

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 726**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2008** **E 12195313 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015** **EP 2612869**

54 Título: **Antígeno ED-A del fibrinógeno que está asociado con linfomas**

30 Prioridad:

25.07.2007 US 951765 P

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

27.04.2015

73 Titular/es:

PHILOGEN S.P.A. (100.0%)

La Lizza 7

53100 Siena, IT

72 Inventor/es:

NERI, DARIO;

VILLA, ALESSANDRA;

TRACHSEL, EVELINE y

RYBAK, JASCHA-NIKOLAI

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 534 726 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

Antígeno ED-A del fibrinógeno que está asociado con linfomas

5 La presente invención se refiere a la detección y al tratamiento de linfomas. La invención implica el uso de un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina, especialmente un anticuerpo que se une al dominio ED-A de fibronectina.

10 La angiogénesis describe el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes y es un acontecimiento poco común en el adulto pero es un aspecto característico de muchas enfermedades, incluyendo el crecimiento de tumores sólidos. Se requiere angiogénesis para que los tumores crezcan más allá de algunos milímetros de diámetro y los tumores pueden inducir la angiogénesis a través de la secreción de diversos factores de crecimiento, por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los nuevos vasos sanguíneos formados como resultado de la angiogénesis se denominan la neovasculatura del tumor, y una neovasculatura vigorosa es un aspecto característico de un tumor agresivo.

15 La fibronectina (FN) es una glicoproteína que se expresa ampliamente en una variedad de tejidos normales y fluidos corporales. Es un componente de la matriz extracelular (ECM), y desempeña un papel en muchos procesos biológicos, incluyendo adhesión celular, migración celular, hemostasia, trombosis, cicatrización de heridas, diferenciación tisular y transformación oncogénica.

20 Se generan diferentes isoformas de FN por corte y empalme alternativo de tres regiones (ED-A, ED-B, IIICS) del pre-ARNm de FN de transcrito primario, un proceso que está modulado por citocinas y el pH extracelular (Balza 1988; Carnemolla 1989; Borsi 1990; Borsi 1995). La fibronectina contiene dos extradominios globulares de tipo III que pueden experimentar corte y empalme alternativo: ED-A y ED-B (French-Constant 1995, Hynes 1990, Kaspar *et al.* 2006). Los ED-A de fibronectina de ratón y fibronectina humana son idénticos en un 96,7% (solo difieren en 3 aminoácidos entre las dos secuencias de 90 aminoácidos, véase la figura 2).

25 Se ha notificado expresión del ED-A de fibronectina en células tumorales y en tumores sólidos a nivel del ARNm en cáncer de mama (Jacobs *et al.* 2002, Matsumoto *et al.* 1999) y cáncer de hígado (Oyama *et al.* 1989, Tavian *et al.* 1994) y a nivel de proteína aislada en fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y melanoma (Borsi *et al.* 1987).

30 A nivel inmunohistoquímico, se ha detectado la presencia de ED-A en la matriz extracelular (ECM) de tumores odontogénicos (Heikinheimo *et al.* 1991) y carcinoma hepatocelular (Koukoulis *et al.* 1995). En cambio, se ha detectado ED-A en el estroma de neoplasias malignas de mama (Koukoulis *et al.* 1993), y en los vasos sanguíneos y membranas basales de carcinoma de células renales bien diferenciado (Lohi *et al.* 1995). Sin embargo, en carcinoma de células renales menos diferenciado (Lohi *et al.* 1995) y carcinoma papilar del tiroides (Scarpino *et al.* 1999) se ha detectado ED-A en vasos sanguíneos, membranas basales y estroma tumoral. También se ha notificado la presencia de ED-A en la vasculatura de gliomas (Borsi *et al.* 1998). Por tanto, el patrón de expresión de ED-A notificado para diferentes tipos de tumores es muy variable.

35 Se muestra en el presente documento que ED-A se expresa selectivamente en la neovasculatura de linfomas. Puesto que los vasos sanguíneos tumorales son fácilmente accesibles para agentes terapéuticos administrados por vía intravenosa (Neri y Bicknell 2005, Rybak *et al.* 2006, Thorpe 2004, Trachsel y Neri 2006), moléculas de unión tales como moléculas de anticuerpo que se unen a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina representan agentes novedosos que pueden usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de linfomas.

40 Se ha sugerido previamente un método basado en anticuerpos para el diagnóstico y tratamiento de linfoma (documento EP0603735).

45 La terapia de la neovasculatura tumoral (que selecciona como diana la vasculatura tumoral) es un enfoque prometedor para el tratamiento de tumores. La selección como diana de la vasculatura tumoral tiene como objetivo alterar la vasculatura dentro del propio tumor, reduciendo el flujo sanguíneo para privar al tumor de oxígeno y nutrientes, provocando la muerte de las células tumorales.

50 En el presente documento se dan a conocer anticuerpos anti-ED-A que reconocen selectivamente los vasos sanguíneos de nueva formación de linfomas.

55 La presente invención es tal como se expone en las reivindicaciones.

60 La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a la isoforma extradominio-A (ED-A) de fibronectina para su uso en un método de tratamiento de linfoma, en el que el anticuerpo se conjuga con una molécula que tiene actividad biocida o citotóxica, o con un radioisótopo.

65 La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina para su uso en un método *in vivo* de detección o diagnóstico de linfoma en un ser humano o animal, en el que el anticuerpo se marca

con un marcador detectable.

5 La presente invención también proporciona un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina para su uso en un método de administración de una molécula conjugada con el anticuerpo a la neovasculatura de un linfoma en un ser humano o animal, en el que la molécula tiene actividad biocida o citotóxica, es un marcador detectable o es un radioisótopo.

10 La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina para la preparación de un medicamento para la administración a un linfoma de una molécula conjugada con el anticuerpo, en el que la molécula tiene actividad biocida o citotóxica, es un marcador detectable o es un radioisótopo.

15 La presente invención proporciona además un método *in vitro* de diagnóstico de linfoma, en el que se usa un anticuerpo que se une a la ED-A de fibronectina.

La invención también proporciona un anticuerpo para su uso tal como se expuso anteriormente, en el que el método *in vivo* de diagnóstico de un linfoma en un ser humano o animal comprende las etapas de:

- 20 (a) administrar al ser humano o animal una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma ED-A de fibronectina, y
(b) determinar la presencia o ausencia del anticuerpo en el sistema linfático del cuerpo humano o animal;

25 en el que la localización del anticuerpo en el sistema linfático en el ser humano o animal indica la presencia de un linfoma.

Además, se da a conocer un método de tratamiento de un linfoma en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma ED-A de fibronectina. La presente invención también da a conocer un método de tratamiento de un linfoma en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de fibronectina.

30 Además, se da a conocer un método de administración de una molécula a la neovasculatura de un linfoma en un ser humano o animal que comprende administrar al ser humano o al animal una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma ED-A de fibronectina, en el que el anticuerpo está conjugado con la molécula. También se da a conocer un método de administración de una molécula a la neovasculatura de un linfoma en un ser humano o animal, que comprende administrar al ser humano o animal una molécula de anticuerpo que se une al ED-A de fibronectina, en el que el anticuerpo está conjugado con la molécula.

40 Un anticuerpo para su uso en la invención puede ser un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina y/o el ED-A de fibronectina, que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9, o variantes del mismo. Preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención es un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina y/o el ED-A de fibronectina, que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo B2, C5, D5, C8, F8, B7 o G9, o variantes del mismo. Lo más preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención es un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina y/o al ED-A de fibronectina, que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo F8 o variantes del mismo.

50 Un anticuerpo para su uso en la invención puede comprender un conjunto de CDR H y/o L del anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9, o un conjunto de CDR H y/o L del anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9 con diez o menos, por ejemplo una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos dentro del conjunto dado a conocer de CDR H y/o L. Preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención comprende un conjunto de CDR H y/o L del anticuerpo B2, C5, D5, C8, F8, B7 o G9 con diez o menos, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos dentro del conjunto dado a conocer de CDR H y/o L. Preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención comprende un conjunto de CDR H y/o L del anticuerpo F8 con diez o menos, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos dentro del conjunto dado a conocer de CDR H y/o L.

60 Pueden hacerse sustituciones posiblemente en cualquier residuo dentro del conjunto de CDR, y pueden estar dentro de CDR1, CDR2 y/o CDR3.

Por ejemplo, un anticuerpo para su uso en la invención puede comprender una o más CDR tal como se describe en el presente documento, por ejemplo una CDR3, y opcionalmente también una CDR1 y CDR2 para formar un conjunto de CDR.

65 Un anticuerpo para su uso en la invención puede comprender una molécula de anticuerpo humano. El anticuerpo comprende normalmente un dominio VH y/o VL de anticuerpo. También se proporcionan dominios VH de

anticuerpos para su uso en la invención. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL están las regiones determinantes de complementariedad ("CDR") y las regiones de entramado ("FR"). Un dominio VH comprende un conjunto de HCDR, y un dominio VL comprende un conjunto de LCDR. Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de VH y un entramado. Puede comprender alternativamente o además un dominio VL de anticuerpo que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de VL y un entramado. En el presente documento se describen los dominios VH y VL y las CDR de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9. Todas las secuencias de VH y VL, secuencias de CDR, conjuntos de CDR y conjuntos de HCDR y conjuntos de LCDR descritos en el presente documento representan realizaciones de un anticuerpo para su uso en la invención. Tal como se describe en el presente documento, un "conjunto de CDR" comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Por tanto, un conjunto de HCDR se refiere a HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y un conjunto de LCDR se refiere a LCDR1, LCDR2 y LCDR3. A menos que se indique lo contrario, un "conjunto de CDR" incluye HCDR y LCDR.

Un anticuerpo para su uso en la invención puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende las regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y un entramado, en el que HCDR1 es SEQ ID NO: 3, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103 ó 113, y en el que opcionalmente HCDR2 es SEQ ID NO: 4 y/o HCDR3 es SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, la HCDR1 es SEQ ID NO: 23, 33, 43, 53, 73, 83 ó 103. Lo más preferiblemente, la HCDR1 es SEQ ID NO: 83.

Normalmente, un dominio VH está emparejado con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión a antígeno del anticuerpo, aunque tal como se comenta más adelante, puede usarse un dominio VH o VL solo para la unión al antígeno. Por tanto, un anticuerpo para su uso en la invención puede comprender además un dominio VL de anticuerpo que comprende las regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y un entramado, en el que LCDR1 es SEQ ID NO: 6, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106 ó 116 y en el que LCDR2 es SEQ ID NO: 7 y LCDR3 es SEQ ID NO: 8. Preferiblemente, la LCDR1 es SEQ ID NO: 26, 36, 46, 56, 76, 86 ó 106. Lo más preferiblemente, la LCDR1 es SEQ ID NO: 86.

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

Pueden injertarse una o más CDR o un conjunto de CDR de un anticuerpo en un entramado (por ejemplo, entramado humano) para proporcionar una molécula de anticuerpo para su uso en la invención. Las regiones de entramado pueden comprender secuencias de segmentos de genes de línea germinal humana. Por tanto, el entramado puede ser de línea germinal, mediante lo cual uno o más residuos dentro del entramado se cambian para que coincidan con los residuos en las posiciones equivalentes en el entramado de línea germinal humana más similar. Un anticuerpo para su uso en la invención puede ser una molécula de anticuerpo aislada que tiene un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR en un entramado de línea germinal humana, por ejemplo DP47. Normalmente, el anticuerpo también tiene un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR, por ejemplo, en un entramado de línea germinal humana. La región de entramado de línea germinal humana del dominio VL puede ser DPK22.

Un dominio VH puede tener la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101 ó 111. Preferiblemente, un dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21, 31, 41, 51, 71, 81 ó 101. Lo más preferiblemente, un dominio VH para su uso en la invención tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 81. Un dominio VL puede tener la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102 ó 112. Preferiblemente, un dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22, 32, 42, 52, 72, 82 ó 102. Lo más preferiblemente, un dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 82.

Un anticuerpo para su uso en la invención puede tener un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende un dominio VH y un dominio VL unidos por medio de un ligador peptídico. El experto en la técnica puede seleccionar una longitud y secuencia apropiadas del ligador, por ejemplo, al menos de 5 ó 10 aminoácidos de longitud, hasta aproximadamente 15, 20 ó 25 aminoácidos de longitud. El ligador puede tener la secuencia de aminoácidos GSSGG (SEQ ID NO: 28). El scFv puede consistir en o comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9.

Las moléculas de anticuerpo se describen con más detalle en otra parte en el presente documento.

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

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

Breve descripción de los dibujos

5
10
15
Figura 1: Muestra la tinción inmunohistoquímica de secciones de tumor pulmonar primario con el anticuerpo scFv anti-ED-A D5. La columna 1 indica la clasificación del cáncer de pulmón: A: cáncer de pulmón de células pequeñas, B: cáncer de pulmón de células no pequeñas, C: carcinoma de células escamosas, D: adenocarcinoma, E: carcinoma bronquioalveolar y F: carcinoma de células grandes. Columnas 2 y 3: Muestran la detección inmunohistoquímica del ED-A en secciones de tejidos de tumores pulmonares de los diferentes subtipos. Las secciones de tejidos mostradas en las columnas 2 y 3 para cada subtipo se obtuvieron de la misma muestra tumoral. La tinción inmunohistoquímica (líneas más oscuras) reveló un patrón vascular intenso de tinción en secciones de tumor primario tanto de A: cáncer de pulmón de células pequeñas, como de B: cánceres de pulmón de células no pequeñas (C: carcinoma de células escamosas, D: adenocarcinoma, E: carcinoma bronquioalveolar y F: carcinoma de células grandes).

20
Figura 2: muestra un alineamiento entre A: el ED-A humano (secuencia superior) y B: el ED-A de ratón (secuencia inferior). Los asteriscos indican las posiciones de los aminoácidos en las que los aminoácidos del ED-A humano y el ED-A de ratón son idénticos.

25
30
Figura 3A: muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo anti-ED-A H1 (SEQ ID NO: 12). La secuencia de nucleótidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A H1 está subrayada. La secuencia de nucleótidos de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A H1 se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de nucleótidos de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A H1 se muestra en negrita y subrayada. B: Muestra la secuencia de nucleótidos de la secuencia de ligador del anticuerpo anti-ED-A H1 (SEQ ID NO: 14). C: Muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo anti-ED-A H1 (SEQ ID NO: 13). La secuencia de nucleótidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A H1 está subrayada. La secuencia de nucleótidos de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A H1 se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de nucleótidos de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A H1 se muestra en negrita y subrayada.

