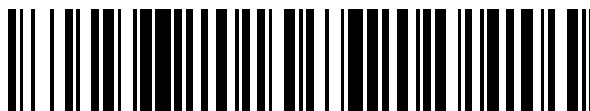


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 362**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2009** **E 09799552 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015** **EP 2379116**

54 Título: **Antígenos asociados a endometriosis**

30 Prioridad:

07.01.2009 US 142962 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.10.2015

73 Titular/es:

PHILOGEN S.P.A. (100.0%)
Piazza La Lizza, 7
53100 Siena, IT

72 Inventor/es:

SCHWAGER, KATHRIN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 549 362 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

Antígenos asociados a endometriosis

- 5 La presente invención se refiere a la detección y tratamiento de la endometriosis. La invención implica el uso de una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina, especialmente una molécula de anticuerpo que se une al dominio ED-A de la fibronectina, o una molécula de anticuerpo que se une a la tenascina-C, especialmente al dominio A1, A2, A3, A4 y / o B dominio D de tenascina C (la "forma larga" de la tenascina-C).
- 10 La mayoría de los productos farmacéuticos convencionales en uso actualmente para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis (tales como cáncer, artritis, etc.) no se acumulan selectivamente en el sitio de la enfermedad [Bosslet et al., 58, 1195-1201 Cancer Res. (1998)]. Por ejemplo, los fármacos administrados por vía intravenosa se distribuyen uniformemente dentro de los diferentes órganos y tejidos del cuerpo, en lugar de acumularse selectivamente en el sitio de la enfermedad.
- 15 Un enfoque para eludir las desventajas de las terapias farmacológicas convencionales implica la liberación preferente de un agente bioactivo en el sitio del tumor por medio de una molécula de unión específica de un marcador asociado a una patología [Neri & Bicknell (2005) Nature Rev. Cancer]. La focalización selectiva del fármaco hacia el tejido enfermo tiene como resultado, en última instancia, un aumento de la concentración local en su sitio de acción, evitando a los órganos normales los efectos tóxicos del agente bioactivo utilizado para conferir un beneficio farmacológico (por ejemplo, un fármaco citotóxico, una citocina, un radionúclido, un fotosensibilizador). En la mayoría de los casos, esto dará lugar a un índice terapéutico mejorado del producto farmacéutico liberado, es decir, una mayor eficacia con efectos secundarios minimizados. De hecho, el perfil de toxicidad favorable de las terapéuticas específicas del lugar puede abrir nuevas vías en la terapia de las enfermedades relacionadas con la angiogénesis, lo que permite la administración sistémica de agentes altamente potentes y prometedores, que actualmente se administran a dosis subóptimas o cuya aplicación clínica ha estado, hasta la fecha, dificultada por toxicidades inaceptables cuando se aplica en una forma no modificada.
- 20 Las estrategias de liberación farmacológica basada en ligandos fundamentalmente se basan en la identificación de marcadores de buena calidad de la patología, lo que permite una discriminación clara entre tejidos enfermos y órganos sanos. Los anticuerpos monoclonales y sus fragmentos representan los agentes preferidos para aplicaciones de liberación farmacológica [Rybak et al. 2, 22-40 Chem. Med. Chem (2007); Shrama et al., 5, 147-159 Nat. Rev. Drug Discovery (2006)], a pesar de que los mutantes de la proteína globular [Binz y Plückthun, 23, 1257-1268 Nature Biotechnology (2005)], péptidos [Sergeeva et al., 58, 1622-1654, Adv. Drug. Deliv. Rev. (2006)] e incluso pequeños ligandos orgánicos [Low et al., 41, 120-129, Acc. Chem. Res. (2008)] se utilizan cada vez más. La mayoría de los esfuerzos en el campo de la focalización hacia la enfermedad se han realizado utilizando marcadores específicos expresados en la superficie de las células enfermas (por ejemplo, en la superficie de las células tumorales en el cáncer). Sin embargo, dirigir los antígenos a las mismas células enfermas es una tarea compleja para los agentes de transmisión sanguínea, frente a una serie de barreras físicas y cinéticas, que pueden impedir una liberación de fármacos eficiente. Estas barreras incluyen la presión intersticial en el sitio de la enfermedad, las distancias de difusión relativamente largas dentro del intersticio, la heterogeneidad de los antígenos en los sitios de la enfermedad, así como la denominada "barrera antígeno" [Dennis et al., 67, 254-261, Cancer Res. (2007)]. Todos estos factores perjudican significativamente la penetración en las zonas profundas del tejido.
- 30 Las proteínas que se expresan alrededor de los vasos sanguíneos patológicos en los sitios de la enfermedad, pero que están ausentes o presentes en niveles reducidos en el tejido normal, representan objetivos particularmente atractivo para el desarrollo de estrategias de liberación de fármacos selectivas y eficientes [Rybak et al. (2007) ChemMedChem; Trachsel et al., 9, R9, Arthritis Res. Ther. (2007)]. Las dianas vasculares son a menudo más fácilmente accesible desde el torrente sanguíneo a los agentes administrados por vía sistémica, superando el problema de acceso y permitiendo una liberación eficaz del compuesto en el lugar de la enfermedad. Además, el mismo agente vascular dirigido podría ser útil no sólo para la liberación de agentes terapéuticos, sino también para aplicaciones de imágenes moleculares.
- 35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "reconocimiento vascular" no se utiliza para indicar la inhibición de la molécula diana en una vía de señalización (por ejemplo, la inhibición de la señalización de VEGF por bevacizumab o por la inhibición de la quinasa BCR / ABL por imatinib). En su lugar, la molécula diana expresada en la vasculatura en los sitios de las enfermedades relacionadas con la angiogénesis se utiliza como un sitio de unión de fácil acceso para ligandos específicos, explotando la vasculatura como un almacén para lograr una localización específica del sitio de las moléculas efectoras en el tejido tumoral. Esta diferencia conceptual fundamental queda clara por el hecho de que, mientras que algunas moléculas marcadoras vasculares han demostrado ser muy adecuadas para aplicaciones de reconocimiento tumores dirigidos por ligandos, su papel fisiopatológico es todavía en gran parte desconocido (por ejemplo, el dominio adicional B de la fibronectina; véase más adelante).
- 40 Los presentes inventores han realizado previamente una amplia labor en la focalización basada en anticuerpos de marcadores de la angiogénesis tumoral, tal como el dominio adicional B de la fibronectina (ED-B) [Schliemann y Neri, 1776, 175-192, Biochim Biophys Acta (2008)]. El ED-B es prácticamente indetectable en los tejidos adultos

