFAVHQGR	976	983		7
TVLVTWTPPR	1011	1020	2	8
QYNVGPLASK	1040	1049		4
NLQPGSEYTVTLVAVK	1054	1069		6
ATGVFTTLQPLR	1077	1088	1	8
LGVRPSQGEAPR	1116	1128		7
VVTPLSPPTNLHLEANPDTGVLTWSWER	1169	1196		3
STTPDITGYR	1197	1206		7
VTNAPPPSIELTNLLVR	1375	1391	2	7
TGLDSPTGFDSSDITANSFTVHWVAPR	1446	1472		4
APITGYIIR	1473	1481	1	8
HHAEHSVGRPR	1482	1492		1
EESPPLIGQQATVSDIPR	1525	1542		8
ITYGETGGNSPVQEFTVPGSK	1570	1590	2	8
SPVQEFTVPGSK	1579	1590		6
STATINNIKPGADYTTLYAVTGR	1591	1614		5
GDSPASSKPVSNYK	1615	1629		4
TEIDKPSQMVTVDQDNSISVR	1630	1651		8
WLPSTSPVTGYR	1652	1663		7
TASPDQTEMIEGLQPTVEYVVSVYAQNR	1679	1707		7
² NGESQPLVQTAVTIIPAPTNLK	1708	1819		3
³ NGESQPLVQTAVTNIDRPK	1708	1726		1
³ IAWESPQQVSR	1740	1751		8
³ VTYSSPEDGIR	1754	1764		1
FSQVTPTSFTAQWIAPSQVLTGYR	1820	1843	1	5
YEVSVYALK	1878	1886		2
TKTETITGFQVDAIPANGQTPVQR	1926	1949	1	2
TETITGFQVDAIPANGQTPVQR	1928	1949		3
SYTITGLQPGTDYK	1957	1970		7
IHYTLNDNAR	1971	1981		7
SSPVIIDASTAIDAPSNLR	1982	2000	3	8
FLTTTPNSLLVSWQAPR	2001	2017	4	5
ITGYIIR	2020	2026		5
YEKPGSPPR	2027	2035		6
⁴ PYLPNVDEEVQIGHVPR	2165	2181		7
GVTYNIIIVEALQNQR	2255	2269	4	7
RPGAAEPSPDGTGHTYNQYTQR	2425	2447		2

¹Los números indican en cuántos de los seis ratones sanos biotinilados *in vivo* o los ocho ratones con metástasis biotinilados *in vivo* se identificó el péptido en las correspondientes muestras de tejido. Se incluyen aquí todos los péptidos identificados mediante el software MASCOT para los códigos de acceso en la base de datos para fibronectina P11276, Q3UHL6 o Q3TCF1.

²Este péptido cubre una porción de secuencia de la fibronectina antes Y después del dominio ED-A, lo que indica la presencia de una isoforma (EDA⁺) de la fibronectina.

³Estos péptidos corresponden a la secuencia del dominio ED-A (posiciones en la secuencia 1721-1810).

⁴Este péptido corresponde a la secuencia del segmento IIICs (posiciones en la secuencia 2082-2201).

Tabla 2

Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las CDR1 de la cadena pesada (VH) y la cadena ligera (VL) de los anticuerpos dirigidos contra ED-A de afinidad madurada						
Anticuerpo	CDR1 (VH)			CDR2 (VL)		
H1	CCG P	CGG R	AGG R (SEQ ID NO:3)	TCT S	GCG A	TGG W (SEQ ID NO: 6)
B2	GCG A	GCT A	AAG K (SEQ ID NO: 23)	GTG V	GCT V	TTT F (SEQ ID NO: 26)
C5	CCG P	ATT I	ACT T (SEQ ID NO: 43)	TTG L	CAT H	TTT F (SEQ ID NO: 46)
D5	GTG V	ATG M	AAG K (SEQ ID NO: 53)	AAT N	GCT A	TTT F (SEQ ID NO: 56)
E5	ACT T	GGT G	TCT S (SEQ ID NO: 63)	CTT L	GCG A	CAT H (SEQ ID NO: 66)
C8	CTT L	CAG Q	ACT T (SEQ ID NO: 73)	CTT L	CTT P	TTT F (SEQ ID NO: 76)
F8	CTG L	TTT F	ACG T (SEQ ID NO: 83)	ATG M	CCG P	TTT F (SEQ ID NO: 86)
F1	TAG Q (ámbar)	GCG A	CGT R (SEQ ID NO: 93)	GCG A	CCT P	TTT F (SEQ ID NO: 96)
B7	CAT H	TTT F	GAT D (SEQ ID NO: 103)	CTG L	GCT A	TTT F (SEQ ID NO: 106)
E8	GAT D	ATG M	CAT H (SEQ ID NO: 113)	TCG S	TCT S	TTT F (SEQ ID NO: 116)
G9	CAT H	ATG M	CAG Q (SEQ ID NO: 33)	ACT T	GCT A	TTT F (SEQ ID NO: 36)

5

Tabla 3

Datos de evaluación de BIACore			
Anticuerpo	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
Anticuerpo parental dirigido contra ED-A	$2,5 \times 10^5$	0,02	$\sim 1 \times 10^{-7}$
B2	$3,8 \times 10^5$	$7,54 \times 10^{-3}$	$\sim 2 \times 10^{-8}$
C5	$3,04 \times 10^5$	$9,23 \times 10^{-3}$	$\sim 3 \times 10^{-8}$
D5	$4,53 \times 10^5$	$7,6 \times 10^{-3}$	$\sim 1,7 \times 10^{-8}$
C8	$3,8 \times 10^5$	$5,3 \times 10^{-3}$	$\sim 1,4 \times 10^{-8}$
F8	$4,65 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-3}$	$\sim 3,1 \times 10^{-9}$
B7	$2,67 \times 10^5$	$4,5 \times 10^{-3}$	$\sim 1,68 \times 10^{-8}$
G9	$3,6 \times 10^5$	$7,54 \times 10^{-3}$	$\sim 2,09 \times 10^{-8}$

LISTADO DE SECUENCIAS

10

[0192]