35
40
Figura 4A: Muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo anti-ED-A H1 (SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 3) del anticuerpo anti-ED-A H1 está subrayada. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 4) del anticuerpo anti-ED-A H1 se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 5) del anticuerpo anti-ED-A H1 se muestra en negrita y subrayada. B: Muestra la secuencia de aminoácidos de la secuencia de ligador del anticuerpo anti-ED-A H1 (SEQ ID NO: 11). C: Muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo anti-ED-A H1 (SEQ ID NO: 2). La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 6) del anticuerpo anti-ED-A H1 está subrayada. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 7) del anticuerpo anti-ED-A H1 se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 8) del anticuerpo anti-ED-A H1 se muestra en negrita y subrayada.

TERMINOLOGÍA

45
Fibronectina

50
55
La fibronectina es un antígeno sujeto a corte y empalme alternativo, y se conocen varias isoformas alternativas de la fibronectina, tal como se describe en otra parte en el presente documento. El extradominio-A (EDA o ED-A) se conoce también como ED, extra-repetición A de tipo III (EIIIA) o EDI. La secuencia del ED-A humano se ha publicado por Kornblihtt *et al.* (1984), *Nucleic Acids Res.* 12, 5853-5868 y Paoletta *et al.* (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 (fibronectina tipo-III 12; extradominio 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de registro P02751. La secuencia del ED-A de ratón está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1721-1810 (fibronectina tipo-III 13; extradominio 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de registro P11276.

60
La isoforma ED-A de fibronectina (A-FN) contiene el extradominio A (ED-A). La secuencia de la A-FN humana puede deducirse a partir de la correspondiente secuencia de precursor de fibronectina humana, que está disponible en la base de datos SwissProt con el número de registro P02751. La secuencia de la AF-N de ratón puede deducirse a partir de la correspondiente secuencia de precursor de fibronectina de ratón, que está disponible en la base de datos SwissProt con el número de registro P11276. La A-FN puede ser la isoforma ED-A humana de la fibronectina. El ED-A puede ser el extradominio A de la fibronectina humana.

65
El ED-A es una secuencia de 90 aminoácidos que se inserta en la fibronectina (FN) por corte y empalme alternativo y se localiza entre el dominio 11 y 12 de la FN (Borsi *et al.*, 1987, *J. Cell Biol.*, 104, 595-600). El ED-A está

principalmente ausente en la forma plasmática de la FN pero es abundante durante la embriogénesis, remodelación tisular, fibrosis, trasplante cardiaco y crecimiento de tumores sólidos.

Corte y empalme alternativo

5 El corte y empalme alternativo se refiere a la aparición de diferentes patrones de corte y empalme de un transcrito de ARN primario de ADN para producir diferentes ARNm. Tras la escisión de los intrones, la selección puede determinar qué exones se cortan y empalman entre sí para formar el ARNm. El corte y empalme alternativo conduce a la producción de diferentes isoformas que contienen diferentes exones y/o diferentes números de exones. Por ejemplo, una isoforma puede comprender una secuencia de aminoácidos adicional que corresponde a uno o más exones, que puede comprender uno o más dominios.

Linfoma

15 Esto describe un tipo de cáncer que implica células del sistema inmunitario denominadas linfocitos y se caracteriza por una proliferación anómala de estas células. Hay muchos subtipos diferentes de linfomas y éstos pueden agruparse en dos categorías principales: linfomas de Hodgkin y linfomas no Hodgkin. Los linfomas de Hodgkin se desarrollan a partir de un linaje de linfocitos B anómalo específico, mientras que los linfomas no Hodgkin pueden derivarse de células o bien NK o bien B o bien T anómalas y se distinguen por marcadores genéticos únicos. El linfoma de Burkitt es un ejemplo de un linfoma no Hodgkin de células B. Un linfoma tal como se le hace referencia en el presente documento puede ser un linfoma primario. Un linfoma tal como se le hace referencia en el presente documento puede ser un linfoma de Hodgkin o un linfoma no Hodgkin. Preferiblemente, un linfoma tal como se le hace referencia en el presente documento es un linfoma de Hodgkin primario o un linfoma no Hodgkin primario.

Tumor primario

25 Esto describe un tumor en el sitio en el que el tumor surge por primera vez (el sitio primario). Los tumores primarios a veces se diseminan desde su sitio original (el sitio primario) para formar tumores secundarios (metástasis) en otros sitios en el cuerpo animal y esta diseminación se denomina metástasis.

Miembro de unión

30 Esto describe un miembro de una pareja de moléculas que se unen entre sí. Los miembros de una pareja de unión pueden derivarse de manera natural o pueden producirse total o parcialmente de manera sintética. Un miembro de la pareja de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se une a y por tanto es complementaria a una organización polar y espacial particular del otro miembro de la pareja de moléculas. Los ejemplos de tipos de parejas de unión son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor hormonal, receptor-ligando, enzima-sustrato. La presente invención se refiere a reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.

40 Un miembro de unión normalmente comprende una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno. Por ejemplo, un miembro de unión puede ser una molécula de anticuerpo o una proteína distinta de anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno.

45 Un sitio de unión a antígeno puede proporcionarse por medio de la disposición de regiones determinantes de complementariedad (CDR) sobre armazones proteicos distintos de anticuerpos tales como fibronectina o citocromo B, etc. (Haan y Maggos, 2004; Koide 1998; Nygren 1997), o mediante aleatorización o mutación de residuos de aminoácidos de un bucle en un armazón proteico para conferir especificidad de unión para una diana deseada. Los armazones para diseñar nuevos sitios de unión en proteínas se han revisado en detalle por Nygren *et al.* (1997). Se describen armazones proteicos para miméticos de anticuerpos en el documento WO/0034784, en el que los inventores describen proteínas (miméticos de anticuerpos) que incluyen un dominio de tipo III de fibronectina que tiene al menos un bucle aleatorizado. Un armazón adecuado en el que injertar una o más CDR, por ejemplo un conjunto de HCDR, puede proporcionarse mediante cualquier miembro de dominios de la superfamilia de genes de inmunoglobulina. El armazón puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de un armazón proteico distinto de anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de unión a antígeno en una molécula de armazón que es más pequeña y/o más fácil de producir que al menos algunas moléculas de anticuerpo. El tamaño pequeño de un miembro de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles tales como la capacidad para entrar en células, penetrar profundo en los tejidos o llegar a dianas dentro de otras estructuras, o unirse dentro de cavidades proteicas del antígeno diana. El uso de sitios de unión a antígeno en armazones proteicos distintos de anticuerpos se revisa por Wess, 2004. Normalmente son proteínas que tienen una estructura principal estable y uno o más bucles variables, en las que la secuencia de aminoácidos del bucle o bucles se muta específica o aleatoriamente para crear un sitio de unión a 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 10^o dominio de tipo III de fibronectina) y lipocalinas. Otros enfoques incluyen "microcuerpos" sintéticos (Selecore GmbH) que se basan en ciclótidos, pequeñas proteínas que tienen enlaces disulfuro intramoleculares.

65 Además de las secuencias de anticuerpo y/o un sitio de unión a antígeno, un miembro de unión puede comprender

otros aminoácidos, por ejemplo que forman un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para conferir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad de unirse al antígeno. Los miembros de unión pueden portar un marcador detectable, o pueden conjugarse con una toxina o un resto de direccionamiento o una enzima (por ejemplo, mediante un ligador o enlace de peptídico). Por ejemplo, un miembro de unión puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático) así como un sitio de unión a antígeno, en el que el sitio de unión a antígeno se une al antígeno y dirige así el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo mediante escisión.

Aunque, tal como se indica, las CDR pueden portarse por armazones distintos de anticuerpos, la estructura para portar una CDR o un conjunto de CDR en general será una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una parte sustancial de la misma, en la que la CDR o conjunto de CDR se ubica en una ubicación correspondiente a la CDR o conjunto de CDR de dominios variables de anticuerpo VH y VL que se producen de manera natural codificados por genes de inmunoglobulina reorganizados. Las estructuras y ubicaciones de dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse mediante referencia a Kabat 1987, y sus actualizaciones, ahora disponibles en Internet (en immuno.bme.nwu.edu o encontrar "Kabat" usando cualquier motor de búsqueda).

Por región CDR o CDR pretende indicarse las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina tal como se definen por Kabat *et al.* (1987), (Kabat 1991a, y ediciones posteriores). Un anticuerpo contiene normalmente 3 CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término la CDR o las CDR se usa en el presente documento para indicar, según el caso, una de estas regiones o varias, o incluso todas estas regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácido responsables de la unión por afinidad del anticuerpo al antígeno o el epítipo que reconoce.

Entre las 6 secuencias de CDR cortas, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad debido esencialmente a los mecanismos de reorganización de los genes que dan lugar a la misma). Puede ser tan corta como 2 aminoácidos, aunque el mayor tamaño conocido es de 26. Funcionalmente, la HCDR3 desempeña un papel en parte en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal 1974; Amit 1986; Chothia 1987; Chothia 1989; Caton 1990; Sharon 1990a; Sharon 1990b; Kabat *et al.*, 1991b).

30 *Molécula de anticuerpo*

Esto describe una inmunoglobulina ya sea natural o se produzca parcial o totalmente de manera sintética. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo. Debe entenderse en este caso que la invención no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir no están en su entorno natural sino que pueden haberse aislado u obtenido por purificación a partir de fuentes naturales, u obtenido por recombinación genética, o por síntesis química, y que entonces pueden contener aminoácidos no naturales tal como se describirá más adelante. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión a antígeno del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo tales como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos.

Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que se unen al antígeno diana. Tales técnicas pueden implicar introducir ADN que codifica para la región variable de inmunoglobulina, o las CDR, de un anticuerpo, en las regiones constantes, o las regiones constantes más las regiones de entramado, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EPA-239400, y un extenso conjunto de bibliografía posterior. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo puede someterse a mutación genética u otros cambios, que pueden alterar o no la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Puesto que los anticuerpos pueden modificarse de varios modos, el término "molécula de anticuerpo" debe interpretarse que cubre cualquier miembro de unión o sustancia que tiene un sitio de unión a antígeno del anticuerpo con la especificidad requerida y/o que se une al antígeno. Por tanto, este término cubre fragmentos y derivados de anticuerpo, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión a antígeno del anticuerpo, o equivalente, fusionado con otro polipéptido (por ejemplo, derivado de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo). La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023, y un extenso conjunto de bibliografía posterior.

Técnicas adicionales disponibles en la técnica de diseño de anticuerpos han hecho posible aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, pueden prepararse hibridomas humanos tal como se describe por Kontermann y Dubel (2001). La presentación en fago, otra técnica establecida para generar anticuerpos, se ha descrito con detalle en muchas publicaciones tales como el documento WO92/01047 (comentado adicionalmente a continuación) y las patentes estadounidenses US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404 y Kontermann y Dubel (2001). Pueden usarse ratones transgénicos en los que se inactivan los genes de anticuerpos del ratón y se sustituyen funcionalmente por genes de anticuerpos humanos, mientras que se dejan intactos otros componentes del sistema inmunitario del ratón, para aislar anticuerpos humanos (Mendez 1997).

Pueden crearse moléculas de anticuerpo sintéticas mediante expresión a partir de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados y ensamblados dentro de vectores de expresión adecuados, por ejemplo tal como se describe por Knappik *et al.* (2000) o Krebs *et al.* (2001).

Se ha mostrado que fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unión a antígenos. Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward 1989; McCafferty 1990; Holt 2003), que consiste en un dominio VH o un dominio VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F (ab')₂, un diacuerpo que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un ligador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird 1988; Huston 1988) ; (viii) dímeros de Fv de una única cadena biespecíficos (documento WO93/11161), y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (documento WO94/13804; Holliger 1993a). Las moléculas de Fv, scFv o diacuerpos pueden estabilizarse mediante la incorporación de enlaces disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter 1996). También pueden prepararse minicuerpos que comprenden un 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 residuos en el extremo carboxilo-terminal del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo, y Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el que el/los residuos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre.

Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo para su uso en la invención partiendo de cualquiera de las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento, por ejemplo moléculas de anticuerpo que comprenden dominios VH y/o VL o CDR de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, mediante métodos tales como digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína y/o mediante escisión de los puentes disulfuro por reducción química. De otra forma, los fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden obtenerse mediante técnicas de recombinación genética igualmente conocidas por el experto en la técnica, o por síntesis de péptidos por medio de, por ejemplo, sintetizadores de péptidos automáticos tales como los suministrados por la compañía Applied Biosystems, etc., o mediante síntesis y expresión de ácidos nucleicos.

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

Un dAb (anticuerpo de dominio) es un fragmento de unión al antígeno monomérico pequeño de un anticuerpo, concretamente la región variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo (Holt 2003). Se producen dAb de VH de manera natural en los camélidos (por ejemplo, camello, llama) y pueden producirse inmunizando un camélido con un antígeno diana, aislando células B específicas de antígeno y clonando directamente los genes de dAb de células B individuales. Los dAb también pueden producirse en cultivo celular. Su pequeño tamaño, buena solubilidad y estabilidad térmica los hacen particularmente útiles fisiológicamente y adecuados para la selección y la maduración por afinidad. Un anticuerpo de la presente invención puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL sustancialmente tal como se expone en el presente documento, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente tal como se expone en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente tal como se expone" se refiere a que la(s) característica(s) de las CDR relevantes del dominio VH o VL de los anticuerpos descritos en el presente documento, serán o bien idénticas o bien muy similares a las regiones especificadas cuyas secuencias se exponen en el presente documento. Tal como se describe en el presente documento, la frase "muy similar" con respecto a la región/regiones especificada(s) de uno o más dominios variables, contempla que pueden hacerse de 1 a aproximadamente 5, por ejemplo de 1 a 4, incluyendo de 1 a 3, o 1 ó 2, o 3 ó 4, sustituciones de aminoácidos en la CDR y/o el dominio VH o VL.

Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales forman una segunda generación de anticuerpos monoclonales en los que se combinan dos regiones variables diferentes en la misma molécula (Holliger 1999). Su uso se ha demostrado tanto en el campo del diagnóstico como en el campo de la terapia, por su capacidad para reclutar nuevas funciones efectoras o para seleccionar como diana varias moléculas sobre la superficie de células tumorales. Cuando van a usarse anticuerpos biespecíficos, éstos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden producirse de una variedad de formas (Holliger 1993b), por ejemplo pueden prepararse químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente. Estos anticuerpos pueden obtenerse por métodos químicos (Glennie 1987; Repp 1995) o métodos somáticos (Staerz 1986; Suresh 1986), pero igualmente por técnicas de ingeniería genética que permiten forzar la heterodimerización y así facilitar el procedimiento de purificación del anticuerpo buscado (Merchand 1998). Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen los de la tecnología BiTE™ en la que pueden usarse los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad y unirlos directamente mediante péptidos cortos flexibles. Esto combina dos anticuerpos en una única cadena de polipéptido corta. Pueden construirse diacuerpos y scFv sin una región Fc, usando sólo dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de la reacción antiidiotípica.

Pueden construirse anticuerpos biespecíficos como una IgG entera, como Fab'2 biespecífico, como Fab'PEG, como diacuerpos o como scFv biespecífico. Además, dos anticuerpos biespecíficos pueden unirse usando métodos de rutina conocidos en la técnica para formar anticuerpos tetravalentes.