normales, con excepción del endometrio en la fase proliferativa, pero se sobreexpresa en afecciones que afectan a la remodelación tisular, con un patrón de tinción perivascular prominente. Tres derivados de del anticuerpo anti-EDB humano L19 [Pini et al. (1998) J. Biol. Chem.] Se están investigando actualmente en ensayos clínicos en fase I y en fase II para el tratamiento del cáncer (el producto radiomarcado L19-131I y las inmunocitocinas L19-IL2 y L19-TNF).

5 La capacidad de L19 para localizar selectivamente en los sitios angiogénicos en enfermedades no tumorales se ha estudiado en modelos animales de neovascularización ocular [Birchler et al. 17, 984-988, Nature Biotechnology (1999)], artritis reumatoide [Trachsel et al., 9, R9, Arthritis Res. Ther. (2007)], psoriasis [Trachsel et al., 127, 881-886, J. Inv. Dermatol. (2007)] y aterosclerosis [Matter et al., 95, 1225-1233 Circulation Res. (2004)].

10 Más recientemente, los presentes inventores han estudiado otros dominios de corte y empalme alternativamente de componentes de la matriz extracelular, cuyos patrones de expresión no están tan bien caracterizados y que hasta el momento se han utilizado principalmente como dianas vasculares para aplicaciones dirigidas a tumores: el dominio ED-A de la fibronectina [Rybak et al., 67, 10948-10957 (2007) Cancer Res.] y el dominio A1 de la tenascina-C [Brack et al., 12, 3200-3208, (2006) Clin. Cancer Res.]. ED-A es reconocido específicamente por el anticuerpo monoclonal humano F8 [Villa et al., 122, 2405-2413 (2008) Int. J. Cancer], mientras que el anticuerpo monoclonal humano F16 se une el dominio A1 de LA tenascina-C [Brack et al. (2006) Clin. Cancer Res.].

El patrón de expresión de los dominios adicionales A1, A2, A3, A4, B y D de la tenascina-C son similares, siendo casi indetectables en los tejidos adultos normales, pero están fuertemente regulados por aumento en una multitud de diferentes tumores [Brack et al. (2006) Clin. Farrell, y col., Cancer Res. (2008) Lung Cancer, en prensa; Berndt et al., 132, 537-546, J Cancer Res Clin Oncol (2006); Balza et al., 261, 175-178, FEBS Lett. (1990)]. La expresión "isoforma grande de la tenascina A" se utiliza a menudo para indicar la forma de la tenascina C que contiene los dominios adicionales A1, A2, A3, A4, B y D [Borsi et al., 270, 6243-6245 (1995) J. Biol. Chem.; Borsi et al., 66, 632-635 (1996) Int. J. Cancer; Carnemolla et al., 154, 1345-1352 (1999) Am. J. Pathol.]. Por el contrario, la expresión del dominio adicional C de la tenascina-C está más restringida, siendo indetectable en los tejidos adultos normales y se encuentra solamente en ciertos tipos de tumores, principalmente cáncer de pulmón y astrocitomas de alto grado [Carnemolla et al. (1999) Am. J. Pathol.].

Por lo tanto, la liberación dirigida basada en anticuerpos de agentes bioactivos a sitios de angiogénesis es una estrategia terapéutica atractiva para el tratamiento del cáncer, pero está en gran parte sin explorar para las enfermedades inflamatorias crónicas. Hemos demostrado previamente que el dominio ED-B de la fibronectina, un marcador de la angiogénesis, se expresa en lesiones psoriásicas en pacientes y en un modelo de ratón de psoriasis, así como en las patas artríticas en el modelo de ratón de artritis reumatoide inducida con colágeno. Utilizando técnicas tanto radiactivas como fluorescentes, se encontró que el anticuerpo monoclonal humano L19, específico de EDB, se localizaba selectivamente en sitios de inflamación *in vivo*, después de la administración intravenosa. Estos resultados sugieren un potencial terapéutico para la liberación selectiva basada en L19 de compuestos bioactivos en sitios de inflamación (Trachsel, 2007; PCT/EP2007/004044).

Anteriormente también se ha demostrado mediante hibridación *in situ* que el dominio ED-A de la fibronectina puede estar presente en muestras artríticas humanas (Berndt et al., 1998; Kriegsmann et al., 2004), y los inventores han demostrado previamente la expresión de ED-A en la artritis reumatoide [PCT/EP2008/009070].

En el presente documento los inventores demuestran los patrones de expresión de ED-A y de la tenascina-C grande en otras enfermedades no tumorales relacionadas con la angiogénesis, tales como esclerosis múltiple, artritis psoriásica, psoriasis, enfermedades inflamatorias del intestino y endometriosis, utilizando concentraciones idénticas de versiones biotiniladas de los anticuerpos F8 y F16 en formato SIP [Borsi et al., 102, 75-85 (2002) Int. J. Cancer; Villa et al., 122, 2405-2413 (2008) Int. J. Cancer; Brack et al., 12, 3200-3208, (2006) Clin. Cancer Res.]. Estas enfermedades están asociadas con la angiogénesis y son socialmente muy relevantes. La liberación de fármacos basada en ligandos puede abrir nuevas oportunidades de diagnóstico y terapéuticas para estas enfermedades.

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune en la que el sistema inmunológico ataca al sistema nervioso, lo que da lugar a la desmielinización de las neuronas (Compston y Coles, 359, 1221-1231, Lancet, 2002). Además de por la desmielinización, la esclerosis múltiple también se caracteriza por la inflamación. No existe una cura conocida para la esclerosis múltiple y muchos medicamentos existentes pueden tener efectos secundarios adversos o ser mal tolerados.