15

<110> Philogen S.p.A.; Neri, Dario; Rybak, Jascha; Roesli, Christoph; Villa, Alessandra; Neri, Giovanni

20

<120> Un nuevo antígeno asociado con la neovasculatura de metástasis tumorales

<130> SMWFP6530604

25

<150> US 60/909.580

<151> 02-04-2007

<150> US 60/948.564

<151> 09-04-2007

25

<160> 193

<170> PatentIn, versión 3.3

5 <210> 1
 <211> 118
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la cadena pesada (VH) del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A
 <400> 1

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1															15

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Pro	Arg
															30

Arg	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
															45

Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
															60

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
															65

65				70							75				80
----	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--	----	--	--	--	----

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
															85

															90
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

															95
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Ala	Lys	Ser	Thr	His	Leu	Tyr	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
															100

															105
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-----

															110
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-----

Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
															115

15 <210> 2
 <211> 125
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la cadena ligera (VL) del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

5 <400> 2

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1															15

Glu	Lys	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ala
															30
			20						25						

Trp	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
															45
					35			40							

Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
															60
					50			55							

Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
															80
					65			70		75					

Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Met	Arg	Gly	Arg	Pro
															95
						85			90						

Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu
															110
						100			105						

Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala		
					115			120		125				

10 <210> 3

<211> 3

<212> Proteína

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

<400> 3

Pro Arg Arg

1

5 <210> 4
 <211> 6
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

 <400> 4

Ser Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

15
<210> 5
<211> 6
<212> Proteína
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A
25
<400> 5

See The His Ley Tyr Ley

1

30 <210> 6
<211> 3
<212> Proteína
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

40 <400> 6

Ser Ala TRP

1

45 <210> 7
<211> 7
<212> Proteína
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

55 <400> 7

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 8

<211> 6

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

<400> 8

Met Arg Gly Arg Pro Pro

1 5

15

<210> 9

<400> 9

000

20

<210> 10

<400> 10

000

25

<210> 11

<211> 20

<212> Proteína

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la secuencia enlazante del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

35 <400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

40 <210> 12

<211> 354

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia nucleotídica de la cadena pesada (VH) del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

<400> 12

gaggtgcaga tggtggagtc tgggggaggc ttggcacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc cgcggagga tgagctgggt cgcgcaggct 120
 ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtgta gtggtggtag cacataactac 180
 gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagtact 300
 catttgtatc ttttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc gagt 354

5 <210> 13
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia nucleotídica de la cadena ligera (VL) del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A
 <400> 13

gaaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgttttgt ctccagggga aaaagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc tctgcgtgg tagctggta ccagcagaaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag cagatgcgtg gtccggccgc gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaaggccgc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat 360

15 ctgaatgggg cccatagac tgtgaaa 387

<210> 14
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia nucleotídica de la secuencia enlazante del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

20 <400> 14
 ggcgggtggag gttctggccgg cgggtggcagt ggcgggtggag gttccgggggg tggaggatct 60

<210> 15
 <211> 17
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*

5
 <400> 15

Phe Leu Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Ala Pro
 1 5 10 15

10 <210> 16
 <211> 12
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 16

Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
 1 5 10

20 <210> 17
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia sintética: cebador parcialmente degenerado

<220>
 <221> elemento mixto
 <222> 27, 28, 30, 31, 33, 34
 30 <223> n e s a o g o c o t

<400> 17
 ctggagccctg gccggacccag ctcatmnnmn nmnnngctaaa ggtgaatcca ga 52

35 <210> 18
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia sintética: cebador parcialmente degenerado

<220>
 <221> elemento mixto
 45 <222> 28, 29, 31, 32, 34, 35
 <223> n e s a o g o c o t
 <400> 18
 ccaggttct gctggatcca ggctaaamnnm nnmnngctaa cactctgact ggccctgc 58

50 <210> 19
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Secuencia sintética: cebador LMB3long
 <400> 19
 cagggaaacag ctatgaccat gattac 26

5 <210> 20
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia sintética: cebador fdseqlong

10 <400> 20
gacgttagta aatgaattt ctgtatgagg 30

15 <210> 21
<211> 118
15 <212> Proteína
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo B2 dirigido contra ED-A

20 <400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Ala
20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo B2 dirigido contra ED-A

10

<400> 22

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Val Ala
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 23

<211> 3

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo B2 dirigido contra ED-A

<400> 23

Ala Ala Lys

1

15

<210> 24

<400> 24

000

20

<210> 25

<400> 25

000

25

<210> 26

<211> 3

<212> Proteína

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo B2 dirigido contra ED-A

<400> 26

Val Ala Phe

1

5

<210> 27

<400> 27

000

10

<210> 28

<211> 5

<212> Proteína

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia enlazante del diacuerpo F8

<400> 28

20

Gly Ser Ser Gly Gly

1

5

<210> 29

<211> 15

25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia enlazante del diacuerpo F8

30

<400> 29

gggtccagtg gcgg 15

<210> 30

35

<400> 30

000

<210> 31

40

<211> 118

<212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo G9 dirigido contra ED-A

<400> 31

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Met
 20 25 30

Gln Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 32

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo G9 dirigido contra ED-A

10 <400> 32

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 33

<211> 3

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo G9 dirigido
 10 contra ED-A

<400> 33

His Met Gln

1

5 <210> 34
10 <400> 34
 000
15 <210> 35
 000
20 <210> 36
 <211> 3
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial
25 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo G9 dirigido contra ED-A
30 <400> 36

 Thr Ala Phe
 1
35 <210> 37
40 <400> 37
 000
45 <210> 38
 <400> 38
 000
50 <210> 39
 <400> 39
 000
55 <210> 40
 <400> 40
 000
60 <210> 41
 <211> 118
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial
65 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo C5 dirigido contra ED-A
70 <400> 41

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Ile
 20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 42

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo C5 dirigido contra ED-A

10

<400> 42

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu His
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 43

<211> 3

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo C5 dirigido contra ED-A

<400> 43

Pro Ile Thr

1

5 <210> 44
10 <400> 44
 000
15 <210> 45
 <400> 45
 000
20 <210> 46
 <211> 3
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial
25 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo C5 dirigido contra ED-A
30 <210> 47
 <400> 47
 000
35 <210> 48
 <400> 48
 000
40 <210> 49
 <400> 49
 000
45 <210> 50
 <400> 50
 000
50 <210> 51
 <211> 118
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial
55 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo D5 dirigido contra ED-A
60 <400> 51