5 Los diacuerpos biespecíficos, en contraposición a los anticuerpos enteros biespecíficos, también pueden ser particularmente útiles porque pueden construirse fácilmente y expresarse en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpos) de especificidades de unión apropiadas pueden seleccionarse fácilmente usando presentación en fago (documento WO94/13804) a partir de bibliotecas. Si va a mantenerse constante un brazo del diacuerpo, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra un antígeno diana, entonces
10 puede prepararse una biblioteca en la que el otro brazo varía y seleccionarse un anticuerpo de especificidad adecuada.

Pueden prepararse anticuerpos enteros biespecíficos por métodos de ingeniería genética alternativos tal como se describe en Ridgeway, 1996.

15 Están disponibles diversos métodos en la técnica para obtener anticuerpos contra un antígeno diana. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, especialmente de origen humano, murino, quimérico o humanizado, que pueden obtenerse según métodos convencionales bien conocidos por el experto en la técnica.

20 En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, puede hacerse referencia 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.

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales, por ejemplo, a partir de una célula animal inmunizada contra A-FN, o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo un fragmento que comprende o consiste en ED-A, o un fragmento de péptido de ED-A. La A-FN, o uno de sus fragmentos, puede producirse especialmente según los métodos de trabajo habituales, por recombinación genética partiendo de una secuencia de ácido nucleico contenida en la secuencia de ADNc que codifica para la A-FN o fragmento de la misma, mediante síntesis de péptidos partiendo de una secuencia de aminoácidos comprendida en
25 la secuencia peptídica de la A-FN y/o fragmento de la misma.

Pueden purificarse anticuerpos monoclonales, por ejemplo, en una columna de afinidad en la que se ha inmovilizado previamente la A-FN o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo un fragmento que comprende o que consiste en ED-A o un fragmento peptídico del ED-A. Pueden purificarse anticuerpos monoclonales por cromatografía sobre proteína A y/o G, seguido o no de cromatografía de intercambio iónico dirigida a eliminar los contaminantes proteicos residuales así como el ADN y los LPS, en sí mismo, seguido o no de cromatografía de exclusión en gel de Sepharose con el fin de eliminar los posibles agregados debido a la presencia de dímeros o de otros multímeros. Todas estas técnicas pueden usarse simultánea o sucesivamente.

40 *Sitio de unión a antígeno*

Esto describe la parte de una molécula que se une y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo se denomina el sitio de unión a antígeno del anticuerpo, y comprende la parte del anticuerpo que se une y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse sólo a una parte particular del antígeno, parte que se denomina epítipo. Un sitio de unión a antígeno del anticuerpo puede proporcionarse por uno o más dominios variables de anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno del anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo.

50 *Aislado*

Esto se refiere al estado en el que en general estarán los anticuerpos y los miembros de unión descritos en el presente documento, y el ácido nucleico que codifica para anticuerpos y miembros de unión. Por tanto, los miembros de unión, dominios VH y/o VL pueden proporcionarse aislados y/o purificados, por ejemplo de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o en el caso del ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origen distinto del de la secuencia que codifica para un polipéptido con la función requerida. Los miembros aislados y el ácido nucleico aislado estarán libres o sustancialmente libres del material con el que están asociados de manera natural, tal 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 es mediante tecnología de ADN recombinante realizada *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y el ácido nucleico pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y todavía para fines prácticos aislarse, por ejemplo los miembros normalmente se mezclarán con gelatina u otros portadores si se usan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usan en diagnóstico o terapia. Los anticuerpos pueden glicosilarse, o bien de manera natural o bien mediante sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo células CHO o NS0 (ECACC 85110503)), o pueden estar no glicosilados

(por ejemplo si se producen por expresión en una célula procariota).

También pueden usarse en la invención 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 diferentes grados de glicosilación y/o con aminoácidos derivatizados, tales como ciclación de un ácido glutámico N-terminal para formar un residuo de ácido piroglutámico.

Pueden obtenerse uno o más anticuerpos para un antígeno, por ejemplo la A-FN o el ED-A de fibronectina, poniendo en contacto una biblioteca de anticuerpos y el antígeno o un fragmento del mismo, por ejemplo, un fragmento que comprende o consiste en ED-A o un fragmento de péptido de ED-A, y seleccionando uno o más anticuerpos de la biblioteca que pueden unirse al antígeno.

Puede examinarse una biblioteca de anticuerpos usando el examen de filtro de colonias iterativo (ICFS). En ICFS, las bacterias que contienen el ADN que codifica para varias especificidades de unión se hacen crecer en un medio líquido y, una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial, se distribuyen varios miles de millones de ellas sobre un soporte de cultivo que consiste en un filtro de membrana tratado previamente de manera adecuada que se incubaba hasta que aparecen colonias de bacterias completamente confluyentes. Un segundo sustrato de captura consiste en otro filtro de membrana, humidificado previamente y cubierto con el antígeno deseado.

Entonces se coloca el filtro de membrana de captura sobre una placa que contiene un medio de cultivo adecuado y se cubre con el filtro de crecimiento con la superficie cubierta con colonias bacterianas apuntando hacia arriba. El sándwich así obtenido se incubaba a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 h. Por tanto, es posible obtener la expresión de los genes que codifican para fragmentos de anticuerpo scFv que tienen una acción de diseminación, de modo que se capturan los fragmentos que se unen específicamente con el antígeno que está presente en la membrana de captura. Entonces se trata la membrana de captura para señalar los fragmentos de anticuerpo scFv unidos con técnicas colorimétricas usadas habitualmente para este fin.

La posición de las manchas coloreadas en el filtro de captura permite volver a las correspondientes colonias bacterianas que están presentes en la membrana de cultivo y producían los fragmentos de anticuerpos capturados. Tales colonias se recogen y se hacen crecer y las bacterias, algunos millones de ellas, se distribuyen sobre una nueva membrana de cultivo repitiendo los procedimientos descritos anteriormente. Entonces se llevan a cabo ciclos análogos hasta que las señales positivas en la membrana de captura correspondan a colonias positivas individuales, cada una de las cuales representa una posible fuente de fragmentos de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno usado en la selección. El ICFS se describe, por ejemplo, en el documento WO0246455.

También puede presentarse una biblioteca sobre partículas o complejos moleculares, por ejemplo paquetes genéticos replicables tales como partículas de bacteriófagos (por ejemplo, T7), u otros sistemas de presentación *in vitro*, conteniendo cada partícula o complejo molecular ácido nucleico que codifica para el dominio variable VH de anticuerpo presentado en el mismo, y opcionalmente también un dominio VL presentado, si está presente. La presentación en fago se describe en el documento WO92/01047 y por ejemplo las patentes estadounidenses US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 y US6521404.

Después de la selección de los anticuerpos que pueden unirse al antígeno y presentados en bacteriófagos u otras partículas o complejos moleculares de bibliotecas, puede tomarse ácido nucleico de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que presenta dicho anticuerpo seleccionado. Tal ácido nucleico puede usarse en la posterior producción de un anticuerpo o un dominio variable VH o VL de anticuerpo mediante expresión a partir de ácido nucleico tomándose la secuencia de ácido nucleico de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que presenta dicho anticuerpo seleccionado.

Un dominio variable VH de anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio variable VH de anticuerpo de dicho anticuerpo seleccionado puede proporcionarse en forma aislada, así como un anticuerpo que comprende un dominio VH de este tipo.

Puede someterse a prueba además la capacidad para unirse a la A-FN o el ED-A de fibronectina u otro antígeno o isoforma diana, por ejemplo, la capacidad para competir con por ejemplo uno cualquiera de los anticuerpos anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9 por la unión a la A-FN o un fragmento de la A-FN, por ejemplo, el ED-A de fibronectina.

Un anticuerpo para su uso en la invención puede unirse a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina específicamente. Un anticuerpo para su uso en la invención puede unirse a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina con la misma afinidad que el anticuerpo anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9, por ejemplo en formato de scFv, o con una afinidad que es mejor. Un anticuerpo para su uso en la invención puede unirse a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina con una K_D de 3×10^{-8} M o una afinidad que es mejor. Preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención se une a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina con una K_D de 2×10^{-8} M o una afinidad que es mejor. Más preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención se une a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina con una K_D

de $1,7 \times 10^{-8}$ M o una afinidad que es mejor. Aún más preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención se une a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina con una K_D de $1,4 \times 10^{-8}$ M o una afinidad que es mejor. Lo más preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención se une a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina con una K_D de 3×10^{-9} M o una afinidad que es mejor.

5 Un anticuerpo para su uso en la presente invención puede unirse al mismo epítipo en A-FN y/o el ED-A de fibronectina que el anticuerpo anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9.

10 Un anticuerpo para su uso en la invención puede no mostrar ninguna unión significativa a moléculas distintas de la A-FN y/o el ED-A de fibronectina. En particular, el anticuerpo puede no unirse a otras isoformas de fibronectina, por ejemplo la isoforma ED-B y/o la isoforma IIIICS de fibronectina.

15 Las variantes de moléculas de anticuerpo dadas a conocer en el presente documento pueden producirse y usarse en la presente invención. Las técnicas requeridas para hacer sustituciones dentro de las secuencias de aminoácidos de CDR, dominios VH y VL de anticuerpo y anticuerpos, en general están disponibles en la técnica. Pueden hacerse secuencias variantes con sustituciones que puede predecirse o no que tienen un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, y puede someterse a prueba la capacidad para unirse A-FN y/o el ED-A de fibronectina y/o cualquier otra propiedad deseada.

20 Las variantes de la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se dan a conocer específicamente en el presente documento pueden emplearse según la presente invención, tal como se ha comentado. Las variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido), pueden ser de menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de aproximadamente 10 alteraciones o menos de aproximadamente 5 alteraciones, pueden ser 5, 4, 3, 2 ó 1. Las alteraciones pueden hacerse en una o más regiones de entramado y/o una o más CDR. Las alteraciones normalmente no dan como resultado la pérdida de función, de modo que un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos así alterada puede conservar la capacidad para unirse a A-FN y/o el ED-A de fibronectina. Por ejemplo, puede conservar la misma unión cuantitativa que un anticuerpo en el que no se ha hecho la alteración, medido por ejemplo en un ensayo descrito en el presente documento. El anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos así alterada puede tener una capacidad mejorada para unirse a A-FN y/o el ED-A de fibronectina.

35 Pueden generarse regiones VH o VL novedosas que portan secuencias derivadas de CDR usando mutagénesis al azar de uno o más genes de VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro del dominio variable entero. Por ejemplo, se hacen una o dos sustituciones de aminoácidos dentro de un dominio variable entero o conjunto de CDR. Otro procedimiento que puede usarse es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de genes de VH o VL.

40 Tal como se indicó anteriormente, una secuencia de aminoácidos de CDR sustancialmente tal como se expone en el presente documento puede portarse como una CDR en un dominio variable de anticuerpo humano o una parte sustancial del mismo. Las secuencias de HCDR3 sustancialmente tal como se expone en el presente documento representan realizaciones de la presente invención y por ejemplo cada una de éstas puede portarse como una HCDR3 en un dominio variable de cadena pesada humano o una parte sustancial del mismo.

45 Pueden obtenerse o derivarse dominios variables de cualquier línea germinal o dominio variable humano reorganizado, o puede ser un dominio variable sintético basado en secuencias consenso o reales de dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable puede derivarse de un anticuerpo no humano. Puede introducirse una secuencia de CDR (por ejemplo CDR3) en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (por ejemplo CDR3), usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, Marks *et al.* (1992) describen métodos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que se usan cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' de la zona del dominio variable conjuntamente con cebadores consenso para la tercera región de entramado de genes de VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una CDR3. Marks *et al.* describen además cómo este repertorio puede combinarse con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención pueden intercambiarse con repertorios de dominios de VH y VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos intercambiados pueden combinarse con un dominio VL o VH relacionado para proporcionar anticuerpos para su uso en la invención. El repertorio puede presentarse entonces en un sistema huésped adecuado tal como el sistema de presentación en fago del documento WO92/01047, o cualquiera de un extenso conjunto de bibliografía posterior, incluyendo Kay, Winter y McCafferty (1996), de modo que pueden seleccionarse anticuerpos adecuados. Un repertorio puede consistir en cualquiera a partir de 10^4 miembros individuales hacia arriba, 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.

60 De manera similar, una o más, o las tres CDR pueden injertarse en un repertorio de dominios VH y VL que entonces se examina para detectar un anticuerpo o anticuerpos para la A-FN y/o el ED-A de fibronectina.

65 Puede emplearse una o más de las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7,

E8 o G9, o el conjunto de HCDR, y/o puede emplearse una o más de las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9 o el conjunto de LCDR del anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9.

- 5 De manera similar, pueden emplearse otros dominios VH y VL, conjuntos de CDR y conjuntos de HCDR y/o conjuntos de LCDR dados a conocer en el presente documento.

La A-FN y/o el ED-A de fibronectina pueden usarse también en un examen para detectar moléculas de anticuerpo, para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un linfoma. El examen puede ser un examen de un repertorio tal como se da a conocer en otra parte en el presente documento.

15 Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina puede comprender al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones de entramado intermedias. La parte también puede incluir al menos aproximadamente el 50% de cualquiera o ambas de las regiones de entramado primera y cuarta, siendo el 50% el 50% C-terminal de la primera región de entramado y el 50% N-terminal de la cuarta región de entramado. Residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos que normalmente no están asociados con regiones de dominio variable que se producen de manera natural. Por ejemplo, la construcción de anticuerpos producidos por técnicas de ADN recombinante pueden dar como resultado la introducción de residuos N- o C-terminales codificados por ligadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de ligadores para unir dominios variables dados a conocer en otra parte en el presente documento a secuencias de proteína adicionales incluyendo regiones constantes de anticuerpo, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o marcadores detectables/funcionales tal como se comenta con más detalle en otra parte en el presente documento.

25 Aunque los anticuerpos pueden comprender una pareja de dominios VH y VL, también pueden usarse dominios de unión individuales basados en secuencias de dominios VH o VL en la invención. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina individuales, especialmente los dominios VH, pueden unirse a antígenos diana de una manera específica. Por ejemplo, véase la discusión de los dAb anterior.

30 En el caso de cualquiera de los dominios de unión individuales, estos dominios pueden usarse para examinar dominios complementarios que pueden formar un anticuerpo de dos dominios que puede unirse a A-FN y/o el ED-A de fibronectina. Esto puede conseguirse por métodos de examen de presentación in fago usando el denominado enfoque combinatorio doble jerárquico, tal como se da a conocer en el documento WO92/01047, en el que una colonia individual que contiene un clon de cadena o bien H o bien L se usa para infectar una biblioteca completa de clones que codifican para la otra cadena (L o H) y el anticuerpo de dos cadenas resultante se selecciona según las técnicas de presentación in fago, tales como las descritas en esa referencia. Esta técnica también se da a conocer en Marks, 1992.