La psoriasis es una enfermedad que afecta a la piel y las articulaciones, por lo general, formando placas psoriásicas escamosas y rojas en la piel. Estas placas psoriásicas son áreas de inflamación. Cuando la psoriasis causa inflamación de las articulaciones, se conoce como artritis psoriásica. Se requieren tratamientos más eficaces para la psoriasis y la artritis psoriásica y un enfoque sería la administración dirigida de citocinas antiinflamatorias, tales como IL-10 o TGF- β , fotosensibilizadores o fármacos citotóxicos con enlazadores escindibles. Este enfoque requiere la orientación eficaz de los fármacos a las zonas de inflamación y la identificación de objetivos específicos expresados en estas regiones.

Las formas principales de enfermedad inflamatoria del intestino son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. La enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal, mientras que la colitis ulcerosa se

limita al colon y el recto (Summers et al., 2003). Dependiendo de su gravedad, el tratamiento de la colitis ulcerosa puede requerir inmunosupresión para controlar sus síntomas y el tratamiento generalmente consiste en la administración de moléculas antiinflamatorias.

5 La endometriosis es una enfermedad frecuente en las mujeres y se caracteriza por un crecimiento más allá o fuera del útero de tejido parecido al endometrio, que normalmente recubre el útero (Rock y Markham, 340, 1264-1267 (1992) Lancet).

10 La endometriosis normalmente se ve durante los años reproductivos y se ha estimado que se produce en aproximadamente del 5 % al 10 % de las mujeres. Su síntoma principal, aunque no universal, es el dolor pélvico en diversas manifestaciones. Además, la endometriosis es frecuente en mujeres con infertilidad (Buyalos y Agarwal, 12, 377-381, (2000) Curr Opin Obstet Gynecol).

15 Un síntoma importante de la endometriosis es el dolor pélvico recurrente intenso. La cantidad de dolor que siente una mujer no está necesariamente relacionada con la extensión o el estadio (1 a 4) de la endometriosis. Algunas mujeres tendrán poco o ningún dolor a pesar de tener una endometriosis extensa que afecta a grandes áreas o de tener endometriosis con cicatrices. Por otro lado, las mujeres pueden tener dolor intenso a pesar de que tienen sólo unas pocas áreas pequeñas de endometriosis (Muse K, 31, 813-822 (1988) Clin Obstet Gynecol).

20 Las lesiones de endometriosis típicas muestran características histológicas similares al endometrio, es decir estroma y epitelio endometrial y glándulas que responden a estímulos hormonales. Las lesiones más antiguas pueden no mostrar glándulas, sino depósitos de hemosiderina residuales. Para el ojo, las lesiones aparecen de color azul o en negro quemado y de tamaño variable; algunas otras lesiones son de color rojo, blanco o no pigmentadas

25 Adicionalmente puede haber otras lesiones, especialmente endometriomas del ovario, formación de cicatrices, defectos o bolsillos peritoneales. Dado que el peritoneo de aspecto normal de las mujeres infértiles revela endometriosis en la biopsia en el 6-13 % de los casos, algunas lesiones pueden no ser visibles a simple vista.

30 Una historia clínica y una exploración física puede, en muchos pacientes, llevar al médico a sospechar endometriosis.

El uso de las pruebas de imagen puede identificar áreas de endometriosis más grandes, como nódulos o quistes de endometriosis. Las dos pruebas de imagen más habituales son la ecografía y la resonancia magnética (RM). Sin embargo, resultados normales en estas pruebas no eliminan la posibilidad de endometriosis, dado que menudo las áreas de endometriosis son demasiado pequeñas como para poder verse con estas pruebas.

35 La única forma de confirmar y diagnosticar endometriosis es mediante laparoscopia, u otros tipos de cirugía. El diagnóstico se basa en el aspecto característico de la enfermedad y se corrobora mediante una biopsia, si es necesario. La laparoscopia también permite el tratamiento quirúrgico de la endometriosis (Brosens I., 15, 229-233 (1997) Semin Reprod Endocrinol).

40 Por esta razón, el descubrimiento de los marcadores vasculares de buena calidad de la endometriosis ofrece nuevas oportunidades para obtener imágenes de endometriosis (por ejemplo, mediante la liberación mediada por ligando de los radionúclidos y radioisótopos), y para la liberación farmacológica en el tejido endometrial de moléculas bioactivas (tales como citocinas, hormonas, radionúclidos terapéuticos o fármacos con enlaces escindibles).

45 En el presente documento los inventores muestran que un anticuerpo anti-tenascina-C, tal como el anticuerpo F16 descrito en el presente documento, es capaz de dar un patrón de tinción más fuerte en tejido endometrial humano que el anticuerpo anti-ED-B L19. Del mismo modo, un anticuerpo anti-ED-A, tal como el anticuerpo F8 divulgado en el presente documento, también es capaz de dar un patrón de tinción más fuerte en tejido endometrial humano que el anticuerpo anti-ED-B L19, aunque la tinción que se ha visto con el anticuerpo F8 no tan intensa como la que se observa con el anticuerpo F16.

50 En el presente documento los inventores también muestran que un anticuerpo anti-tenascina-C, tal como el anticuerpo F16 divulgado en el presente documento, es capaz de dar un patrón de tinción más fuerte en tejido de artritis psoriásica humano que el anticuerpo anti-ED-B L19 o el anticuerpo anti-ED-A F8.

55 Sin embargo, los inventores también han demostrado en el presente documento que la tinción de muestras de pacientes con colitis ulcerosa es prácticamente negativa para el anticuerpo anti-tenascina-C F16, el anticuerpo anti-ED-A F8 y el anticuerpo anti-ED-B L19, observándose sólo una positividad débil con F8 en algunas muestras.

60 El análisis de secciones de tejido de muestras patológicas de pacientes con esclerosis múltiple también reveló solamente positividad muy débil con el anticuerpo anti-tenascina C F16, el anticuerpo anti-ED-A F8 y el anticuerpo anti-ED-B L19.