Leu His Phe
1

ES 2 402 171 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Met
20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 52
<211> 125

5 <212> Proteína
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo D5 dirigido contra ED-A

10 <400> 52

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ala
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 53

<211> 3

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo D5 dirigido contra ED-A

<400> 53

Val Met Lys

1

5 <210> 54
5 <400> 54
5 000
10 <210> 55
10 <400> 55
10 000
15 <210> 56
15 <211> 3
15 <212> Proteína
15 <213> Secuencia artificial
20 <220>
20 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo D5 dirigido contra ED-A
25 <210> 57
25 <400> 57
25 000
30 <210> 58
30 <400> 58
30 000
35 <210> 59
35 <400> 59
35 000
40 <210> 60
40 <400> 60
40 000
45 <210> 61
45 <211> 118
45 <212> Proteína
45 <213> Secuencia artificial
50 <220>
50 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo E5 dirigido contra ED-A
50 <400> 61

Asn Ala Phe
1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Gly
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 62

<211> 125

5 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo E5 dirigido contra ED-A

10 <400> 62

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala
 20 25 30

His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 63

<211> 3

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo E5 dirigido
 10 contra ED-A

<400> 63

Thr Gly Ser

1

5 <210> 64
 <400> 64
 000
 10 <210> 65
 <400> 65
 000
 15 <210> 66
 <211> 3
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo E5 dirigido contra ED-A
 25 <210> 67
 <400> 67
 000
 30 <210> 68
 <400> 68
 000
 35 <210> 69
 <400> 69
 000
 40 <210> 70
 <400> 70
 000
 45 <210> 71
 <211> 118
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo C8 dirigido contra ED-A
 <400> 71

Leu Ala His

1

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1	5															

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Gln
 20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 72

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo C8 dirigido contra ED-A

10 <400> 72

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

ES 2 402 171 T3

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 73

<211> 3

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo C8 dirigido contra ED-A

<400> 73

Leu Gln Thr
I

15 <210> 74

<400> 74
000

5 <210> 75
6 <400> 75
7 000
8
9 <210> 76
10 <211> 3
11 <212> Proteína
12 <213> Secuencia artificial
13
14 <220>
15 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo C8 dirigido contra ED-A
16
17 <400> 76
18
19 **Leu Pro Phe**
20 **1**
21
22 <210> 77
23 <400> 77
24 000
25
26 <210> 78
27 <400> 78
28 000
29
30 <210> 79
31 <400> 79
32 000
33
34 <210> 80
35 <400> 80
36 000
37
38 <210> 81
39 <211> 118
40 <212> Proteína
41 <213> Secuencia artificial
42
43 <220>
44 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo F8 dirigido contra ED-A
45
46 <400> 81

ES 2 402 171 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 82

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo F8 dirigido contra ED-A

10 <400> 82

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 83

<211> 3

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo F8 dirigido contra ED-A

10 <400> 83

Leu Phe Thr

1

5 <210> 84
 <400> 84
 000
10 <210> 85
 <400> 85
 000
15 <210> 86
 <211> 3
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial
20 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo F8 dirigido contra ED-A
25 <210> 87
 <400> 87
 000
30 <210> 88
 <400> 88
 000
35 <210> 89
 <400> 89
 000
40 <210> 90
 <400> 90
 000
45 <210> 91
 <211> 118
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial
50 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo F1 dirigido contra ED-A
 <400> 91

Met Pro Phe
1

ES 2 402 171 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Ala
20 25 30

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 92

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo F1 dirigido contra ED-A

10 <400> 92

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ala Pro
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 93

<211> 3

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo F1 dirigido
 10 contra ED-A

<400> 93

Gln Ala Arg

1

5 <210> 94
 <400> 94
 000
10 <210> 95
 <400> 95
 000
15 <210> 96
 <211> 3
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial
20 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo F1 dirigido contra ED-A
25 <210> 97
 <400> 97
 000
30 <210> 98
 <400> 98
 000
35 <210> 99
 <400> 99
 000
40 <210> 100
 <400> 100
 000
45 <210> 101
 <211> 118
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial
50 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo B7 dirigido contra ED-A
 <400> 101

Ala Pro Phe
1

ES 2 402 171 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Phe
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 102
<211> 125

5 <212> Proteína
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo B7 dirigido contra ED-A

10 <400> 102

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 103

<211> 3

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo B7 dirigido
 10 contra ED-A

<400> 103

His Phe Asp

1

5 <210> 104
 <400> 104
 000
10 <210> 105
 <400> 105
 000
15 <210> 106
 <211> 3
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial
20 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo B7 dirigido contra ED-A
25 <210> 107
 <400> 107
 000
30 <210> 108
 <400> 108
 000
35 <210> 109
 <400> 109
 000
40 <210> 110
 <400> 110
 000
45 <210> 111
 <211> 118
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial
50 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VH del anticuerpo E8 dirigido contra ED-A
 <400> 111

Leu Ala Phe
1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Met
 20 25 30

His Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 112

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica del dominio VL del anticuerpo E8 dirigido contra ED-A

10 <400> 112

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 113

<211> 3

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo E8 dirigido contra ED-A

<400> 113

Asp Met His

1

15 <210> 114

5 <210> 115
 <400> 115
 000
 10 <210> 116
 <211> 3
 <212> Proteína
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia aminoacídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo E8 dirigido contra
 ED-A
 20 <400> 116
 25 <210> 117
 <211> 350
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 <400> 117

1	5	10	15
Asn Gly Leu Gly Pro Ser Lys Thr Lys Thr Ala Ser Pro Asp Gln Thr			

20	25	30
Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr Val Val Ser		

35	40	45
Val Tyr Ala Gln Asn Arg Asn Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr		

50	55	60
Ala Val Thr Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val		

65	70	75	80
Asp Val Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val			

ES 2 402 171 T3

Ser Arg Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu
85 90 95

Leu Phe Pro Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly
100 105 110

Leu Arg Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp
115 120 125

Asp Met Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr Ala Ile Pro
130 135 140