40 Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden comprender además regiones constantes de anticuerpo o partes de las mismas, por ejemplo regiones constantes de anticuerpo humano o partes de las mismas. Por ejemplo, puede unirse un dominio VL en su extremo C-terminal a dominios constantes de cadena ligera de anticuerpo incluyendo las cadenas C κ o C λ humanas, por ejemplo, C λ . De manera similar, un anticuerpo basado en un dominio VH puede unirse en su extremo C-terminal a toda o parte (por ejemplo, un dominio CH1) de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM, y cualquiera de las subclases de isotipos, en particular IgG1 e IgG4. Cualquier variante de región constante sintética u otra que tenga estas propiedades y establezca las regiones variables también es útil en realizaciones de la presente invención.

50 Los anticuerpos para su uso en la invención pueden marcarse con un marcador detectable o funcional. Un marcador puede ser cualquier molécula que produce o que puede inducir la producción de una señal, incluyendo, pero sin limitarse a, agentes que fluorescen, radiomarcadores, enzimas, agentes quimioluminiscentes o fotosensibilizadores. Por tanto, la unión puede detectarse y/o medirse detectando la fluorescencia o luminiscencia, radiactividad, actividad enzimática o absorbancia de luz. Los marcadores detectables pueden unirse a anticuerpos para su uso en la invención usando química convencional conocida en la técnica.

55 Hay numerosos métodos mediante los cuales el marcador puede producir una señal detectable por medios externos, por ejemplo, mediante examen visual, radiación electromagnética, calor y reactivos químicos. El marcador también puede unirse a otro miembro de unión que se une al anticuerpo para su uso en la invención, o a un soporte.

60 Los anticuerpos marcados, por ejemplo scFv marcado con un marcador detectable, pueden usarse con fines de diagnóstico *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, y/o terapéuticos.

65 Por ejemplo, los anticuerpos radiomarcados (por ejemplo, anticuerpos conjugados con un radioisótopo) pueden usarse en radiodiagnóstico y radioterapia. Los radioisótopos que pueden conjugarse con un anticuerpo para su uso en la invención incluyen isótopos tales como ⁹⁴mTc, ⁹⁹mTc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²⁰³Pb, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁴⁷Sc, ¹¹¹In, ⁹⁷Ru, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ¹²¹Sn, ¹⁶¹Tb, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁰⁵Rh, ¹⁷⁷Lu, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I y ¹³¹I.

Por ejemplo, un anticuerpo para su uso en la invención marcado con un marcador detectable puede usarse para detectar, diagnosticar o monitorizar un linfoma en un ser humano o animal.

5 Un anticuerpo tal como se da a conocer en el presente documento puede usarse para la fabricación de un producto de diagnóstico para su uso en el diagnóstico de un linfoma.

La invención también proporciona un anticuerpo para su uso en un método *in vivo* de diagnóstico de linfoma en un ser humano o animal, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

10 (a) administrar al ser humano o animal un anticuerpo, por ejemplo marcado con un marcador detectable, que se une a la isoforma ED-A de fibronectina y/o al ED-A de fibronectina, y

15 (b) determinar la presencia o ausencia del anticuerpo en el sistema linfático del cuerpo humano o animal;

en el que la localización del anticuerpo en el sistema linfático en el ser humano o animal indica la presencia de un linfoma.

20 Cuando el anticuerpo está marcado con un marcador detectable, la presencia o ausencia del marcador detectable puede determinarse detectando el marcador.

En la presente invención puede emplearse un conjugado o fusión entre un anticuerpo para su uso en la invención y una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre 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- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral α (TNF α) o factor tisular (preferiblemente truncado). Tales conjugados pueden usarse de manera terapéutica, por ejemplo para el tratamiento de linfoma tal como se menciona en el presente documento.

30 La producción y el uso de fusiones o conjugados de anticuerpos con moléculas biocidas o citotóxicas se describe por ejemplo en el documento WO 01/62298.

También se da a conocer en el presente documento un método de tratamiento de linfoma, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un anticuerpo para su uso en la invención.

35 El anticuerpo puede ser un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre células diana mediante interacción celular y (ii) un anticuerpo para la isoforma ED-A de fibronectina y/o el ED-A de fibronectina.

40 La invención también proporciona el uso de un anticuerpo para su uso en la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un linfoma.

45 El anticuerpo puede estar conjugado o fusionado con una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico tal como se describe en el presente documento. El anticuerpo puede ser un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre células diana mediante interacción celular y (ii) un anticuerpo para fibronectina humana tal como se describe en el presente documento.

50 También se describe en el presente documento un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre células diana mediante interacción celular y (ii) un anticuerpo para fibronectina humana según el uso en la presente invención. Un conjugado de este tipo comprende preferiblemente una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y dicho anticuerpo o, cuando el miembro de anticuerpo es una cadena doble o cadena múltiple, una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y un componente de la cadena polipeptídica de dicho anticuerpo. Preferiblemente, el anticuerpo es un polipéptido de cadena sencilla, por ejemplo una molécula de anticuerpo de cadena sencilla, tal como scFv. También puede usarse en la invención una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y una molécula de anticuerpo Fv de cadena sencilla.

60 La molécula biocida o citotóxica que ejerce su efecto sobre células diana mediante interacción celular, puede interactuar directamente con las células diana, puede interactuar con un receptor unido a la membrana en la célula diana o alterar el potencial electroquímico de la membrana celular. Las moléculas que interactúan con un receptor unido a la membrana incluyen quimiocinas, citocinas y hormonas. Los compuestos que alteran el potencial electroquímico de la membrana celular incluyen hemolisina, ionóforos, fármacos que actúan sobre canales iónicos. En realizaciones preferidas a modo de ejemplo, la molécula es la interleucina-2, factor tisular (preferiblemente truncado) o doxorubicina. Otras realizaciones pueden usar interleucina-12, interferón gamma, IP-10 y factor de necrosis tumoral α (TNF- α).

65

Tal como se comenta con más detalle a continuación, un miembro de unión específica tal como se le hace referencia en el presente documento es preferiblemente un anticuerpo. De manera conveniente, el anticuerpo puede ser un polipéptido de cadena sencilla, tal 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 factor tisular). Puede proporcionarse un sitio de unión a antígeno del anticuerpo mediante la asociación de un dominio VH de anticuerpo y un dominio VL de anticuerpo en polipéptidos separados, por ejemplo en un anticuerpo completo o en un fragmento de anticuerpo tal como Fab o diacuerpo. Cuando el anticuerpo es una molécula de dos cadenas o múltiples cadenas (por ejemplo, Fab o anticuerpo completo, respectivamente), la molécula biocida o citotóxica puede conjugarse como un polipéptido de fusión con una o más cadenas de polipéptido en el anticuerpo.

El anticuerpo puede conjugarse con la molécula biocida o citotóxica mediante un enlace peptídico, es decir, dentro de un polipéptido de fusión que comprende dicha molécula y el anticuerpo o un componente de cadena polipeptídica del mismo. Véase Taniguchi *et al.* (1983) *Nature* 302, 305-310; MaED-A *et al.* (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 115: 1040-1047; Devos *et al.* (1983) *Nucl. Acids Res.* 11: 4307-4323 para la información de la secuencia de IL-2 útil en la preparación de un polipéptido de fusión que comprende IL-2. La información de la secuencia para el factor tisular truncado se proporciona por Scarpati *et al.* (1987) *Biochemistry* 26: 5234-5238, y Ruf *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 226: 15719-15725. Otros medios para la conjugación incluyen conjugación química, especialmente reticulación usando un reactivo bifuncional (por ejemplo empleando DOUBLE-REAGENTS™ Cross-linking Reagents Selection Guide, Pierce).

Cuando se desea una liberación lenta, por ejemplo cuando la molécula biocida o citotóxica es doxorubicina u otra molécula que altera el potencial electroquímico de la membrana celular, la conjugación química puede ser mediante la formación de una base de Schiff (imina) entre un grupo amino primario del anticuerpo o fragmento de anticuerpo y un resto de azúcar oxidado (daunosamina) de la molécula biocida o citotóxica tal como doxorubicina.

También se describe en el presente documento un ácido nucleico aislado que codifica para un anticuerpo para su uso en la presente invención. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN. Un ácido nucleico puede codificar para una CDR o conjunto de CDR, o dominio VH o dominio VL o sitio de unión a antígeno del anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG, por ejemplo IgG1, como se definió anteriormente. La secuencia de nucleótidos puede codificar para los dominios VH y/o VL dados a conocer en el presente documento.

También se describen en el presente documento constructos en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido como se describió anteriormente.

También se describe una célula huésped recombinante que comprende uno o más constructos como anteriormente. Se describe un ácido nucleico que codifica para cualquier CDR o conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión a antígeno del anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG1 o IgG4 tal como se proporciona, así como un método de producción del producto codificado, método que comprende la expresión a partir de ácido nucleico codificante. La expresión puede conseguirse de manera conveniente mediante cultivo en condiciones apropiadas de células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Tras la producción por expresión, puede aislarse y/o purificar un dominio VH o VL, o anticuerpo, usando cualquier técnica adecuada, y luego usarse según sea apropiado.

Un ácido nucleico puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos tal como se expone en el presente documento abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que la T se sustituye por el U, a menos que el contexto requiera lo contrario.

También se describe un método de producción de un dominio variable VH de anticuerpo, incluyendo el método provocar la expresión a partir de un ácido nucleico codificante. Un método de este tipo puede comprender cultivar células huésped en condiciones para la producción de dicho dominio variable VH de anticuerpo.

Un método de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto. Un método de producción puede comprender formular el producto en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se conocen bien sistemas para clonar y expresar un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, hongos filamentosos, levaduras y sistemas de baculovirus y plantas y animales transgénicos. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariontas está bien establecida en la técnica. Para una revisión véase, por ejemplo, Plückthun 1991. Un huésped bacteriano común es *E. coli*.

También está disponible para los expertos en la técnica la expresión en células eucariotas en cultivo, como opción para la producción de un anticuerpo, por ejemplo Chadd y Chamow (2001), Andersen y Krummen (2002), Larrick y Thomas (2001). Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido

heterólogo incluyen células de ovario 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 renales embrionarias humanas, células de retina embrionaria humana y muchas otras.

5 Pueden elegirse o construirse vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras adecuadas, incluyendo 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 virales por ejemplo, fago, según sea adecuado. Para más detalles véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001).
 10 Se describen en detalle muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, en Ausubel 1999.

15 Una célula huésped puede contener un ácido nucleico tal como se describe en el presente documento. Una célula huésped de este tipo puede estar *in vitro* y puede estar en cultivo. Una célula huésped de este tipo puede estar *in vivo*. La presencia *in vivo* de la célula huésped puede permitir la expresión intracelular de un anticuerpo para su uso en la presente invención como "intracuerpos" o anticuerpos intracelulares. Pueden usarse intracuerpos para terapia génica.

20 También se da a conocer un método que comprende introducir un ácido nucleico dado a conocer en el presente documento 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 usando retrovirus u otro virus, por ejemplo, virus vaccinia, o para células de insecto, baculovirus. Para la introducción del ácido nucleico en la célula huésped, en particular en una célula eucariota, puede usarse un sistema viral o basado en plásmido. El sistema de plásmido
 25 puede mantenerse de manera episomal o puede incorporarse en la célula huésped o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser o bien por integración aleatoria o bien dirigida de una o más copias en un único locus o múltiples locus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos.

30 A la introducción le puede seguir provocar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo cultivando las células huésped en condiciones para la expresión del gen. La purificación del producto expresado puede lograrse por procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

35 El ácido nucleico puede integrarse en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración puede promoverse mediante la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, según técnicas convencionales.

40 También se describe un método que comprende usar un constructo tal como se estableció anteriormente en un sistema de expresión con el fin de expresar un anticuerpo o polipéptido tal como también se ha descrito anteriormente.

45 Los anticuerpos para su uso en la presente invención se diseñan para usarse en métodos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, por ejemplo en el ser humano. Los anticuerpos para su uso en la invención pueden usarse en el diagnóstico o tratamiento de linfoma.

50 Por consiguiente, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de este tipo en la fabricación de un medicamento para la administración, por ejemplo, en un método de preparación de un medicamento o una composición farmacéutica que comprende formular el miembro de anticuerpo con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Se conocen bien vehículos farmacéuticamente aceptables y el experto en la técnica los adaptará en función de la naturaleza y el modo de administración del/de los compuesto(s) activo(s) elegido(s).

55 Los anticuerpos para su uso en la presente invención se administrarán normalmente en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del anticuerpo. Por tanto, las composiciones farmacéuticas según la presente invención, y para su uso según la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, portador, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por el experto en la técnica. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza exacta del portador u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, inhalada o mediante inyección, por ejemplo, intravenosa.

60 Las composiciones farmacéuticas para administración oral, tales como por ejemplo nanocuerpos, etc. también se prevén en la presente invención. Tales formulaciones orales pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo, líquido o semisólido. Un comprimido puede comprender un portador sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas en general comprenden un portador líquido tal como agua, vaselina, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse disolución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.
 65

Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de la afección, el principio activo estará en forma de una disolución acuosa aceptable por vía parenteral que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica podrán preparar disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer con lactato. Pueden emplearse conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera. Los expertos en la técnica conocen muchos métodos para la preparación de formulaciones farmacéuticas. Véase, por ejemplo, Robinson, 1978.

Puede administrarse una composición sola o en combinación con otros tratamientos, de manera simultánea o secuencial, o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, dependiendo de la afección que va a tratarse.

Puede usarse un anticuerpo para su uso en la presente invención como parte de una terapia de combinación conjuntamente con un componente medicinal adicional. Los tratamientos de combinación pueden usarse para proporcionar efectos sinérgicos significativos, en particular la combinación de un anticuerpo para su uso en la presente invención con uno o más fármacos distintos. Un anticuerpo para su uso en la presente invención puede administrarse de manera simultánea o secuencial o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, para el tratamiento de uno o más de los estados enumerados en el presente documento.

Por ejemplo, un anticuerpo para su uso en la invención puede usarse en combinación con un agente terapéutico existente para el tratamiento de linfoma.

Los agentes terapéuticos existentes para el tratamiento de linfomas no Hodgkin incluyen: rituximab; y Cytosan, hidroxirubicina (adriamicina), Onvobin (vincristina) y prednisona en combinación (régimen de quimioterapia CHOP).

Los agentes terapéuticos existentes para el tratamiento de linfomas de Hodgkin incluyen: adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina en combinación (régimen de quimioterapia ABVD).

Puede usarse un anticuerpo para su uso en la invención y uno o más de los componentes medicinales adicionales anteriores en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para la administración separada o combinada a un individuo, y por consiguiente puede comprender el anticuerpo y el componente adicional como una preparación combinada o como preparaciones separadas. Pueden usarse preparaciones separadas para facilitar la administración separada y secuencial o simultánea, y permiten la administración de los componentes por vías diferentes, por ejemplo, administración oral y parenteral.