65

En el caso de componentes de la matriz subendotelial modificada, el funcionamiento de liberación dirigida *in vivo* de los derivados de anticuerpos se correlaciona con abundante expresión de antígenos [Borsi et al., 102, 75-85 (2002) Int. J. Cancer; Demartis et al., 28, 534-539 (2001) Eur. J. Nucl. Med.; Tarli et al., 94, 192-198 (1999) Blood; Viti et al., 59, 347-352, (1999) Cancer Res.]. Basándose en los resultados descritos anteriormente, los inventores encontraron que la expresión de ED-A y de la isoforma "grande" de la tenascina C no se encuentra en todas las enfermedades relacionadas con la angiogénesis, y que la endometriosis parece ser particularmente adecuada para la liberación de fármacos utilizando moléculas de anticuerpo anti-ED -A, mientras que la endometriosis, la artritis psoriásica y la psoriasis parecen ser particularmente adecuadas para liberación farmacológica usando moléculas de anticuerpo anti-tenascina-C.

En consecuencia, el ED-A de la fibronectina está indicado como un marcador vascular de la endometriosis, mientras que la tenascina-C (en particular, la isoforma "grande" de la tenascina-C) está indicada como un marcador vascular de la endometriosis, artritis psoriásica y psoriasis.

Los miembros de unión específica, tales como las moléculas de anticuerpos que se unen al ED-A de la fibronectina, representan nuevos agentes que se pueden usar para el tratamiento de endometriosis, mientras que los miembros de unión específicos, tales como moléculas de anticuerpos que se unen la isoforma "grande" de la tenascina-C, representan nuevos agentes que se pueden usar para el tratamiento de endometriosis, artritis psoriásica o psoriasis.

En un primer aspecto, la invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma del dominio extra-A (ED-A) de la fibronectina (A-FN) para su uso en un método de tratamiento de la endometriosis. La invención también proporciona el uso de una molécula de anticuerpo que se une la isoforma del Dominio Extra-A (ED-A) de la fibronectina para la fabricación de un medicamento para tratar la endometriosis. En el presente documento se divulga un método para tratar la endometriosis en un paciente, comprendiendo el método administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión específica que se une a la isoforma ED-A isoforma de la fibronectina. Preferentemente, la molécula de anticuerpo se une a la isoforma ED-A isoforma de la fibronectina humana.

La molécula de anticuerpo, para su uso en este primer aspecto de la invención puede unirse al ED-A de la fibronectina.

La molécula de anticuerpo para su uso en este primer aspecto de la invención puede conjugarse con un marcador detectable, un radioisótopo, o una molécula bioactiva, tal como una citocina, una hormona, un radioisótopo terapéutico o un fármaco citotóxico. La molécula de anticuerpo puede conjugarse con la molécula bioactiva a través de un enlazador escindible.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina para el uso en liberación en la neovasculatura del tejido endometrial de una molécula conjugada con el miembro de unión específica. La invención también proporciona el uso de una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina para la fabricación de un medicamento para la liberación en la neovasculatura del tejido endometrial de una molécula conjugada con el miembro de unión específica. En el presente documento se divulga un método para liberar una molécula en la neovasculatura del tejido endometrial en un ser humano o animal, en el que la molécula se conjuga con un miembro de unión específica que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina para formar un conjugado y el método comprende la administración del conjugado al ser humano o animal. Preferentemente, la molécula de anticuerpo se une a la isoforma ED-A isoforma de la fibronectina humana.

La molécula de anticuerpo, para su uso en este segundo aspecto de la invención puede unirse al ED-A de la fibronectina.

La molécula de anticuerpo para su uso en este segundo aspecto de la invención puede conjugarse con un marcador detectable, un radioisótopo, o una molécula bioactiva, tal como una citocina, una hormona, un radioisótopo terapéutico o un fármaco citotóxico. La molécula de anticuerpo puede conjugarse con la molécula bioactiva a través de un enlazador escindible.

En un tercer aspecto, la invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina para su uso en un método de diagnóstico de la endometriosis. La invención también proporciona el uso de un miembro de unión específico que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina para la fabricación de un producto de diagnóstico para el diagnóstico de endometriosis. En el presente documento se divulga un método para detectar o diagnosticar la endometriosis en un ser humano o animal, en el que el método comprende las etapas de:

- (a) administrar al ser humano o animal un miembro de unión específica que se une al dominio ED-A de la fibronectina, y
- (b) determinar la presencia o ausencia del miembro de unión específico en los sitios de la endometriosis del cuerpo humano o animal,

en el que la localización del miembro de unión específico al sitio de la endometriosis indica la presencia de endometriosis.

Preferentemente, la molécula de anticuerpo se une a la isoforma ED-A isoforma de la fibronectina humana.

La molécula de anticuerpo, para su uso en este tercer aspecto de la invención puede unirse al ED-A de la fibronectina.

La molécula de anticuerpo para su uso en este tercer aspecto de la invención puede conjugarse con un marcador detectable, o un radioisótopo.

En el presente documento se divulga un miembro de unión específico que se une la isoforma ED-A de la fibronectina para su uso en un método de formación de imágenes del tejido endometrial. En el presente documento se divulga un miembro de unión específico que se une la isoforma ED-A de la fibronectina para la fabricación de un agente de formación de imágenes para la obtención de imágenes del tejido endometrial. En el presente documento se divulga un método para detectar o formar imágenes del tejido endometrial en un ser humano o animal, en el que el método comprende las etapas de:

- (a) administrar al ser humano o animal un miembro de unión específica que se une al dominio ED-A de la fibronectina, y
- (b) detectar la unión del miembro de unión específico a tejido endometrial en el cuerpo humano o animal.

Preferentemente, el miembro de unión específico se une a la isoforma ED-A isoforma de la fibronectina humana.

El miembro de unión específica, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, puede unirse a ED-A de la fibronectina.

El miembro de unión específica, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, puede conjugarse con un marcador detectable, o un radioisótopo.