Ala Pro Thr Asn Leu Lys Leu Ser Gln Val Thr Pro Thr Ser Phe Thr
145 150 155 160

Ala Gln Trp Ile Ala Pro Ser Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg
165 170 175

Val Asn Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ser
180 185 190

Pro Asp Ser Ser Ser Val Ile Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys
195 200 205

Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro
210 215 220

Ala Gln Gly Val Ile Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg
225 230 235 240

ES 2 402 171 T3

Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg
245 250 255

Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile Pro Ala
260 265 270

Asn Gly Gln Thr Pro Val Gln Arg Ser Ile Ser Pro Asp Val Arg Ser
275 280 285

Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile His Leu
290 295 300

Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Ile Ile Asp Ala
305 310 315 320

Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Thr Thr Thr
325 330 335

Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Ala Pro Arg Ala Arg
340 345 350

<210> 118

<211> 90

5 <212> Proteína

<213> *Homo sapiens*

<400> 118

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp
1 5 10 15

Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr
20 25 30

Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro
35 40 45

Ala Pro Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro
50 55 60

Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu
65 70 75 80

Ser Gln Pro Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr
85 90

<210> 119

<211> 90

5 <212> Proteína
<213> *Mus musculus*

<400> 119

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Ieu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp
 1 5 10 15

Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr
 20 25 30

Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu Leu Phe Pro
 35 40 45

Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro
 50 55 60

Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu
 65 70 75 80

Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr
 85 90

<210> 120

<211> 288

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: antígeno (11A12) que contiene el dominio ED-A de la fibronectina humana

10 <400> 120

Met Arg Ser Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met Gln Val
1 5 10 15

Thr Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Lys Trp Leu Pro Ser Ser
20 25 30

Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr Thr Pro Lys Asn Gly Pro
35 40 45

Gly Pro Thr Lys Thr Lys Thr Ala Gly Pro Asp Gln Thr Glu Met Thr
50 55 60

Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala
65 70 75 80

Gln Asn Pro Ser Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr
85 90 95

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp
 100 105 110

Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr
 115 120 125

Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro
 130 135 140

Ala Pro Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro
 145 150 155 160

Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu
 165 170 175

Ser Gln Pro Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr Ala Ile Pro Ala Pro Thr
 180 185 190

Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp
 195 200 205

Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro
 210 215 220

Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser
 225 230 235 240

Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val
 245 250 255

Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly
 260 265 270

Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Arg Ser His His His His His
 275 280 285

<210> 121

<211> 867

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia nucleotídica del antígeno (11A12)

10 <400> 121

atgagatcct accgaacaga aattgacaaa ccatcccaga tgcaagtgc ac cgatgttcag	60
gacaacagca ttagtgtcaa gtggctgcct tcaagttccc ctgttactgg ttacagagta	120
accaccactc caaaaatgg accaggacca acaaaaacta aaactgcagg tccagatcaa	180
acagaaatga ctattgaagg cttgcagccc acagtggagt atgtggtag tgcgtatgt	240
cagaatccaa gcggagagag tcagcctctg gttcagactg cagtaaccaa cattgategc	300
cctaaaggac tggcattcac tgatgtggat gtcgattcca tcaaaattgc ttgggaaagc	360
ccacaggggc aagtttccag gtacagggtg acctactcga gcccgtgagga tggaatccat	420
gagctatccc ctgcacactga tggtaagaa gacactgcag agctgcaagg cctcagaccc	480
ggttctgagt acacagtca g tgggttgcc ttgcacgatg atatggagag ccagcccc	540
attggaaccc agtccacagc tattcctgca ccaactgacc tgaagttcac tcaggtcaca	600
cccacaagcc tgagcgccca gtggacacca cccaatgttc agctcaactgg atatcgagt	660
cgggtgaccc ccaaggagaa gaccggacca atgaaagaaa tcaacattgc tcttgacagc	720

tcateccgtgg ttgtatcagg acttatggtg gccaccaa atgaagttag tgcctatgtc 780

cttaaggaca ctttgacaag cagaccagct cagggagttg tcaccactct ggagaatgtc 840

agatctcatc accatcacca tcactaa 867

5 <210> 122

<211> 10

<212> Proteína
<213> *Mus musculus*

<400> 122

His Tyr Gln Ile Asn Gln Gln Trp Glu Arg

1 5 10

10

<210> 123

<211> 9

15 <212> Proteína
<213> *Mus musculus*

<400> 123

Val Gly Asp Thr Tyr Glu Arg Pro Lys

1 5

20

<210> 124

<211> 17

<212> Proteína

25 <213> *Mus musculus*
<400> 124

His Ala Leu Gln Ser Ala Ser Ala Gly Ser Gly Ser Phe Thr Asp Val

1 5 10 15

Arg

30 <210> 125

<211> 7

<212> Proteína

<213> *Mus musculus*
35 <400> 125

Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys

1 5

40 <210> 126

<211> 11

<212> Proteína

<213> *Mus musculus*

<400> 126

Thr	Phe	Tyr	Gln	Ile	Gly	Asp	Ser	Trp	Glu	Lys
1										
										10

5

<210> 127
<211> 16
<212> Proteína
<213> *Mus musculus*

10

<400> 127

Trp	Lys	Glu	Ala	Thr	Ile	Pro	Gly	His	Leu	Asn	Ser	Tyr	Thr	Ile	Lys
1															
															15

15

<210> 128
<211> 14
<212> Proteína
<213> *Mus musculus*

20 <400> 128

Glu	Ala	Thr	Ile	Pro	Gly	His	Leu	Asn	Ser	Tyr	Thr	Ile	Lys	
1														
														10

25

<210> 129
<211> 21
<212> Proteína
<213> *Mus musculus*

<400> 129

30

Gly	Leu	Thr	Pro	Gly	Val	Ile	Tyr	Glu	Gly	Gln	Leu	Ile	Ser	Ile	Gln
1															
															15

Gln Tyr Gly His Arg

20

35

<210> 130
<211> 12
<212> Proteína
<213> *Mus musculus*

<400> 130

Trp	Ser	Arg	Pro	Gln	Ala	Pro	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
1											
											10