Según la presente invención, las composiciones proporcionadas pueden administrarse a mamíferos. La administración puede ser en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Dicho beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la velocidad y el transcurso de tiempo de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que está tratándose, el mamífero particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración de la composición, el tipo de anticuerpo, el método de administración, el calendario de administración y otros factores conocidos por los profesionales médicos. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los profesionales sanitarios y otros doctores en medicina, y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o el avance de la enfermedad que está tratándose. Las dosis adecuadas del anticuerpo se conocen bien en la técnica (Ledermann 1991 y Bagshawe 1991). Pueden usarse las dosificaciones específicas indicadas en el presente documento o en Physician's Desk Reference (2003) según sean apropiadas para el tipo de medicamento que está administrándose. Una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis adecuada de un anticuerpo para su uso en la invención puede determinarse comparando su actividad *in vitro* y actividad *in vivo* en un modelo animal. Se conocen métodos de extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de prueba a seres humanos. La dosis exacta dependerá de varios de factores, incluyendo si el anticuerpo es para diagnóstico, prevención o para tratamiento, el tamaño y la ubicación de la zona que va a tratarse, la naturaleza exacta del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo entero, fragmento o diacuerpo), y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo de 100 µg a 1 g para aplicaciones sistémicas, y de 1 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. Puede administrarse una dosis de carga inicial superior, seguida de una o más dosis inferiores. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo entero, por ejemplo, el isotipo IgG1 o IgG4. Esta es una dosis para un único tratamiento de un paciente adulto, que puede ajustarse de manera proporcional para niños y lactantes, y también puede ajustarse para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse diariamente, dos veces a la semana, a intervalos semanales o mensuales, a discreción del médico. Los tratamientos pueden ser cada dos a cuatro semanas para la administración subcutánea y cada cuatro a ocho semanas para la administración intravenosa. En algunas realizaciones de la presente invención, el tratamiento es periódico, y el periodo entre administraciones es de aproximadamente dos semanas o más, por ejemplo, aproximadamente tres semanas o más, aproximadamente cuatro semanas o más, o aproximadamente una vez al mes. En otras realizaciones de la invención, el tratamiento puede administrarse antes y/o después de una cirugía, y puede administrarse o aplicarse directamente en el sitio anatómico de tratamiento quirúrgico.

Otros aspectos y realizaciones de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica dada la presente descripción que incluye los siguientes ejemplos experimentales.

Parte experimental

5

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpos

10 El aislamiento del fragmento de anticuerpo scFv anti-ED-B (L19) se ha descrito previamente (Pini *et al.* 1998). El anticuerpo anti-ED-A original se aisló de la biblioteca ETH-2 usando procedimientos publicados (Giovannoni, Nucleic. Acid Research, 2001, 29 (5): E27). La maduración por afinidad del anticuerpo anti-ED-A original, que produce los anticuerpos anti-ED-A de alta afinidad, se describe en la siguiente sección.

15 *Maduración por afinidad del anticuerpo anti-ED-A original*

Se usó el anticuerpo anti-ED-A original (un anticuerpo derivado de ETH-2) como molde para la construcción de una biblioteca de maduración por afinidad. Se introdujo mediante PCR variabilidad de secuencia en la CDR1 de VH (línea germinal DP47) y CDR1 de VL (línea germinal DPK22) de la biblioteca usando los cebadores parcialmente degenerados 5'-CTGGAGCCTGGCGGACCCAGCTCATMNNMNNMNNNGCTAAAGGTGAATCCAGA-3' (SEQ ID NO: 17) para VH y 5'-CCAGGTTTCTGCTGGTACCAGGCTAAMNNMNNMNNNGCTAACACTCTGACTGGCCCTGC-3' (SEQ ID NO: 18) para VL (todos los oligonucleótidos se adquirieron de Operon Biotechnologies, Colonia, Alemania), en un procedimiento que genera mutaciones al azar en las posiciones 31, 32 y 33 de la CDR1 de VH y en las posiciones 31, 31a y 32 de la CDR1 de VL. Se ensamblaron las combinaciones de VHVL en un formato de scFv mediante ensamblaje por PCR usando los cebadores LMB3long (5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3') (SEQ ID NO: 19) y fdseqlong (5'-GACGTTAGTAAATGAATTTCTGTATGAGG-3') (SEQ ID NO: 20), usando segmentos de VH y VL purificados en gel como moldes. Se trataron los fragmentos de VH-VL ensamblados por digestión doble con NcoI/NotI y se clonaron en el vector de fagémido pHEN1 digerido con NcoI/NotI (Hoogenboom *et al.*, 1991). Se sometió a electroporación el producto de ligamiento resultante en células TG-1 de *E. coli* electrocompetentes según (Viti *et al.*, 2000), dando lugar a una biblioteca que contenía $1,5 \times 10^7$ clones de anticuerpo individuales, que se examinó para detectar anticuerpos que se unían a ED-A con una afinidad mejorada.

Selección de anticuerpos anti-ED-A

35 Se examinó la biblioteca de anticuerpos descrita anteriormente para detectar anticuerpos que se unían a ED-A con una afinidad mayor que el anticuerpo anti-ED-A original usando análisis de BIAcore. El antígeno (11A12) usado en el análisis de BIAcore contenía el dominio ED-A de fibronectina humana y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 120):

```
MRSYRTEIDKPSQMQVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQ
TEMTIEGLQPTVEYVVSVAQNPSGESQPLVQTAVTNI DRPKGLAFTDVDVDSIKIAWES
PQGQVSRYRVTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPL
IGTQSTAI PAPTDLKFTQVTPTSLSAQWTPPNVQLTGYRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDS
SSVVVSGLMVATKYEVSVAALKDTLTSRPAQGVVTTLENVRSHHHHHH
```

40

La secuencia de nucleótidos del antígeno (11A12) (SEQ ID NO: 121) es tal como sigue:

```
atgagatcctaccgaacagaaattgacaaaccatcccagatgcaagtgaccgatgttcaggacaaca
gcattagtgtcaagtggtgcttcaagttcccctgttactggttacagagtaaccaccactcccaa
aaatggaccaggaccaacaaaaactaaaactgcaggtccagatcaaacagaaatgactattgaaggc
```

ttgcagccacagtgaggatgtggttagtgctctatgctcagaatccaagcggagagagtcagcctc
 tggttcagactgcagtaaccaacattgatcgccctaaaggactggcattcactgatgtggatgtcga
 ttccatcaaaattgcttgggaaagcccacaggggcaagtttccaggtaacagggtgacctactcgagc
 cctgaggatggaatccatgagctattccctgcacctgatgggtaagaagacactgcagagctgcaag
 gcctcagaccgggttctgagtacacagtcagtggttgccttgcacgatgatatggagagccagcc
 cctgattggaaccagtcacacagctattcctgcaccaactgacctgaagttcactcaggtcacacc
 acaagcctgagcgcaccagtggaaccacccaatgttcagctcactggatatacagtgcgggtgacc
 ccaaggagaagaccggaccaatgaaagaaatcaaccttgctcctgacagctcatccgtggttgatc
 aggacttatggtggccaccaataatgaagtgagtgctctatgctcttaaggacactttgacaagcaga
 ccagctcagggagttgtcaccactctggagaatgtcagatctcatcaccatcaccatcactaa

5 Se amplificó por PCR la secuencia de nucleótidos del antígeno usando cebadores que contenían los sitios de restricción BamHI y BgIII en 5' y 3' respectivamente. Se digirieron el producto de PCR resultante y el vector pQE12 (QIAGEN) con las endonucleasas de restricción BamHI y BgIII y posteriormente se ligaron en una reacción que contenía una razón de inserto con respecto a vector de 3:1. Se secuenció el vector resultante para comprobar que la secuencia era correcta.

10 Se preparó el antígeno tal como sigue:

15 Se sometió a electroporación un precultivo electrocompetente de TG1 en 10 ml de 2TY, Amp, glucosa al 1%, en presencia de 1 µl de una miniprep. de ADN de 11A12. Entonces se diluyó el precultivo 1:100 (8 ml en 800 ml de 2TY, Amp, glucosa al 0, 1%) y se hizo crecer hasta una DO600 de 0, 4-0, 6 y entonces se indujo con IPTG durante la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las células y se filtró el sobrenadante (Millipore 0,22 µm). Después de la centrifugación y clarificación del caldo de cultivo, se purificó 11A12 usando una columna Hitrap sobre FPLC. Se regeneró la columna de Ni/ tal como sigue: se enjuagó la columna con 5 volúmenes de columna (VC) de H2O seguido de la aplicación de 3 VC de EDTA 0, 5 M/Tris 0, 2 M pH 8 para lavar el níquel antiguo de la columna. A esto le siguió el enjuagado de la columna con 5 VC de H2O. Entonces volvió a cargarse la columna con 2 VC de NiSO4 100 mM seguido del enjuagado de la columna con varios VC de H2O. Entonces se equilibró la columna con 5 VC de tampón de lisis (imidazol 20 mM/NaCl 250 mM/PBS pH 7, 4). Se filtró el lisado celular (Millipore 0, 45 µm) y se cargó sobre la columna (manualmente). Entonces se puso de nuevo la columna sobre FPLC y se dejó que el tampón de lisis fluyera hasta que la señal UV era estable (constante), aproximadamente 3 VC. Entonces se inició el programa de elución: gradiente del 0% al 100% de tampón de elución (imidazol 400 mM/NaCl 250 mM/PBS pH 7, 4) en 5 VC. Se agruparon las fracciones que contenían el antígeno eluido y se dializaron en PBS durante la noche.

25 Expresión y purificación de los anticuerpos anti-ED-A

30 Se expresaron y purificaron los anticuerpos anti-ED-A tal como sigue: Se sometió a electroporación un precultivo electrocompetente de TG1 en 10 ml de 2TY, Amp, glucosa al 1%, en presencia de 1 µl de una miniprep. de ADN de uno de los anticuerpos anti-ED-A. Entonces se diluyó el precultivo 1:100 (8 ml en 800 ml de 2TY, Amp, glucosa al 0,1%) y se cultivó hasta una DO600 de 0,4-0,6 y entonces se indujo con IPTG durante la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las células y se filtró el sobrenadante (Millipore 0,22 µm). Se purificó el scFv en una columna de proteína A-Sepharose y se usó trietilamina para eluir los scFv de la columna. Se dializaron las fracciones que contenían los scFv eluidos en PBS durante la noche a 4°C. Entonces se pusieron las fracciones de scFv en una columna Superdex 75 con PBS fluyendo a 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 0,25 ml. Se usaron las fracciones monoméricas para el análisis de BIAcore.

35 Análisis de BIAcore 1

40 Se lavó el chip de BIAcore durante la noche a una velocidad de flujo de 5 µl/min con tampón de 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 para el ensayo). Se diluyó el antígeno (11A12) hasta una concentración de 50 µg/ml en tampón acetato (pH 4,0) y se activaron los grupos COOH en el chip mediante inyección de 50 µl de una mezcla de N-hidroxisuccinimida (NHS) y etil-N-(dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC). Se inyectaron 40 µl del antígeno 11A12 sobre el chip y se bloquearon los grupos COOH libres residuales con 30 µl de etanolamina. Después de una filtración a través de 0,22 µm, se inyectaron 20 µl de cada sobrenadante bacteriano individual sobre el chip y se monitorizó la interacción con el antígeno en tiempo real.

Análisis de BIAcore 2

Se evaluaron la k_{on} , k_{off} y K_D del anticuerpo anti-ED-A original y los anticuerpos anti-ED-A B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 usando resonancia de plasmones superficiales. Se equilibró el chip durante la noche con el mismo tampón usado durante el ensayo a una velocidad de flujo de tampón de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Se realizó el procedimiento de recubrimiento entero a esta velocidad de flujo. Se diluyó el antígeno 11A12 1:25 con tampón acetato pH 4,00 (proporcionado por BIACORE) hasta una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Entonces se mezclaron NHS y EDC y se inyectaron 50 μl para activar los grupos COOH en el chip CM5. A esto le siguió la inyección de 40 μl del antígeno (esto dura aproximadamente 40 min). Entonces se inyectaron 30 μl de etanolamina con el fin de bloquear la reactividad de los posibles COOH libres.

Se sometió a ensayo cada muestra a una velocidad de flujo de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Se inyectaron 20 μl de la proteína monomérica no diluida (tal como sale de la filtración en gel). Se dejó que transcurriera el tiempo de disociación durante aproximadamente 200 min. Entonces se inyectaron 10 μl de HCl 10 mM para regenerar el chip. Se repitió la inyección de proteína monomérica a diferentes diluciones, es decir, dilución 1:2 (en PBS) seguido de regeneración con HCl. A esto le siguió una tercera inyección de la proteína, a una dilución 1:4 seguido de nuevo de la regeneración con HCl. Se evaluaron los valores de k_{on} , k_{off} y K_D para cada anticuerpo anti-ED-A usando el software BIAevaluation.

Inmunohistoquímica de secciones de linfoma

Se fijaron secciones de linfoma de Ramos en acetona fría (-20°C) durante 10 minutos y se dejaron secar los portaobjetos a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos. Entonces se sumergieron los portaobjetos en TBS durante de 5 a 10 minutos y se secó la parte posterior de los portaobjetos con papel sin tocar las secciones. A esto le siguió el bloqueo de las secciones con > 100 μl de suero de ternero fetal (FCS) al 20% en TBS (TRIS 50 mM, NaCl 100 mM, ajustado a pH 7,4, aprotinina al 0,01%) durante 30 minutos. Se vertió la disolución de bloqueo y se sumergieron los portaobjetos en TBS durante 5 min. Entonces se añadieron a los portaobjetos 100 μl de anticuerpo primario scFv F8 (~20 ng/ μl) que portaba una etiqueta myc, junto con 10 μl de anticuerpo anti-myc biotinilado 9E10 (DO 0,25, diluido 1:20) diluido en TBS/BSA al 3%. Como control negativo, se realizó la tinción inmunohistoquímica de una sección de linfoma de Ramos de la misma manera pero omitiendo el anticuerpo primario, es decir el anticuerpo scFv anti-ED-A F8 etiquetado con myc. Se incubaron los portaobjetos en una cámara de humedad durante 1 h. Se lavaron los portaobjetos con TBS seguido de la adición de estreptavidina-fosfatasa alcalina diluida 1:150 en TBS/BSA al 3% e incubación en una cámara de humedad durante 30 min. Entonces se lavaron los portaobjetos con TBS dos veces durante 5 min y se secó la parte posterior de los portaobjetos con papel. Se añadieron a cada portaobjetos 500 μl del sustrato Fast Red (5 mg de polvo de FastRed añadidos a 5 ml de disolución de Fast Red [49 ml de TRIS-HCl, 0,1 M, pH 8,2; 1,0 ml de N,N-dimetilformamida; 10 mg de fosfato de naftol AS-MX y 50 μl de disolución de levamisol (1 ml de TRIS-HCl 0,1 M pH 8,2, 240,8 mg de polvo de levamisol)]) y se filtraron con un filtro con un tamaño de poro de 0,45 μl , y se incubaron los portaobjetos en una cámara de humedad durante 15 min. Se lavaron los portaobjetos 2 veces con agua desionizada aplicando directamente el agua desionizada en cada sección con una pipeta Pasteur de plástico y entonces se dejaron en agua. Entonces se transfirieron los portaobjetos a una disolución de hematoxilina Gillis durante 50 min, seguido de una transferencia rápida a agua y enjuagado con agua 6 veces. Finalmente, se montaron los portaobjetos con medio de montaje Glycergel (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) y se analizaron con un microscopio Axiovert S100 TV (Carl Zeiss, Feldbach, Suiza) usando el software Axiovision (Carl Zeiss).