Una molécula de anticuerpo para su uso en la invención puede ser un anticuerpo que se une a la isoforma del ED-A de la fibronectina y / o al ED-A de la fibronectina, en el que el anticuerpo comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo, H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9, o variantes de las mismas. F8, D5 y B7 se divulgan en Villa et al., 122, 2405-2413 (2008) Int. J. Cancer, mientras que H1, B2, C5, E5, C8, F1, E8 y G9 (y también F8, D5 y B7) se divulgan en el documento WO 2008/120101.

Preferentemente, una molécula de anticuerpo para su uso en la invención es un anticuerpo que se une a la isoforma del ED-A de la fibronectina y / o al ED-A de la fibronectina, que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo B2, C5, D5, C8, F8, B7 o G9, o variantes de las mismas. Preferentemente, la molécula de anticuerpo se une a la isoforma ED-A isoforma de la fibronectina humana. Lo más preferentemente, una molécula de anticuerpo para su uso en la invención es un anticuerpo que se une a la isoforma del ED-A de la fibronectina y / o al ED-A de la fibronectina, que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo F8, o variantes de las mismas.

Preferentemente, una variante adecuada para su uso como se describe en el presente documento comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL de uno cualquiera de los anticuerpos F8, H1, B2, C5, D5, E5, C8, F1, B7, E8 y G9, en el que el residuo de valina (V) en la posición 5 del dominio VH está sustituido por leucina (L), y / o el residuo de lisina (K) en la posición 18 del dominio VL está sustituido por arginina (R)). Lo más preferentemente, una variante adecuada para su uso como se describe en el presente documento comprende un sitio de unión antígeno del anticuerpo que comprende el dominio VH V5L de F8 de la SEC ID N° 16 y el dominio VL K18R de F8 de SEC ID N° 78, en el que el residuo de valina (V) en la posición 5 del dominio VH está sustituido por leucina (L), y / o el residuo de lisina (K) en la posición 18 del dominio VL está sustituido por arginina (R).

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

Las sustituciones pueden potencialmente realizarse en cualquier residuo dentro del conjunto de CDR y pueden estar dentro de CDR1, CDR2 y / o CDR3.

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

- 5 Un miembro de unión específico para su uso en la invención es una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula de anticuerpo humano. La molécula de anticuerpo comprende normalmente un dominio de anticuerpo VH y / o VL. Los dominios VH de miembros de unión específica también se divulgan en el presente documento. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL hay regiones determinantes de la complementariedad ("CDR,"), y regiones marco, ("FR"). Un dominio VH comprende un conjunto de HCDR, y un dominio VL comprende un conjunto de LCDR.
- 10 Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de VH y un marco. Como alternativa o también comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende un CDR1, CDR2 y CDR3 de VL y un marco. Los dominios VH y VL y las CDR de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8 (y su variante que comprende V5L VH y K18R VL), F1, B7, E8 y G9 se describen en el presente documento. Todas las secuencias de VH y VL, secuencias CDR, conjuntos de CDR y conjuntos de HCDR y conjuntos de LCDR
- 15 divulgadas en el presente documento representan realizaciones de un miembro de unión específica para su uso en la invención. Como se describe en el presente documento, un "conjunto de CDR" comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Por lo tanto, un conjunto de HCDR refiere a HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y un conjunto de LCDR refiere a LCDR1, LCDR2 y LCDR3. A menos que se indique lo contrario, un "conjunto de CDR" incluye HCDR y LCDR.
- 20 Una molécula de anticuerpo para su uso en la invención puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y un marco, en el que HCDR1 es la SEC ID N° 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, o 50, y en el que opcionalmente HCDR2 es la SEC ID N° 56; y/o HCDR3 es la SEC ID N° 60. Preferentemente, el HCDR1 es la SEC ID N° 42.
- 25 Normalmente, un dominio VH se empareja con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión a antígeno del anticuerpo, aunque como se analiza más adelante, un dominio VH o VL por sí solo puede usarse para unirse al antígeno. Por tanto, una molécula de anticuerpo para su uso en la invención puede comprender además un dominio VL de anticuerpo que comprende regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y un marco, en el que LCDR1 es la SEC ID N° 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, o 110, y en el que
- 30 opcionalmente LCDR2 es la SEC ID N° 114; y/o LCDR3 es la SEC ID N° 118. Preferentemente, el LCDR1 es la SEC ID N° 102.

Un miembro de unión específica para su uso en la invención puede ser una molécula de anticuerpo aislada para el ED-A de la fibronectina, que comprende un dominio VH y un dominio VL, en el que el dominio VH comprende un marco y un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y en el que el dominio VL comprende regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y un marco, y en el que

35 HCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, o 50; HCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 56; HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 60; LCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, o 110; LCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 114; y LCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 118. Preferentemente, el HCDR1 es la SEC ID N° 42; y/o el LCDR1 es la SEC ID N° 102.

45 Una o más CDR o un conjunto de CDR de un anticuerpo pueden injertarse en un marco (por ejemplo, estructura humana) para proporcionar una molécula de anticuerpo para su uso en la invención. Las regiones marco pueden comprender secuencias de segmentos de genes de la línea germinal humana. Por lo tanto, el marco puede ser la línea germinal, en el que uno o más residuos dentro del marco se cambian para que coincidan con los residuos en la posición equivalente en el marco de la línea germinal humana más similar. Un miembro de unión específica 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 marco de línea germinal humana, por ejemplo, DP47. Normalmente, el miembro de unión específica también tiene un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR, por ejemplo, en un marco de línea germinal humana. El marco de la línea germinal humana del dominio VL puede ser DPK22.

55 Un dominio VH para su uso en la invención puede tener la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, o 24. Preferentemente, un dominio VH para su uso en la invención tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 14 o 16. Un dominio VL para su uso en la invención puede tener el aminoácido SEC ID N° 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, o 86. Preferentemente, un dominio VL para su uso en la invención tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 76 o 78.

60 Una molécula de anticuerpo para su uso en la invención puede ser o comprender un Fv de una sola cadena (scFv), que comprende un dominio VH y un dominio VL unidos a través de un enlazador peptídico. El experto puede seleccionar una longitud y secuencia de enlazador adecuados, por ejemplo, al menos 5 o al menos 10 aminoácidos de longitud, hasta aproximadamente 15, hasta aproximadamente 20 o hasta aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. El enlazador puede tener la secuencia de aminoácidos GSSGG (SEC ID N° 122).