40

<210> 131
<211> 19
<212> Proteína
<213> *Mus musculus*

45

<400> 131

Ser	Asp	Asn	Val	Pro	Pro	Pro	Thr	Asp	Leu	Gln	Phe	Val	Glu	Leu	Thr
1															15

Asp Val Lys

5	<210> 132
	<211> 16
	<212> Proteína
10	<213> <i>Mus musculus</i>
	<400> 132

Val	Thr	Ile	Met	Trp	Thr	Pro	Pro	Asp	Ser	Val	Val	Ser	Gly	Tyr	Arg
1															15

15	<210> 133
	<211> 15
	<212> Proteína
	<213> <i>Mus musculus</i>
20	<400> 133

Val	Glu	Val	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Pro	Gly	Glu	His	Gly	Gln	Arg
1														15

25	<210> 134
	<211> 18
	<212> Proteína
	<213> <i>Mus musculus</i>
	<400> 134
30	

Asn	Thr	Phe	Ala	Glu	Ile	Thr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	Val	Thr	Tyr	Leu
1															15

Phe Lys

35	<210> 135
	<211> 8
	<212> Proteína
	<213> <i>Mus musculus</i>
	<400> 135

Val	Phe	Ala	Val	His	Gln	Gly	Arg
1							

<210> 136
 <211> 10
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*

5
 <400> 136

Thr Val Leu Val Thr Trp Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

10 <210> 137
 <211> 10
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 15 <400> 137

Gln Tyr Asn Val Gly Pro Leu Ala Ser Lys
 1 5 10

20 <210> 138
 <211> 16
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 138

Asn Leu Gln Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Thr Leu Val Ala Val Lys
 1 5 10 15

30 <210> 139
 <211> 12
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 <400> 139

Ala Thr Gly Val Phe Thr Thr Leu Gln Pro Leu Arg
 1 5 10

35 <210> 140
 <211> 13
 <212> Proteína
 40 <213> *Mus musculus*
 <400> 140

Leu Gly Val Arg Pro Ser Gln Gly Gly Glu Ala Pro Arg
 1 5 10

45 <210> 141
 <211> 28
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*

<400> 141

Val	Val	Thr	Pro	Leu	Ser	Pro	Pro	Thr	Asn	Leu	His	Leu	Glu	Ala	Asn
1															
														10	
															15

Pro	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Thr	Val	Ser	Trp	Glu	Arg
									20		
											25

5 <210> 142
 <211> 10
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 142

Ser	Thr	Thr	Pro	Asp	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
1									
									10

15 <210> 143
 <211> 17
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 143

Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Ser	Ile	Glu	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu	Val
1														
														10
														15

Arg

25 <210> 144
 <211> 27
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*

<400> 144

Thr	Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	Phe	Asp	Ser	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala
1															
															10
															15

<210> 145

<211> 9

<212> Proteína

35 <213> *Mus musculus*

Asn	Ser	Phe	Thr	Val	His	Trp	Val	Ala	Pro	Arg
									20	
										25

<210> 145

<211> 9

<212> Proteína

35 <213> *Mus musculus*

<400> 145

Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Arg
 1 5

5 <210> 146
 <211> 11
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 146

His His Ala Glu His Ser Val Gly Arg Pro Arg
 1 5 10

15 <210> 147
 <211> 18
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 147

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

Pro Arg

25 <210> 148
 <211> 21
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*

<400> 148

Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Val Pro Gly Ser Lys

30 20
 <210> 149
 <211> 12
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*

<400> 149

Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys
 1 5 10

5 <210> 150
 <211> 24
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 <400> 150

Ser Thr Ala Thr Ile Asn Asn Ile Lys Pro Gly Ala Asp Tyr Thr Ile
 1 5 10 15

10 <210> 151
 <211> 15
 <212> Proteína
 15 <213> *Mus musculus*
 <400> 151

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Val Ser Ile Asn Tyr Lys
 1 5 10 15

20 <210> 152
 <211> 22
 <212> Proteína
 25 <213> *Mus musculus*
 <400> 152

Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met Gln Val Thr Asp Val Gln Asp
 1 5 10 15

30 <210> 153
 <211> 12
 <212> Proteína
 35 <213> *Mus musculus*
 <400> 153

Trp Leu Pro Ser Thr Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg
 1 5 10

5 <210> 154
 <211> 29
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 <400> 154

Thr Ala Ser Pro Asp Gln Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro
 1 5 10 15

10 <210> 155
 <211> 22
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 15 <400> 155

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

20 Ala Pro Thr Asn Leu Lys
 <210> 156
 <211> 19
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 156

Asn Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr Asn Ile Asp
 1 5 10 15

30 Arg Pro Lys
 <210> 157
 <211> 12
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 157

Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
 1 5 10

5 <210> 158
 <211> 11
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 <400> 158

Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg
 1 5 10

10 <210> 159
 <211> 24
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 15 <400> 159

Phe Ser Gln Val Thr Pro Thr Ser Phe Thr Ala Gln Trp Ile Ala Pro
 1 5 10 15

20 Ser Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg
 20
 <210> 160
 <211> 9
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 160

Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys
 1 5

30 <210> 161
 <211> 24
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 <400> 161
 35

Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile Pro Ala
 1 5 10 15

40 Asn Gly Gln Thr Pro Val Gln Arg
 20
 <210> 162
 <211> 22
 <212> Proteína

<213> *Mus musculus*

<400> 162

Thr	Glu	Thr	Ile	Thr	Gly	Phe	Gln	Val	Asp	Ala	Ile	Pro	Ala	Asn	Gly
1															15

Gln Thr Pro Val Gln Arg

															20
5															

<210> 163

<211> 14

<212> Proteína

10 <213> *Mus musculus*

<400> 163

Ser	Tyr	Thr	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Tyr	Lys
1													10

15

<210> 164

<211> 11

<212> Proteína

20 <213> *Mus musculus*

<400> 164

Ile	His	Leu	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asp	Asn	Ala	Arg
1										10

25

<210> 165

<211> 19

<212> Proteína

30 <213> *Mus musculus*

<400> 165

Ser	Ser	Pro	Val	Ile	Ile	Asp	Ala	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Ala	Pro	Ser
1															15