Tinción por inmunohistoquímica de secciones de cáncer de pulmón

Se tiñeron de manera inmunohistoquímica secciones de un cáncer de pulmón de células pequeñas (carcinoma de células pequeñas) y de varios cánceres de pulmón de células no pequeñas (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma bronquioalveolar y carcinoma de células grandes) con un anticuerpo scFv anti-ED-A que portaba una etiqueta myc, tal como se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, Brack *et al.* 2006). Brevemente, se incubaron las secciones con el anticuerpo scFv anti-ED-A D5 (concentración final, 2-15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y con el anticuerpo secundario (anticuerpo monoclonal anti-myc 9E10) simultáneamente. Se detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulina de ratón (Dakocytomation, Glostrup, Dinamarca) seguido de complejo monoclonal de ratón de fosfatasa alcalina-anti-fosfatasa alcalina (Dakocytomation). Se usó Fast Red (Sigma) como sustrato de fosfatasa, y se contratiñeron las secciones con hematoxilina (Sigma). Finalmente, se montaron las secciones en Glycergel (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) y se analizaron con un microscopio Axiovert S100 TV (Carl Zeiss, Feldbach, Suiza) usando el software Axiovision (Carl Zeiss).

RESULTADOS

Selección de anticuerpos anti-ED-A

Análisis de BIAcore 1

El análisis de BIAcore produjo una gráfica para cada anticuerpo anti-ED-A que se analizó para deducir la afinidad de un anticuerpo por el antígeno tal como sigue: El eje x de cada gráfica corresponde al tiempo y el eje y corresponde a unidades de resonancia (una medida que indica la afinidad de unión del anticuerpo sometido a prueba por el antígeno recubierto sobre el chip de BIAcore). Cada gráfica mostró 3 picos y 1 valle que corresponden a los cambios de tampón y por tanto son irrelevantes para la interpretación de los resultados.

La parte ascendente de cada gráfica representa la fase de asociación. Cuanto más pronunciada es la curva en esta parte de la gráfica, más rápida es la asociación del anticuerpo con el antígeno. La parte descendente de cada gráfica representa la fase de disociación del anticuerpo del antígeno. Cuando más plana es la curva en esta parte de la gráfica, más lenta es la disociación del anticuerpo del antígeno.

Los anticuerpos anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 presentan todos una curva de disociación más plana que la del anticuerpo anti-ED-A original del que se derivaron, indicando que se unen a ED-A, y por tanto también a A-FN, con una afinidad mayor que el anticuerpo anti-ED-A original. Las gráficas para los anticuerpos E5, F1, F8 y H1 mostraban las curvas de disociación más planas de todos los anticuerpos anti-ED-A sometidos a prueba. Las curvas de asociación de los anticuerpos H1, C5, D5, E5, C8, F8 y F1 eran más planas que la observada para el anticuerpo anti-ED-A original, mientras que la curva de asociación observada para los anticuerpos B2, B7, E8 y G9 era tan pronunciada como la curva de asociación observada para el anticuerpo anti-ED-A original. Sin embargo, puesto que se usaron sobrenadantes bacterianos de células TG-1 de *E. coli* inducidas con IPTG para el análisis de BIAcore de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9, la concentración de las muestras de anticuerpos sometidas a prueba se desconocía, pero lo más probablemente era inferior a la concentración de la muestra de anticuerpo anti-ED-A original usada para la comparación. Por consiguiente, la curva de asociación de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 puede ser artificialmente baja debido a la baja concentración de anticuerpo en las muestras usadas para el análisis de BIAcore. Sin embargo, puesto que la concentración no afecta significativamente a la disociación de un anticuerpo de su antígeno diana en el análisis de 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 al menos igual, y probablemente mayor afinidad, que el anticuerpo anti-ED-A original.

30 Análisis de BIAcore 2

Se evaluaron los valores de k_{on} , k_{off} y K_D de cada anticuerpo anti-ED-A usando el software BIAevaluation. Los valores de k_{on} , k_{off} y K_D del anticuerpo anti-ED-A original y los anticuerpos anti-ED-A B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 para el antígeno 11A12 se detallan en la tabla 2. Los anticuerpos anti-ED-A B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 tienen todos mejores valores de K_D para el antígeno 11A12 que el anticuerpo anti-ED-A original del que se derivaron, indicando que se unen a ED-A, y por tanto a A-FN con mayor afinidad que el anticuerpo anti-ED-A original.

Inmunohistoquímica de secciones de linfoma

La tinción inmunohistoquímica de secciones de linfoma de Ramos humano primario (linfoma de linfocitos B no Hodgkin [linfoma de Burkitt]) con anticuerpo scFv anti-ED-A F8 mostró una tinción fuerte y específica de la neovasculatura. En cambio, no se detectó tinción del linfoma de Ramos primario, incluyendo la neovasculatura, en el control negativo en el que el linfoma de Ramos primario se tiñó en condiciones idénticas excepto por la omisión del anticuerpo scFv anti-ED-A F8. Esto demuestra que los anticuerpos scFv anti-ED-A de la presente invención se dirigen específicamente a la neovasculatura de los linfomas. Por tanto, ED-A puede servir como diana general para estrategias de selección como diana basadas en anticuerpo en linfoma.

Inmunohistoquímica de secciones de cáncer de pulmón

En general es difícil encontrar "anticuerpos pantumorales" dentro de una determinada clase de cáncer, por ejemplo herceptina tiñe solo el 20% de los cánceres de mama. La figura 1 muestra que el anticuerpo anti-ED-A F8 se localiza específicamente en la neovasculatura de cánceres de pulmón. Específicamente, el anticuerpo anti-ED-A F8 se localiza específicamente en la neovasculatura tanto de cáncer de pulmón de células pequeñas como de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Los cánceres de pulmón de células no pequeñas representan ~75%-85% de todos los cánceres de pulmón, mientras que los cánceres de pulmón de células pequeñas representan ~15%-25%. La figura 1 demuestra además que el anticuerpo anti-ED-A se localiza específicamente en todos los subtipos de cáncer de pulmón de células no pequeñas sometidos a prueba, concretamente carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma bronquioalveolar y carcinoma de células grandes. Por tanto, los resultados mostrados en la figura 1, demuestran sorprendentemente que el anticuerpo anti-ED-A, F8, tiñe todos los histotipos de cáncer de pulmón sometidos a prueba. Por tanto, ED-A puede servir como diana general para estrategias de selección como diana basadas en anticuerpo en cáncer de pulmón.

Secuenciación

Los anticuerpos anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 son todos anticuerpos scFv y se secuenciaron usando métodos convencionales. La secuencia de nucleótidos del anticuerpo anti-ED-A H1 se muestra

en la figura 3. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-ED-A H1 se muestra en la figura 4.

Las secuencias de nucleótidos preferidas que codifican para VH y/o VL de los anticuerpos anti-ED-A B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 son idénticas a las secuencias de nucleótidos que codifican para VH y/o VL del anticuerpo anti-ED-A H1, excepto porque las secuencias de nucleótidos que codifican para las CDR1 de H1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) se sustituyen por las secuencias de nucleótidos que codifican para las CDR1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) enumeradas en la tabla 1 para el anticuerpo respectivo.

Las secuencias de nucleótidos preferidas que codifican para VH y/o VL del diacuerpo scFv anti-ED-A F8 son idénticas a las secuencias de nucleótidos que codifican para VH y/o VL del anticuerpo anti-ED-A H1, excepto porque las secuencias de nucleótidos que codifican para las CDR1 de H1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) se sustituyen por las secuencias de nucleótidos que codifican para las CDR1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) enumeradas en la tabla 1 para el anticuerpo anti-ED-A F8. La secuencia de nucleótidos preferida que codifica para el ligador que une VH y VL del diacuerpo scFv anti-ED-A F8 es ggggccagtgccggt (SEQ ID NO: 29).

Los anticuerpos anti-ED-A B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 tienen secuencias de aminoácidos idénticas al anticuerpo anti-ED-A H1, excepto porque las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de H1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) se sustituyen por las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) enumeradas en la tabla 1 para el anticuerpo respectivo. La secuencia de aminoácidos del diacuerpo scFv anti-ED-A F8 es idéntica a las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-ED-A H1, excepto porque las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de H1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) se sustituyen por las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) enumeradas en la tabla 1 para el anticuerpo anti-ED-A F8, y la secuencia de aminoácidos del ligador en H1 se sustituye por la secuencia de aminoácidos del ligador GSSGG (SEQ ID NO: 28).

La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A B2 (SEQ ID NO: 21) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VH de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 23.

La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A C5 (SEQ ID NO: 41) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VH de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 43.

La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A D5 (SEQ ID NO: 51) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VH de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 53.

La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A E5 (SEQ ID NO: 61) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VH de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 63.

La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A C8 (SEQ ID NO: 71) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VH de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 73.

La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A F8 (SEQ ID NO: 81) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VH de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 83. El dominio VH del diacuerpo anti-ED-A F8 tiene la misma secuencia de aminoácidos que el dominio VH del anticuerpo anti-ED-A F8 (es decir, SEQ ID NO: 81).

La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A F1 (SEQ ID NO: 91) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VH de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 93.

La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A B7 (SEQ ID NO: 101) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VH de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 103.

La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A E8 (SEQ ID NO: 111) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VH de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 113.

La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A G9 (SEQ ID NO: 31) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VH de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 33.

La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A B2 (SEQ ID NO: 22) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VL de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 26.

5 La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A C5 (SEQ ID NO: 42) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VL de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 46.

10 La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A D5 (SEQ ID NO: 52) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VL de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 56.

15 La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A E5 (SEQ ID NO: 62) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VL de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 66.

20 La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A C8 (SEQ ID NO: 72) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 VL de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 76.

25 La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A F8 (SEQ ID NO: 82) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VL de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 86. El dominio VL del diacuerpo anti-ED-A F8 tiene la misma secuencia de aminoácidos que el dominio VL del anticuerpo anti-ED-A F8 (es decir, SEQ ID NO: 82).

La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A F1 (SEQ ID NO: 92) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VL de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 96.

30 La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A B7 (SEQ ID NO: 102) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VL de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 106.

35 La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A E8 (SEQ ID NO: 112) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VL de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 116.

40 La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A G9 (SEQ ID NO: 32) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A H1 excepto porque la CDR1 de VL de H1 se sustituye por SEQ ID NO: 36.

45 Opcionalmente, el aminoácido en la posición 5 del dominio VH de los anticuerpos anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 y el diacuerpo scFv F8 puede ser un residuo de leucina (L) en lugar de un residuo de valina (V) tal como se muestra en la figura 4A. Además o alternativamente, el aminoácido en la posición 18 del dominio VL de los anticuerpos anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 y el diacuerpo scFv F8 puede ser un residuo de arginina (R) en lugar de un residuo de lisina (K) tal como se muestra en la figura 4C.

Bibliografía

- 50 Amit *et al.* (1986), *Science*, 233: 747-753.
- Andersen *et al.* (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 117
- Ausubel *et al.* (1999) 4^a ed., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons.
- 55 Bagshawe K.D. *et al.* (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922
- Balza *et al.* (1988), *FEBS Lett.*, 228: 42-44.
- 60 Birchler *et al.* (1999), *J. Immunol. Methods*, 231, 239-248.
- Bird *et al.* (1988) *Science*, 242, 423-426
- 65 Borsi *et al.* (1987), *J. Cell. Biol.*, 104, 595-600.

- Borsi *et al.* (1990), FEBS Lett., 261: 175-178.
- Borsi *et al.* (1995), J. Biol. Chem., 270: 6243-6245.
- 5 Borsi *et al.* (1998), Exp. Cell Res., 240, 244-251.
- Brack *et al.* (2006), Clin. Cancer Res., 12, 3200-3208.
- Carnemolla *et al.* (1989), J. Cell. Biol., 108: 1139-1148.
- 10 Caton *et al.* (1990), J. Immunol., 144: 1965-1968.
- Chadd *et al.* (2001), Current Opinion in Biotechnology 12: 188-194
- 15 Chothia *et al.* (1987), J. Mol. Biol., 196: 901-917.
- Chothia *et al.* (1989), Nature, 342: 877-883.
- Devos *et al.* (1983), Nucl. Acids Res. 11: 4307-4323.
- 20 ffrench-Constant (1995), Exp. Cell Res., 221, 261-271.
- Giovannoni, Nucleic. Acid Research, 2001, 29 (5): E27.
- 25 Glennie M J *et al.*, 1987 J. Immunol. 139, 2367-2375
- Haan *et al.* (2004), BioCentury, 12 (5): A1-A6.
- Hanahan *et al.* (2000), Cell 100, 57-70.
- 30 Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor
- Kornblihtt *et al.* (1984), Nucleic Acids Res. 12, 5853-5868.
- 35 Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., págs. 726, 1988
- Heikinheimo *et al.* (1991), Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol., 61, 101-109.
- Holliger y Bohlen 1999 Cancer and metastasis rev. 18: 411-419.
- 40 Holliger *et al.* (1993a), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448.
- Holliger *et al.* (1993b), Current Opinion Biotechnol 4, 446-449.
- 45 Holt *et al.* (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490.
- Hoogenboom *et al.* (1991), Nucleic Acids Res., 19 (15) 4133-7.
- 50 Hu *et al.* (1996), Cancer Res., 56, 3055-3061.
- Huston *et al.* (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883.
- Hynes, R.O. (1990). Fibronectins (Nueva York: Springer-Verlag).
- 55 Jacobs *et al.* (2002), Hum. Pathol., 33, 29-38.
- Kabat *et al.* (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4^a edición. US Department of Health and Human Services.
- 60 Kabat *et al.* (1991a), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a edición. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington. (a)
- Kabat *et al.* (1991b), J. Immunol., 147: 1709-1719.
- 65 Kaspar *et al.* (2006), Int. J. Cancer, 118, 1331-1339.