La molécula de anticuerpo puede ser un diacuerpo, que es un fragmento multivalente o multiespecífico construido mediante fusión génica (documento WO94/13804; Holliger 1993a).

Un Fv de cadena sencilla (scFv) puede estar comprendido dentro de una mini-inmunoglobulina o inmunoproteína pequeña (SIP), por ejemplo, como se describe en (Li et al., 1997). Una SIP puede comprender una molécula de scFv fusionada con el dominio CH4 de la isoforma IgE-S2 secretora de la IgE humana (ϵ_{S2} -CH4; Batista et al., 1996) formando una molécula de anticuerpo mini-inmunoglobulina homo dimérica.

Como alternativa, una molécula de anticuerpo para su uso en la invención puede comprender un sitio de unión al antígeno dentro de la molécula que no es anticuerpo, normalmente provista de una o más CDR por ejemplo, un conjunto de CDR en un armazón proteico no anticuerpo. Los miembros de unión específica, incluyendo las moléculas que no son anticuerpos y de anticuerpos, se describen con más detalle en otra parte en el presente documento.

Una o más CDR o un conjunto de CDR de un anticuerpo pueden injertarse en un marco (por ejemplo, estructura humana) para proporcionar una molécula de anticuerpo para su uso en la invención. Las regiones marco pueden comprender secuencias de segmentos de genes de la línea germinal humana. Por lo tanto, el marco puede ser la línea germinal, en el que uno o más residuos dentro del marco se cambian para que coincidan con los residuos en la posición equivalente en el marco de la línea germinal humana más similar. Un miembro de unión específica 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 marco de línea germinal humana, por ejemplo, DP47. Normalmente, el miembro de unión específica también tiene un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR, por ejemplo, en un marco de línea germinal humana. El marco de la línea germinal humana del dominio VL puede ser DPK22.

La molécula de anticuerpo puede ser un diacuerpo, que es un fragmento multivalente o multiespecífico construido mediante fusión génica (documento WO94/13804; Holliger 1993a).

Un Fv de cadena sencilla (scFv) puede estar comprendido dentro de una mini-inmunoglobulina o inmunoproteína pequeña (SIP), por ejemplo, como se describe en (Li et al., 1997). Una SIP puede comprender una molécula de scFv fusionada con el dominio CH4 de la isoforma IgE-S2 secretora de la IgE humana (ϵ_{S2} -CH4; Batista et al., 1996) formando una molécula de anticuerpo mini-inmunoglobulina homo dimérica.

Como alternativa, una molécula de anticuerpo para su uso en la invención puede comprender un sitio de unión al antígeno dentro de la molécula que no es anticuerpo, normalmente provista de una o más CDR por ejemplo, un conjunto de CDR en un armazón proteico no anticuerpo. Los miembros de unión específica, incluyendo las moléculas que no son anticuerpos y de anticuerpos, se describen con más detalle en otra parte en el presente documento.

Éstos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle más adelante.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los resultados de la inmunohistoquímica en muestras de pacientes con endometriosis utilizando anticuerpos dirigidos a los marcadores de la angiogénesis. La tinción más oscura indica una fuerte expresión del antígeno, visualizado por las flechas negras. Las áreas de tinción negativa alrededor de las estructuras perivasculares se indican usando las flechas blancas. A, B y C muestran la tinción con F8-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une ED-A, divulgado en el presente documento. D, E y F muestran la tinción con L19-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une ED-B (por ejemplo, Pini et al., 1998). G, H e I muestran la tinción con F16-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une al dominio A1 de LA tenascina-C (documento WO2006/050834). J, K y L son controles negativos en los que no se añadió anticuerpo primario. A, D, G, J, B, E, H y K muestran muestras observadas con un aumento de 10x y C, H, I y L muestran muestras observadas con un aumento 5x.

La Figura 2 muestra los resultados de la inmunohistoquímica en muestras de pacientes con colitis ulcerosa utilizando anticuerpos dirigidos a los marcadores de la angiogénesis. Las flechas blancas indican áreas de tinción negativa alrededor de las estructuras perivasculares. La Figura 2A muestra la tinción con F8-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une ED-A, divulgado en el presente documento. La Figura 2B muestra la tinción con L19-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une ED-B (por ejemplo, Pini et al., 1998). La Figura 2C muestra la tinción con F16-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une al dominio A1 de LA tenascina-C (documento WO2006/050834). La Figura 2D es un control negativo en el que no se añadió anticuerpo primario.

La Figura 3 muestra los resultados de la inmunohistoquímica en muestras de pacientes con artritis psoriásica utilizando anticuerpos dirigidos a los marcadores de la angiogénesis. La tinción más oscura indica una fuerte expresión del antígeno, visualizado por las flechas negras. Las áreas de tinción negativa alrededor de las estructuras perivasculares se indican usando las flechas blancas. La Figura 3A muestra la tinción con F8-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une ED-A, divulgado en el presente documento. La Figura 3B muestra

la tinción con L19-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une ED-B (por ejemplo. Pini et al., 1998). La Figura 3C muestra la tinción con F16-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une al dominio A1 de la tenascina-C (documento WO2006/050834). La Figura 3D es un control negativo en el que no se añadió anticuerpo primario.

La Figura 4 muestra los resultados de la inmunohistoquímica en muestras de pacientes con esclerosis múltiple utilizando anticuerpos dirigidos a los marcadores de la angiogénesis. Las flechas blancas indican áreas de tinción negativa alrededor de las estructuras perivasculares. La Figura 4A muestra la tinción con F8-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une ED-A, divulgado en el presente documento. La Figura 4B muestra la tinción con L19-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une ED-B (por ejemplo. Pini et al., 1998). La Figura 4C muestra la tinción con F16-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une al dominio A1 de la tenascina-C (documento WO2006/050834). La Figura 4D es un control negativo en el que no se añadió anticuerpo primario.