Asn Leu Arg

35

<210> 166

<211> 17

<212> Proteína

<213> *Mus musculus*

<400> 166

Phe Leu Thr Thr Pro Asn Ser Ile Leu Val Ser Trp Gln Ala Pro
 1 5 10 15

Arg

<210> 167
 <211> 7
 5 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 <400> 167

Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys
 1 5

10 <210> 168
 <211> 9
 <212> Proteína
 15 <213> *Mus musculus*
 <400> 168

Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg
 1 5

20 <210> 169
 <211> 17
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 169

Pro Tyr Leu Pro Asn Val Asp Glu Glu Val Gln Ile Gly His Val Pro
 1 5 10 15

Arg

30 <210> 170
 <211> 15
 <212> Proteína
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 170

Gly Val Thr Tyr Asn Ile Ile Val Glu Ala Leu Gln Asn Gln Arg
 1 5 10 15

40 <210> 171
 <211> 23
 <212> Proteína

<213> *Mus musculus*

<400> 171

Arg Pro Gly Ala Ala Glu Pro Ser Pro Asp Gly Thr Thr Gly His Thr
1 5 10 15

Tyr Asn Gln Tyr Thr Gln Arg

5 20

<210> 172

<211> 118

<212> Proteína

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

15 <400> 172

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Arg
 20 25 30

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 173

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo B2 dirigido contra ED-A

10 <400> 173

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Ala
 20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 174

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo C5 dirigido contra ED-A

10 <400> 174

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Ile
 20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 175

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo D5 dirigido contra ED-A

10 <400> 175

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

ES 2 402 171 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Met
20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 176

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo E5 dirigido contra ED-A

10 <400> 176

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Gly
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 177

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo C8 dirigido contra ED-A

10 <400> 177

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Gln
 20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 178

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo F8 dirigido contra ED-A

10 <400> 178

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe
 20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 179

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo F1 dirigido contra ED-A

10 <400> 179

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Ala
 20 25 30

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 180

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo B7 dirigido contra ED-A

10 <400> 180

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Phe
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 181

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo E8 dirigido contra ED-A

10 <400> 181

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Met
 20 25 30

His Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 182

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo G9 dirigido contra ED-A

10 <400> 182

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Met
 20 25 30

Gln Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 183

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

10 <400> 183

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

ES 2 402 171 T3

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 184

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo B2 dirigido contra ED-A

10 <400> 184

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Val Ala
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 185

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo C5 dirigido contra ED-A

10

<400> 185

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu His
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 186

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo D5 dirigido contra ED-A

10 <400> 186

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ala
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 187

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo E5 dirigido contra ED-A

10 <400> 187

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala
 20 25 30

His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 188

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo C8 dirigido contra ED-A

10

<400> 188

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

ES 2 402 171 T3

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 189

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo F8 dirigido contra ED-A

10 <400> 189

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

ES 2 402 171 T3

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 190
<211> 125

5 <212> Proteína
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo F1 dirigido contra ED-A

10 <400> 190

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ala Pro
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 191

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo B7 dirigido contra ED-A

10 <400> 191

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

ES 2 402 171 T3

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 192

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo E8 dirigido contra ED-A

10 <400> 192

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

ES 2 402 171 T3

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 193

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo G9 dirigido contra ED-A

10 <400> 193

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

ES 2 402 171 T3

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ala
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

REIVINDICACIONES

NO: 116, LCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 y LCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8.

7. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en que la región estructural del dominio VH y/o VL
5 es una región estructural de la línea germinal humana.

8. Un anticuerpo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en que las regiones estructurales de los dominios VH y VL son regiones estructurales de la línea germinal humana y en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 81 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 82; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 21 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 22; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 31 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 32; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 41 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 42; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 51 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 52; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 61 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 62; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 71 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 72; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 91 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 92; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 101 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 102; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 111 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 112.

25 9. Un anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en que la molécula de anticuerpo es un Fv de cadena sencilla o un diacuerpo.

30 10. El uso de una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL, en que la molécula de anticuerpo se une a la isoforma de la fibronectina con ED-A y está conjugada con una molécula, para la preparación de un medicamento para la administración a las metástasis tumorales de la molécula conjugada con el anticuerpo, en que la molécula tiene actividad biocida o citotóxica o es un radioisótopo.

11. El uso de la reivindicación 10, en que la molécula de anticuerpo se une al ED-A de la fibronectina.

35 12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en que el anticuerpo comprende un dominio VH y un dominio VL y en que el dominio VH comprende una región estructural y un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y el dominio VL comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región estructural y en que HCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 83, HCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5 y LCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 86, LCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 y LCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8; o en que HCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3, HCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5 y LCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 6, LCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 y LCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8; o en que HCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 23, HCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5 y LCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 26, LCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 y LCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8; o en que HCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 33, HCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5 y LCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 36, LCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 y LCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8; o en que HCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 43, HCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5 y LCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 46, LCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 y LCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8; o en que HCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 53, HCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5 y LCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 56, LCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 y LCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8; o en que HCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 63, HCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5 y LCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 66, LCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 y LCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8; o en que HCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 73, HCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5 y LCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 76, LCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 y LCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8; o en que HCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 93, HCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5 y LCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 96, LCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 y LCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8.

tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8; o en que HCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 103, HCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5 y LCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 106, LCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 y LCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8; o en que HCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID

5 NO: 113, HCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5 y LCDR1 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 116, LCDR2 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 y LCDR3 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8.

10 13. El uso de la reivindicación 12, en que la región estructural del dominio VH y/o VL es una región estructural de la línea germinal humana.

15 14. El uso de las reivindicaciones 12 ó 13, en que dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 81 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 82; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 21 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 22; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 31 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 32; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 41 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 42; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 51 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 52; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 61 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 62; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 71 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 91 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 92; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 101 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 102; o en que el dominio VH tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 111 y el dominio VL tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 112.

20 15. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en que la molécula de anticuerpo es un Fv de cadena sencilla o un diacuerpo.

25 30 16. Un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico de metástasis tumorales, en el que se usa un anticuerpo que se une a la isoforma de la fibronectina con ED-A.