- Knappik *et al.*, (2000) J. Mol. Biol. 296, 57-86.
- Kohler y Milstein, Nature, 256: 495-497, 1975
- 5 Koide *et al.* (1998), Journal of Molecular Biology, 284: 1141-1151.
- Kontermann *et al.* (2001), S, Antibody Engineering, Springer-Verlag Nueva York, LLC; ISBN: 3540413545.
- Koukoulis *et al.* (1993), J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 25, 285-295.
- 10 Koukoulis *et al.* (1995), Ultrastruct. Pathol., 19, 37-43.
- Krebs *et al.* (2001), Journal of Immunological Methods, 254 67-84.
- 15 Larrick JW y Thomas DW (2001) Current Opinion in Biotechnology 12: 411-418.
- Ledermann J.A. *et al.* (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664
- Lohi *et al.* (1995), Int. J. Cancer, 63, 442-449.
- 20 MaED-A *et al.* (1983) Biochem. Biophys. Res. Comm. 115: 1040-1047.
- Matsumoto *et al.* (1999), Jpn. J. Cancer Res., 90, 320-325.
- 25 McCafferty *et al.*, (1990) Nature, 348, 552-554.
- Mendez, M. *et al.*, (1997) Nature Genet, 15 (2): 146-156.
- Merchand *et al.*, 1998 Nature Biotech. 16: 677-681.
- 30 Neri, D., y Bicknell, R. (2005), Nat. Rev. Cancer 5, 436-446.
- Nygren *et al.* (1997), Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469.
- 35 Oyama *et al.* (1989), J. Biol. Chem., 264, 10331-10334.
- Paoella *et al.* (1988), Nucleic Acids Res. 16, 3545-3557.
- Pini *et al.* (1998), J. Biol. Chem., 273, 21769-21776.
- 40 Plückthun (1991), Bio/Technology 9: 545-551.
- Reiter *et al.* (1996), Nature Biotech., 14, 1239-1245.
- 45 Repp *et al.*, 1995 J. Hemat. 377-382.
- Ridgeway *et al.* (1996), Protein Eng., 9, 616-621.
- Robinson ed., Sustained and Controlled Release Drug Deliver and Systems, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978
- 50 Roesli *et al.* (2006), Nature Protocols, 1, 192-199.
- Ruf *et al.* (1991) J. Biol. Chem. 226: 15719-15725.
- 55 Rybak *et al.* (2005), Nat. Methods, 2, 291-298.
- Rybak *et al.* (2006), Chem. Med. Chem., 2, 22-40.
- Sambrook y Russell, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ª edición, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 60 Scarpati *et al.* (1987) Biochemistry 26: 5234-5238.
- Scarpino *et al.* (1999) J. Pathol. 188, 163-167.
- 65 Scheurer *et al.* (2005), Proteomics 5, 3035-3039.

Segal *et al.* (1974), PNAS, 71: 4298-4302.
 Sharon *et al.* (1990a), PNAS, 87: 4814-4817.
 5 Sharon *et al.* (1990b), J. Immunol., 144: 4863-4869.
 Silacci *et al.* (2003), Proteomics, 5, 2340-2350.
 Staerz U. D. y Bevan M. J. 1986 PNAS 83.
 10 Suresh *et al.*, 1986 Method Enzymol. 121: 210-228
 Taniguchi *et al.* (1983) Nature 302, 305-310.
 15 Tavian *et al.* (1994), Int. J. Cancer, 56, 820-825.
 Terrana *et al.* (1987), Cancer Res. 47, 3791-3797.
 Thorpe (2004), Clin. Cancer Res., 10, 415-427.
 20 Trachsel *et al.* (2006), Adv. Drug Deliv. Rev., 58, 735-754.
 Viti *et al.* (2000), Methods Enzymol., 326, 480-505.
 25 Ward *et al.* (1989), Nature 341, 544-546.
 Wess en: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12 (42), A1-A7, 2004

Tabla 1

30 Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las CDR1 de la cadena pesada (VH) y la cadena ligera (VL) de los anticuerpos anti-ED-A madurados por afinidad

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

Tabla 2

Datos de evaluación de BIAcore

35

Anticuerpo	k_{on} (l/Ms)	k_{off} (l/s)	K_D (M)
Anticuerpo anti-ED-A original	$2,5 \times 10^5$	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	$3,6 \times 10^5$	$7,54 \times 10^{-3}$	$\sim 2,09 \times 10^{-8}$

Lista de secuencias

- 5 <110> Philogen S.p.A.
 <120> Antígeno asociado con cánceres de pulmón y linfomas
 <130> TEK/FP6743421
- 10 <140> EP
 <141> 24-07-2008
 <150> EP08807180.8
 <151> 24-07-2008
 <150> PCT/IB2008/002436
 <151> 24-07-24
- 20 <150> US 60/951.765
 <151> 25-07-2007
 <160> 193
- 25 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 118
 <212> PRT
- 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo anti-ED-A H1
- 35 <400> 1

ES 2 534 726 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 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> 2
 <211> 125
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo anti-ED-A H1

10 <400> 2

ES 2 534 726 T3

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 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

- 5 <210> 3
- <211> 3
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A H1
- <400> 3
- Pro Arg Arg**
- 1
- 15 <210> 4
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A H1
- <400> 4
- Ser Gly Ser Gly Gly Ser**
- 1 5
- 25

ES 2 534 726 T3

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A H1

10 <400> 5
Ser Thr His Leu Tyr Leu
1 5

<210> 6
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A H1

20 <400> 6
Ser Ala Trp
1

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A H1

30 <400> 7
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

35 <210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A H1

<400> 8
Met Arg Gly Arg Pro Pro
1 5

45 <210> 9
<400> 9
000

50 <210> 10
<400> 10
000

55 <210> 11
<211> 20
<212> PRT

ES 2 534 726 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la secuencia de ligador del anticuerpo anti-ED-A H1

5 <400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210>12

10 <211> 354

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia sintética: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo anti-ED-A H1

<400> 12

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc ccgcggagga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagtact 300

catttgtatc tttttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc gagt 354

20 <210> 13

<211> 387

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia sintética: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo anti-ED-A

<400> 13

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aaaagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc tctgcgtggt tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagatgcgtg gtcggccgcc gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaaat caaagcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat 360

ctgaatgggg ccgcatagac tgtgaaa 387

30 <210> 14

<211> 60

<212> ADN

ES 2 534 726 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de nucleótidos de la secuencia de ligador del anticuerpo anti-ED10 A H1

5 <400> 14
ggcgggtggag gttctggcgg cggtaggcagt ggcgggtggag gttccggggg tggaggatct 60

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

<400> 15
Phe Leu Thr Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Ala Pro
1 5 10 15

15 **Arg**

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
20 <213> *Mus musculus*

<400> 16
Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
1 5 10

25 <210> 17
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia sintética: cebador parcialmente degenerado

<220>
<221> misc_feature
35 <222> 27, 28, 30, 31, 33, 34
<223> n e s a o g o c o t

<400> 17
ctggagcctg gcggaaccag ctcatmnnmn nmngctaaa ggtgaatcca ga 52

40 <210> 18
<211> 58
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Secuencia sintética: cebador parcialmente degenerado

<220>
<221> misc_feature
50 <222> 28, 29, 31, 32, 34, 35
<223> n e s a o g o c o t

<400> 18
55 **ccaggtttct gctggtacca ggctaamnnm nmngctaa cactctgact ggcctgc 58**

ES 2 534 726 T3

<210> 19
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia sintética: cebador LMB3long
 <400> 19
 10 **caggaaacag ctatgaccat gattac** **26**
 <210> 20
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética: cebador fdseqlong
 20 <400> 20
gacgtagta aatgaatttt ctgtatgagg **30**
 <210> 21
 <211> 118
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A B2
 30 <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

ES 2 534 726 T3

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

- 5 <210> 23
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A B2
 <400> 23
Ala Ala Lys
1
- 15 <210> 24
 <400> 24
 000
- 20 <210> 25
 <400> 25
 000
- 25 <210> 26
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A B2

<400> 26
Val Ala Phe
1

5 <210> 27

<400> 27
 000

10 <210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de ligador del diacuerpo F8

<400> 28
Gly Ser Ser Gly Gly
1 5

20 <210> 29
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de ligador del diacuerpo F8

30 <400> 29
gggtccagtg gcggt **15**

<210> 30

35 <400> 30
 000

<210> 31
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A G9

45 <400> 31

ES 2 534 726 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 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> 32
 <211> 125
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A G9

10 <400> 32

ES 2 534 726 T3

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> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A G9

<400> 33

His Met Gln

1

15 <210> 34

<400> 34

000

20 <210> 35

<400> 35

000

25 <210> 36

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 534 726 T3

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A G9

<400> 36

Thr Ala Phe

1

5

<210> 37

<400> 37

000

10

<210> 38

<400> 38

000

15

<210> 39

<400> 39

000

20

<210> 40

<400> 40

000

25

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A C5

<400> 41

35

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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A C5

<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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A C5

<400> 43

Pro Ile Thr

1

5 <210> 44

<400> 44
000

10 <210> 45

<400> 45
000

15 <210> 46

<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A C5

<400> 46

Leu His Phe

1

25 <210> 47

<400> 47
000

30 <210> 48

<400> 48
000

35 <210> 49

<400> 49
000

40 <210> 50

<400> 50
000

45 <210> 51

<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A D5

<400> 51

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 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> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A D5

<400> 52

ES 2 534 726 T3

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

- 5 <210> 53
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A D5
- <400> 53
Val Met Lys
1
- 15 <210> 54
 <400> 54
 000
- 20 <210> 55
 <400> 55
 000
- 25 <210> 56
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>

ES 2 534 726 T3

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A D5

<210> 56
<211> 3
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A D5

<400> 56
Asn Ala Phe
1

<210> 57
15 <400> 57
000

<210> 58
20 <400> 58
000

<210> 59
25 <400> 59
000

<210> 60
30 <400> 60
000

<210> 61
35 <211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A E5

<400> 61

ES 2 534 726 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 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> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A E5

<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

ES 2 534 726 T3

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

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A E5

10 <400> 63

Thr Gly Ser
 1

<210> 64

15 <400> 64

000

<210> 65

20 <400> 65

000

<210> 66

<211> 3

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A E5

30 <400> 66

Leu Ala His
 1

<210> 67

35 <400> 67

000

<210> 68

40

ES 2 534 726 T3

<400> 68
000

5 <210> 69

<400> 69
000

10 <210> 70

<400> 70
000

15 <210> 71
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio de VH del anticuerpo anti-ED-A C8

<400> 71

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	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											

25 <210> 72
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>

ES 2 534 726 T3

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio de VL del anticuerpo anti-ED-A C8

<400> 72

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 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

5
 <210> 73
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A C8

<400> 73
Leu Gln Thr
1

15
 <210> 74

20
 <400> 74
 000

<210> 75

<400> 75
 000

25
 <210> 76
 <211> 3

ES 2 534 726 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A C8

<400> 76

Leu Pro Phe
1

10 <210> 77

<400> 77
000

15 <210> 78

<400> 78
000

20 <210> 79

<400> 79
000

25 <210> 80

<400> 80
000

30 <210> 81

<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A F8

<400> 81

ES 2 534 726 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
- 5 <211> 125
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A F8
- <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 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> 83

<211> 3

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A F8

<400> 83

Leu Phe Thr

1

<210> 84

15 <400> 84

000

<210> 85

20 <400> 85

000

<210> 86

25 <211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A F8

5 <400> 86

Met Pro Phe
1

<210> 87

10 <400> 87
000

<210> 88

15 <400> 88
000

<210> 89

20 <400> 89
000

<210> 90

25 <400> 90
000

<210> 91

<211> 118

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A F1

35

<400> 91

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

ES 2 534 726 T3

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

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A F1

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

- 5 <210> 93
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A F1
- <400> 93
Gln Ala Arg
1
- 15 <210> 94
 <400> 94
 000
- 20 <210> 95
 <400> 95
 000
- 25 <210> 96
 <211> 3
 <212> PRT

ES 2 534 726 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A F1

<400> 96

Ala Pro Phe

1

10 <210> 97

<400> 97

000

15 <210> 98

<400> 98

000

20 <210> 99

<400> 99

000

25 <210> 100

<400> 100

000

30 <210> 101

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A B7

<400> 101

ES 2 534 726 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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A B7

<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

ES 2 534 726 T3

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> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A B7

<400> 103

His Phe Asp

1

<210> 104

15

<400> 104

000

<210> 105

20

<400> 105

000

<210> 106

25

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A B7

<400> 106

Leu Ala Phe

1

<210> 107

35

<400> 107

000

<210> 108

40

ES 2 534 726 T3

<400> 108
 000
 5 <210> 109
 <400> 109
 000
 10 <210> 110
 <400> 110
 000
 15 <210> 111
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo anti-ED-A E8
 <400> 111
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
 25 <210> 112
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>

ES 2 534 726 T3

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo anti-ED-A E8

<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

5

<210> 113
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-ED-A E8

<400> 113

Asp Met His

15

1

<210> 114

20

<400> 114
 000

<210> 115

25

<400> 115
 000

<210> 116

<211> 3

ES 2 534 726 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-ED-A E8

<400> 116

Ser Ser Phe

1

10 <210> 117
<211> 350
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15 <400> 117

Asn Gly Leu Gly Pro Ser Lys Thr Lys Thr Ala Ser Pro Asp Gln Thr
 1 5 10 15
 Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr Val Val Ser
 20 25 30
 Val Tyr Ala Gln Asn Arg Asn Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr
 35 40 45
 Ala Val Thr Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val
 50 55 60
 Asp Val Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val
 65 70 75 80
 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

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> PRT

<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

5 <210> 119
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 119
 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 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

10 <210> 120
 <211> 288
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>

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

5 <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

<210> 121
 <211> 867
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de nucleótidos del antígeno (11A12)

10
 <400> 121
atgagatcct accgaacaga aattgacaaa ccatcccaga tgcaagtgac cgatgttcag 60
gacaacagca ttagtgtcaa gtggctgcct tcaagttccc ctgttactgg ttacagagta 120
accaccactc ccaaaaatgg accaggacca acaaaaacta aaactgcagg tccagatcaa 180
acagaaatga ctattgaagg cttgcagccc acagtggagt atgtggttag tgtctatgct 240
cagaatccaa gcggagagag tcagcctctg gttcagactg cagtaaccaa cattgatcgc 300
cctaaaggac tggcattcac tgatgtggat gtcgattcca tcaaaattgc ttgggaaagc 360
ccacaggggc aagtttcag gtacaggggtg acctactcga gccctgagga tggaatccat 420
gagctattcc ctgcacctga tggatgaaga gacactgcag agctgcaagg cctcagaccg 480
ggttctgagt acacagtcag tgtggttgcc ttgcacgatg atatggagag ccagcccctg 540
attggaaccc agtccacagc tattcctgca ccaactgacc tgaagttcac tcaggtcaca 600
cccacaagcc tgagcgccca gtggacacca cccaatgttc agctcactgg atatcgagtg 660
cgggtgaccc ccaaggagaa gaccggacca atgaaagaa tcaaccttgc tcctgacagc 720
tcatccgtgg ttgtatcagg acttatgggtg gccaccaa atgaagtgag tgtctatgct 780
cttaaggaca ctttgacaag cagaccagct cagggagttg tcaccactct ggagaatgtc 840
agatctcatc accatcacca tcactaa 867