La Figura 5 muestra los resultados de la inmunohistoquímica en muestras de pacientes con psoriasis utilizando anticuerpos dirigidos a los marcadores de la angiogénesis. La tinción más oscura indica una fuerte expresión del antígeno, visualizado por las flechas negras. Las áreas de tinción negativa alrededor de las estructuras perivasculares se indican usando las flechas blancas. La Figura 5A muestra la tinción con F8-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une ED-A, divulgado en el presente documento. La Figura 5B muestra la tinción con L19-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une ED-B (por ejemplo. Pini et al., 1998). La Figura 5C muestra la tinción con F16-SIP, que es una molécula de anticuerpo que se une al dominio A1 de la tenascina-C (documento WO2006/050834). La Figura 5D es un control negativo en el que no se añadió anticuerpo primario.

La Figura 6A muestra las secuencias de nucleótidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo F8 anti-ED-A (SEC ID N° 13) y su variante, F8 V5L VH (SEC ID N° 15). La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada CDR1 (SEC ID N° 41) del anticuerpo F8 anti-ED-A está subrayada. La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada CDR2 (SEC ID N° 55) del anticuerpo F8 anti-ED-A se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada CDR3 (SEC ID N° 59) del anticuerpo F8 anti-ED-A se muestra en negrita y subrayada.

La Figura 6B muestra las secuencias de nucleótidos de la secuencia enlazadora del anticuerpo F8 anti-ED-A (SEC ID N° 121).

La Figura 6C muestra las secuencias de nucleótidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo F8 anti-ED-A (SEC ID N° 75) y su variante, F8 K18R VL (SEC ID N° 77). La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera CDR1 (SEC ID N° 101) del anticuerpo F8 anti-ED-A está subrayada. La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera CDR2 (SEC ID N° 113) del anticuerpo F8 anti-ED-A se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera CDR3 (SEC ID N° 117) del anticuerpo F8 anti-ED-A se muestra en negrita y subrayada.

La Figura 7A muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo F8 anti-ED-A (SEC ID N° 14) y su variante, F8 V5L VH (SEC ID N° 16). La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR1 (SEC ID N° 42) del anticuerpo F8 anti-ED-A está subrayada. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR2 (SEC ID N° 56) del anticuerpo F8 anti-ED-A se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR3 (SEC ID N° 60) del anticuerpo F8 anti-ED-A se muestra en negrita y subrayada.

La Figura 7B muestra las secuencias de aminoácidos de la secuencia enlazadora del anticuerpo F8 anti-ED-A (SEC ID N° 122).

La Figura 7C muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo F8 anti-ED-A (SEC ID N° 76) y su variante, F8 K18R VL (SEC ID N° 78). La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera CDR1 (SEC ID N° 102) del anticuerpo F8 anti-ED-A está subrayada. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera CDR2 (SEC ID N° 114) del anticuerpo F8 anti-ED-A se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera CDR3 (SEC ID N° 118) del anticuerpo F8 anti-ED-A se muestra en negrita y subrayada.

La Figura 8A muestra las secuencias de nucleótidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo anti-tenascina-C. F16 (SEC ID N° 25) y su variante, 4A1-F16 (SEC ID N° 27). Las secuencias de nucleótidos de la CDR1 de la cadena pesada de los anticuerpos anti-tenascina C F16 y F16-4A1 están subrayadas (SEC ID N° 51 y 53, respectivamente). La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada CDR2 (SEC ID N° 57) de los anticuerpos anti-tenascina C F16 y F16-4A1 se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada CDR3 (SEC ID N° 61) de los anticuerpos anti-tenascina C F16 y F16-4A1 se muestra en negrita y subrayada.

La figura 8B muestra la secuencia de nucleótidos de la secuencia del enlazador (SEC ID N° 121) de los anticuerpos anti-tenascina-C F16 y F16-4A1.

La figura 8C muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera (VL) (SEC ID N° 87) de los anticuerpos anti-tenascina-C F16 y F16-4A1. La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera CDR1 (SEC ID N° 111) de los anticuerpos anti-tenascina-C F16 y F16-4A1 está subrayada. La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera CDR2 (SEC ID N° 115) de los anticuerpos anti-tenascina C F16 y F16-4A1 se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera CDR3 (SEC ID N° 119) de los anticuerpos anti-tenascina C F16 y F16-4A1 se muestra en negrita y subrayada.

La figura 9A muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo anti-tenascina C F16 (SEC ID N° 26) y su variante, 4A1-F16 (SEC ID N° 28). La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR1 del anticuerpo anti-tenascina C F16 (SEC ID N° 52) y 4A1-F16 (SEC ID N° 54) está subrayada. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR2 (SEC ID N° 58) de los anticuerpos anti-tenascina C F16 y F16-4A1 se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR3 (SEC ID N° 62) de los anticuerpos anti-tenascina C F16 y 4A1-F16 se muestra en negrita y subrayada.

La Figura 9B muestra las secuencias de aminoácidos de la secuencia enlazadora del anticuerpo anti-tenascina C F16 (SEC ID N° 122).

La figura 9C muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (VL) (SEC ID N° 88) de los anticuerpos anti-tenascina-C F16 y 4A1-F16. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera CDR1 (SEC ID N° 112) de los anticuerpos anti-tenascina-C F16 y 4A1-F16 está subrayada. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera CDR2 (SEC ID N° 116) de los anticuerpos anti-tenascina C F16 y F16-4A1 se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera CDR3 (SEC ID N° 120) de los anticuerpos anti-tenascina C F16 y 4A1-F16 se muestra en negrita y subrayada.

La Figura 10 muestra los resultados de formación de imágenes en el infrarrojo cercano de las lesiones de endometriosis en ratones. Las áreas de endometriosis en los ratones se indican mediante círculos. Las Figuras 10A y B muestran los resultados de formación de imágenes en el infrarrojo cercano usando una molécula de anticuerpo SIP(F8)-ALEXA750, que se une a ED-A. SIP(F8)-ALEXA750 se inyectó en ratones con endometriosis y se realizaron imágenes 24 horas después de la inyección. Las flechas indican áreas de imágenes positivas. La Figura 10C muestra los resultados de formación de imágenes en el infrarrojo cercano usando una molécula de anticuerpo que reconoce el dominio A1 humano de la tenascina-C. Se inyectó SIP (F16) -ALEXA750 en ratones con endometriosis y la imagen se obtuvo 24 horas después de la inyección.