Figura 1

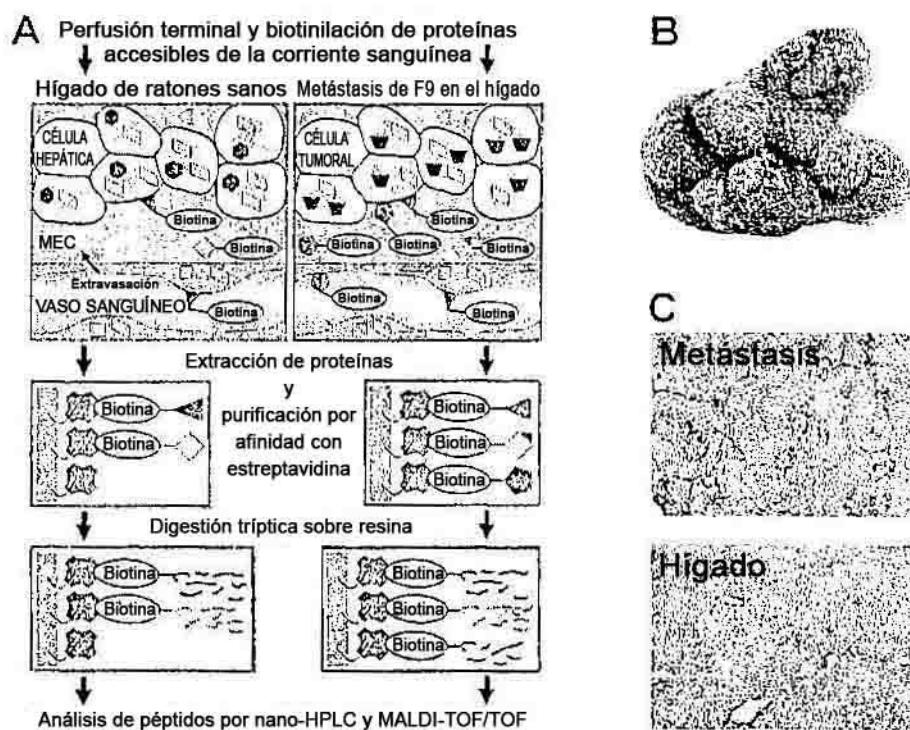
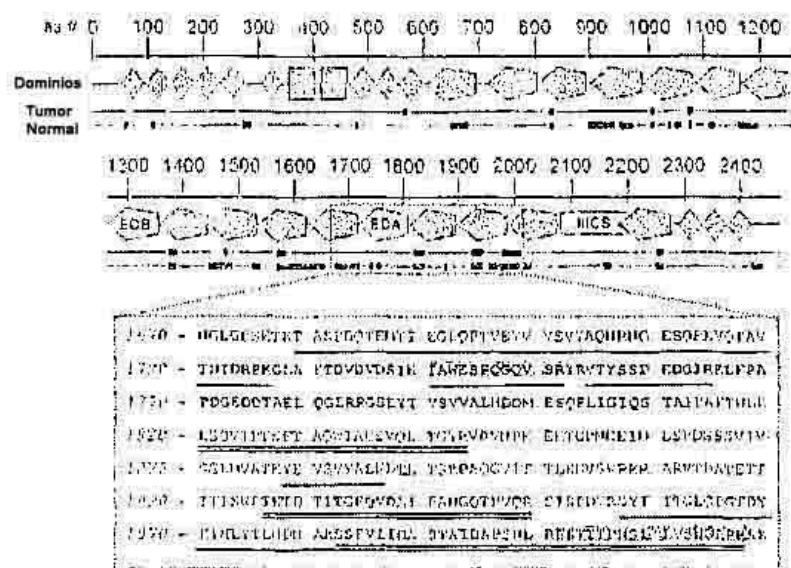