<210> 122
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 122
His Tyr Gln Ile Asn Gln Gln Trp Glu Arg
1 5 10

<210> 123
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 123
Val Gly Asp Thr Tyr Glu Arg Pro Lys
1 5

<210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 <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

<210> 125

5 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 125

Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys
 10 **1 5**

<210> 126

15 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 126

Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser Trp Glu Lys
1 5 10

<210> 127

20 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 127

Trp Lys Glu Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys
1 5 10 15

<210> 128

30 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 128

Glu Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys
1 5 10

<210> 129

35 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 129

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

Gln Tyr Gly His Arg
20

<210> 130

<211> 12
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 130
Trp Ser Arg Pro Gln Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Arg
1 5 10

<210> 131
 <211> 19
 10 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 131
Ser Asp Asn Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Gln Phe Val Glu Leu Thr
1 5 10 15

Asp Val Lys

15 <210> 132
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 133
Val Thr Ile Met Trp Thr Pro Pro Asp Ser Val Val Ser Gly Tyr Arg
1 5 10 15

25 <210> 133
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 133
Val Glu Val Leu Pro Val Ser Leu Pro Gly Glu His Gly Gln Arg
 30 **1 5 10 15**

<210> 134
 <211> 18
 <212> PRT
 35 <213> *Mus musculus*

<400> 134
Asn Thr Phe Ala Glu Ile Thr Gly Leu Ser Pro Gly Val Thr Tyr Leu
1 5 10 15

Phe Lys

40 <210> 135
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

45 <400> 135

Val Phe Ala Val His Gln Gly Arg
1 5

5 <210> 136
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 136
Thr Val Leu Val Thr Trp Thr Pro Pro Arg
1 5 10

10 <210> 137
 <211> 10
 <212> PRT
 <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> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 138
Asn Leu Gln Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Thr Leu Val Ala Val Lys
1 5 10 15

25 <210> 139
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30 <400> 139
Ala Thr Gly Val Phe Thr Thr Leu Gln Pro Leu Arg
1 5 10

35 <210> 140
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 140
Leu Gly Val Arg Pro Ser Gln Gly Gly Glu Ala Pro Arg
1 5 10

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

<400> 141

Val Val Thr Pro Leu Ser Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu Ala Asn
 1 5 10 15

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

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

<400> 142
 Ser Thr Thr Pro Asp Ile Thr Gly Tyr Arg
 1 5 10

10 <210> 143
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 143
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Glu Leu Thr Asn Leu Leu Val
 1 5 10 15

Arg

20 <210> 144
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 144
 Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Phe Asp Ser Ser Asp Ile Thr Ala
 1 5 10 15

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

25 <210> 145
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> *Mus musculus*

<400> 145
 Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Arg
 1 5

35 <210> 146
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 146

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

5 <210> 147
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 147
Glu Glu Ser Pro Pro Leu Ile Gly Gln Gln Ala Thr Val Ser Asp Ile
1 5 10 15

Pro Arg

10 <210> 148
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <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
20

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

<400> 149
Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys
1 5 10

25 <210> 150
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30 <400> 150
Ser Thr Ala Thr Ile Asn Asn Ile Lys Pro Gly Ala Asp Tyr Thr Ile
1 5 10 15

Thr Leu Tyr Ala Val Thr Gly Arg
20

35 <210> 151
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 151

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

5 <210> 152
 <211> 22
 <212> PRT
 <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

Asn Ser Ile Ser Val Arg
20

10 <210> 153
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 153
Trp Leu Pro Ser Thr Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg
1 5 10

20 <210> 154
 <211> 29
 <212> PRT
 <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

25 **Thr Val Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Arg**
20 25

30 <210> 155
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 155
Asn Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr Thr Ile Pro
1 5 10 15

Ala Pro Thr Asn Leu Lys
20

35 <210> 156
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 156

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

Arg Pro Lys

5 <210> 157
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 157

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

10 <210> 158
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 158

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

20 <210> 159
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 159

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

Ser Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg
20

25 <210> 160
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30 <400> 160

Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys
1 5

35 <210> 161
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 161

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

Asn Gly Gln Thr Pro Val Gln Arg
20

<210> 162
 <211> 22
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

<400> 162
Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile Pro Ala Asn Gly
1 5 10 15

Gln Thr Pro Val Gln Arg
20

10 <210> 163
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 163
Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys
1 5 10

20 <210> 164
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 164
Ile His Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg
1 5 10

25 <210> 165
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30 <400> 165
Ser Ser Pro Val Ile Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser
1 5 10 15

Asn Leu Arg

35 <210> 166
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 166
Phe Leu Thr Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Ala Pro
1 5 10 15

40 **Arg**

<210> 167
 <211> 7
 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 167

Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys
1 5

5

<210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

10

<400> 168

Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg
1 5

<210> 169

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

15

<400> 169

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

20

Arg

<210> 170

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

25

<400> 170

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

30

<210> 171

<211> 23

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

35

<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
20

<210> 172

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

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

45

<400> 172

ES 2 534 726 T3

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> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo anti-ED-A B2

10 <400> 173

ES 2 534 726 T3

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 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> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo anti-ED-A C5

10 <400> 174

ES 2 534 726 T3

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 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
- 5 <211> 118
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo anti-ED-A D5
- <400> 175

ES 2 534 726 T3

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 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> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 176

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

ES 2 534 726 T3

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> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo anti-ED-A C8

<400> 177

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 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

5 <210> 178
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo anti-ED-A F8

<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> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo anti-ED-A F1

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

ES 2 534 726 T3

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> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo anti-ED-A B7

<400> 180

ES 2 534 726 T3

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 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> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 181

ES 2 534 726 T3

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 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> 182
 <211> 118
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo anti-ED-A G9

10 <400> 182

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 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> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo anti-ED-A H1

<400> 183

ES 2 534 726 T3

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 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> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo anti-ED-A B2

10 <400> 184

ES 2 534 726 T3

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> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo anti-ED-A C5

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> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo anti-ED-A D5

<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

ES 2 534 726 T3

<210> 187
 <211> 125
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo anti-ED-A E5
 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
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo anti-ED-A C8
 20 <400> 188

ES 2 534 726 T3

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 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

5 <210> 189
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo anti-ED-A F8

<400> 189

ES 2 534 726 T3

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 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> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

10 <400> 190

ES 2 534 726 T3

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> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo anti-ED-A B7

10 <400> 191

ES 2 534 726 T3

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

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
- 5 <211> 125
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo anti-ED-A E8

<400> 192

ES 2 534 726 T3

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 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> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 193

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

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que se une a la isoforma extradominio A (ED-A) de fibronectina para su uso en un método de tratamiento de linfoma, en el que el anticuerpo se conjuga con una molécula que tiene actividad biocida o citotóxica, o con un radioisótopo.
2. Anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina para su uso en un método *in vivo* de detección o diagnóstico de linfoma en un ser humano o animal, en el que el anticuerpo se marca con un marcador detectable.
3. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 2, en el que el método de detección o diagnóstico de un linfoma en un ser humano o animal comprende las etapas de:
 - (a) administrar al ser humano o al animal un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina, y
 - (b) determinar la presencia o ausencia del anticuerpo en el sistema linfático del cuerpo humano o animal;
 en el que la localización del anticuerpo en el sistema linfático en el ser humano o animal indica la presencia de un linfoma.
4. Anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina para su uso en un método de administración de una molécula conjugada con el anticuerpo a la neovasculatura de un linfoma en un ser humano o animal, en el que la molécula tiene actividad biocida o actividad citotóxica, es un marcador detectable o es un radioisótopo.
5. Uso de un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina para la preparación de un medicamento para la administración a un linfoma de una molécula conjugada con el anticuerpo, en el que la molécula tiene actividad biocida o citotóxica, es un marcador detectable o es un radioisótopo.
6. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo se marca con un marcador detectable.
7. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó 6, o uso según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo se une al ED-A de fibronectina.
8. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó 6 a 7, o uso según la reivindicación 5 ó 7, en el que el linfoma es linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin.
9. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó 6 a 8, o uso según la reivindicación 5, 7 u 8, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH y un dominio VL, en el que el dominio VH comprende un entramado y un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y en el que el dominio VL comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y un entramado, en el que
 - HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 83,
 - HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4,
 - HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5,
 - LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 86,
 - LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 y
 - LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.
10. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 9, o uso según la reivindicación 9, en el que el entramado del dominio VH y/o el entramado del dominio VL es un entramado de línea germinal humana.
11. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 9 ó 10, o uso según la reivindicación 9 ó 10, en el que el anticuerpo o bien comprende el dominio VH mostrado en SEQ ID NO: 81; o bien comprende el dominio VH mostrado en SEQ ID NO: 81, excepto porque el aminoácido en la posición 5 del dominio VH es un residuo de leucina (L) en vez de un residuo de valina (V).
12. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el anticuerpo o bien comprende el dominio VL mostrado en SEQ ID NO: 82; o bien comprende el dominio VL mostrado en SEQ ID NO: 82, excepto porque el aminoácido en la posición 18 del dominio VL es un residuo de arginina (R) en vez de un residuo de lisina (K).

13. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó 6 a 12, o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 7 a 12, en el que el anticuerpo es un diacuerpo o un Fv de cadena sencilla.
- 5 14. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó 6 a 13, o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 7 a 13, en el que el anticuerpo es un diacuerpo o Fv de cadena sencilla que comprende el dominio VH mostrado en SEQ ID NO: 81, excepto porque el aminoácido en la posición 5 del dominio VH es un residuo de leucina (L) en vez de un residuo de valina (V), y que comprende además el dominio VL mostrado en SEQ ID NO: 82, excepto porque el aminoácido en la posición 18 del dominio VL es un residuo de arginina (R) en vez de un residuo de lisina (K).
- 10
15. Método *in vitro* de diagnóstico de linfoma, en el que se usa un anticuerpo que se une al ED-A de fibronectina.

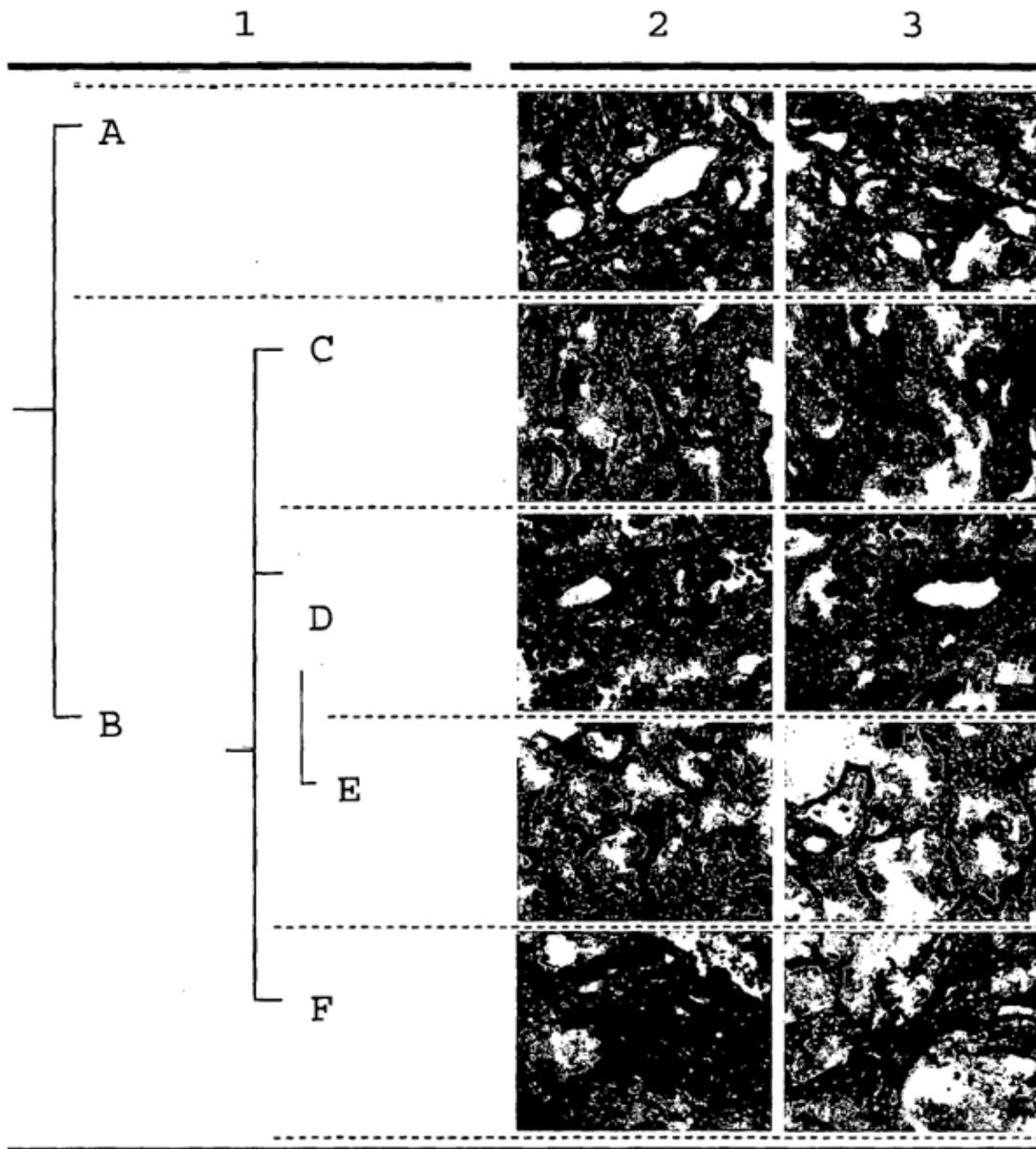


Figura 1

A 1 NIDRPKGLAFTD VDVS IKIAWESPQQVSRVRYTYSSPEDG IHELF PAPDGEEDTAE LQ

B 1 NIDRPKGLAFTD VDVS IKIAWESPQQVSRVRYTYSSPEDG IRELF PAPDGEDD TAE LQ

A 61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQST

B 61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQST

Figura 2

A

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTT
TAGCCCGCGGAGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA
CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTC
ATTTGTATCTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCGAGT

B

GGCGGTGGAGGTTCTGGCGGCGGTGGCAGTGGCGGTGGAGGTT
CCGGGGGTGGAGGATCT

Figura 3

C

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC
CAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT
TAGCTCTGCGTGGTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG
GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG
GCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT
CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG
TATTACTGTCAGCAGATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGCC
AAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGCGGCCGCAGAACAAAACT
CATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTGAAA

Figura 3 (continuación)

A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPRRMSWVRQ
APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTTLVTVS
S

B

GGGSGGGGSGGGGSGGGGS

C

EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGEEKATLSCRASQSVSSAWLAWYQQ
KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKAAAEQKLIS
EEDLNGAA

Figura 4