Figura 2

A



B

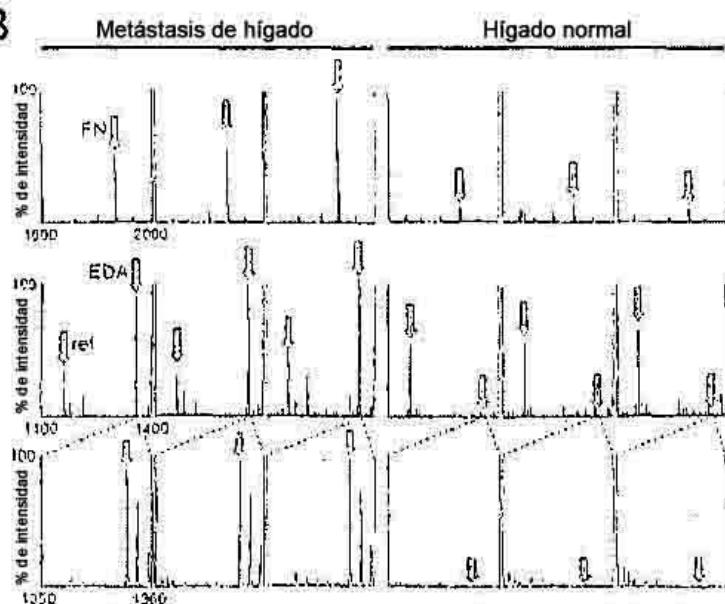


Figura 3

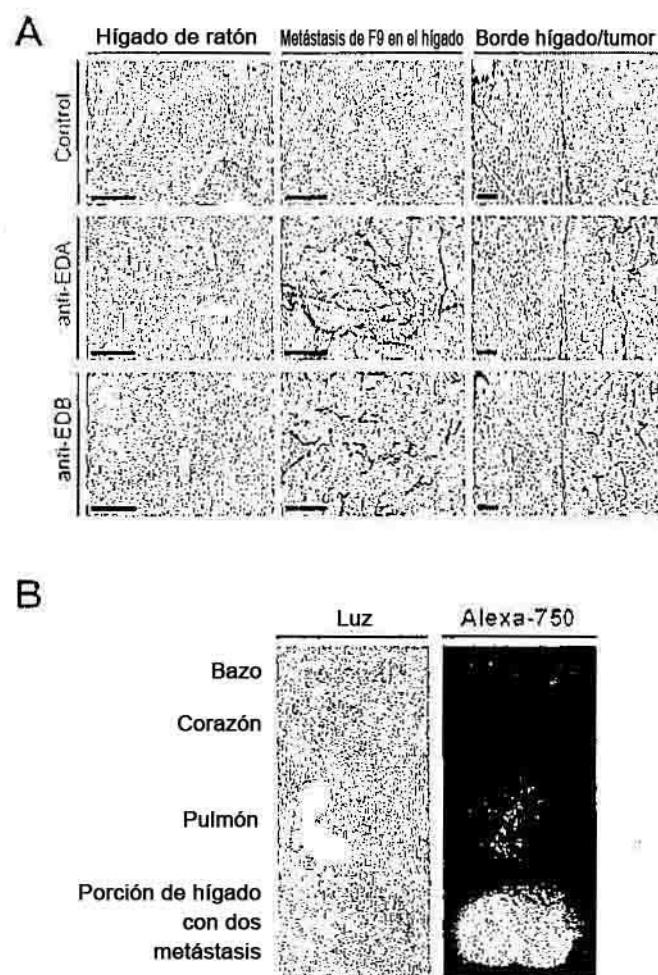
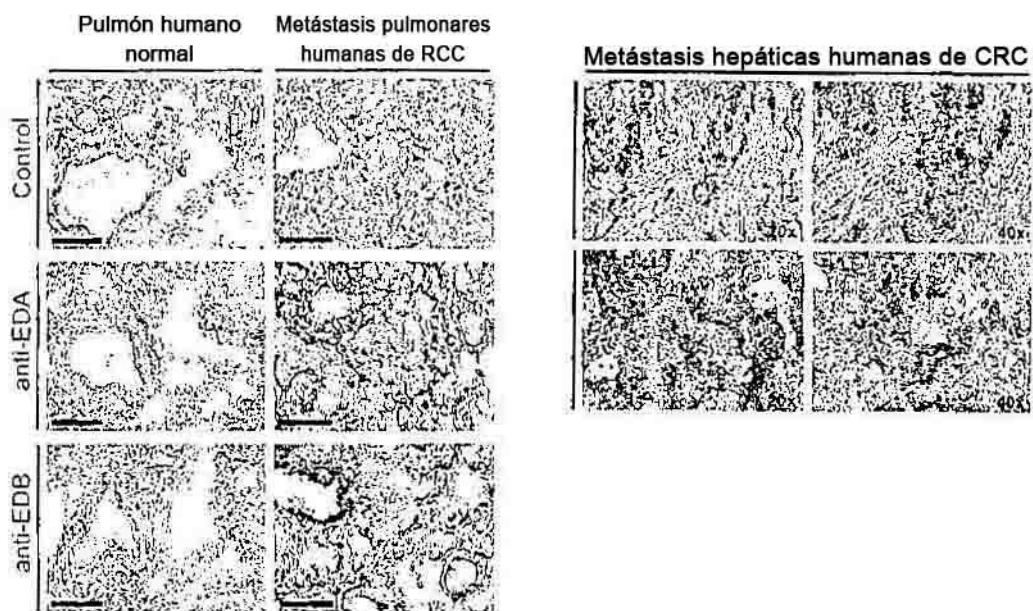


Figura 4



```
humano  1 NIDRPKGGLAFTDVDSIKIAWESPQGQVSRYRVTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQ
*****  
ratón   1 NIDRPKGGLAFTDVDSIKIAWESPQGQVSRYRVTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELQ
*****  
  
humano 61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQST
*****  
ratón   61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGIQST
```

Figura 5

A

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTT
TAGCCC CGGGAGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCA
CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
AGAGCCGAGGACACGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTC
ATTTGTATCTTTGACTACTGGGGCCAGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCGAGT

B

GGCGGTGGAGGTTCTGGCGGCCGTGGCAGTGGCGGTGGAGGTT
CCGGGGGTGGAGGATCT

Figura 6

C

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTGTCTC
CAGGGGAAAAAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT
TAGCTCTGCGTGGTTAGCCTGGTACCAGAGAAACCTGGCCAG
GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG
GCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT
CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTCAGTG
TATTACTGTCAGCAGATGCGTGGTCGGCCGCCACGTTCGGCC
AAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGCGGCCGCAGAACAAAAACT
CATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTGAAA

continuación Figura 6

A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSPRRMSWVRQ
APGKGLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVS
S

B

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

C

EIVLTQSPGTLSLSPGEKATLSCRASQSVSSAWLAWYQQ
KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISR
LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKAAAEEQKLIS
EEDLNGAA

Figura 7

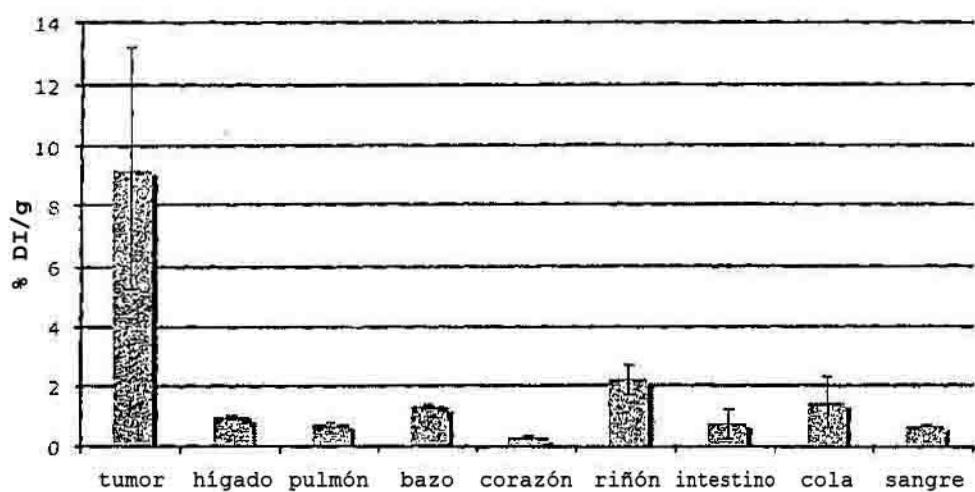


Figura 8