La Figura 11 muestra los resultados de tinción ex vivo de lesiones de endometriosis murinas. Las Figuras 11A, B y C muestran la detección inmunofluorescente de SIP (F8) -ALEXA750 usando un anticuerpo IgE de conejo anti-humano seguido del anticuerpo IgG de cabra anti-conejo.

Las Figuras 11D, E y F muestran la detección de los vasos sanguíneos utilizando un anticuerpo anti-CD31 de rata seguido de IgG anti-rata de burro. Las Figuras 11 G, H e I representan controles negativos y muestran los resultados de probar las lesiones con IgG de anti-conejo de cabra solamente.

TERMINOLOGÍA

Fibronectina

La fibronectina es un antígeno sometido a corte y empalme alternativo y se conoce un número de isoformas alternativas de la fibronectina, como se describe en otra parte del presente documento. El dominio Extra-A (EDA o ED-A) también se conoce como ED, repetición A de tipo III extra (EIIIA) o EDI. La secuencia de ED-A humano ha sido publicada 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 a 1720 (fibronectina tipo III-12; dominio adicional 2) de la secuencia de aminoácidos depositada bajo el número de acceso P02751. La secuencia del ED-A de ratón también está disponible en la base de datos SwissProt, como los aminoácidos 1721-1810 (fibronectina tipo III-13; dominio adicional 2) de la secuencia de aminoácidos depositada bajo el número de acceso P11276.

La isoforma de ED-A de la fibronectina (A-FN) contiene el dominio A extra (ED-A). La secuencia de la A-FN humana se puede deducir a partir de la correspondiente secuencia precursora de la fibronectina humana, que está disponible en la base de datos SwissProt número de acceso P02751. La secuencia de la A-FN de ratón se puede deducir a partir de la correspondiente secuencia precursora de la fibronectina de ratón, que está disponible en la base de datos SwissProt número de acceso P11276. La A-FN puede ser la isoforma de ED-A humana de la fibronectina. El ED-A puede ser el dominio extra-A de la fibronectina humana.

El ED-A es una secuencia de 90 aminoácidos que se inserta en la fibronectina (FN) mediante corte y empalme alternativo y está situado entre el dominio 11 y 12 de FN (Borsi et al., 1987, J. Cell Biol., 104, 595-600). El ED-A está principalmente ausente en la forma plasmática de FN, pero es abundante durante la embriogénesis, la remodelación de tejido, la fibrosis, el trasplante cardíaco y el crecimiento del tumor sólido.

Corte y empalme alternativo

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. Después de la escisión de los intrones, la selección puede determinar qué exones se 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 correspondiente a uno o más exones, que puede comprender uno o más dominios.

Tenascina C

La tenascina-C es una glicoproteína grande hexamérica de la matriz extracelular que modula la adhesión celular. Está implicada en procesos tales como la proliferación celular y la migración celular y se asocia con cambios en la arquitectura del tejido como se producen durante la morfogénesis y la embriogénesis, así como bajo la tumorigénesis o la angiogénesis.

Se ha notificado un fuerte sobreexpresión de la isoforma grande de la tenascina C en una serie de tumores [Borsi 1992 citado anteriormente], y en la clínica se han caracterizado ampliamente los anticuerpos monoclonales específicos para los dominios A1 y D, respectivamente [Riva et al., Int J Cancer (1992) 51: 7-13; Riva et al., Cancer Res (1995), 55, 5952s-5956s; Paganelli et al., Eur J Nucl Med (1994) 21, 314-321. Reardon et al., J Clin Oncol (2002), 20, 1389-1397; Bigner et al., J Clin Oncol (1998) 16, 2202-2212].

Los fragmentos de anticuerpos monoclonales humanos específicos de la tenascina C se describen en el documento WO2006/050834 y se ha demostrado que se unen preferentemente a tejido tumoral con respecto al tejido normal. Estos anticuerpos son útiles, por ejemplo, en la liberación de toxinas, tales como citocinas, específicamente a las células tumorales.

Miembro de unión específica

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

Un miembro de unión específica comprende normalmente una molécula que tiene un sitio de unión al antígeno. Por ejemplo, un miembro de unión específica puede ser una molécula de anticuerpo o una proteína no anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno.

Un sitio de unión al antígeno puede proporcionarse por medio de la disposición de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) en los armazones de proteínas no anticuerpos, tales como fibronectina o citocromo B etc. Haan & Maggos, 2004; Koide 1998; Nygren 1997), o mediante aleatorización o mutación de residuos de aminoácidos de un bucle dentro de un armazón proteico para conferir especificidad de unión para una diana deseada. Los andamios para la ingeniería de nuevos sitios de unión en las proteínas se han revisado con detalle en Nygren et al. (1997). Los armazones proteicos para miméticos de anticuerpos se divulgan en el documento WO/0034784, en el que los inventores describen proteínas (miméticos de anticuerpos) que incluyen un dominio de tipo III de la 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 ser proporcionado por cualquier miembro de dominio de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas. El armazón puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de un armazón proteico que no es anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de unión al antígeno en una molécula de armazón que es más pequeña y / o más fácil de fabricar que al menos algunas moléculas de anticuerpo. El pequeño tamaño de un miembro de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles, tales como una capacidad para entrar en las células, penetrar profundamente en los tejidos o alcanzar las dianas dentro de otras estructuras o para unirse dentro de las cavidades de la proteína del antígeno diana. El uso de sitios de unión a antígeno en armazones de proteínas que no son anticuerpos se revisa en Wess, 2004. Típicas son las proteínas que tienen un esqueleto estable y uno o más bucles variables, en los que la secuencia de aminoácidos del bucle o bucles está específicamente o aleatoriamente mutada para crear un sitio de unión al 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, 10º dominio de tipo III de la fibronectina) y lipocalinas. Otros enfoques incluyen "Microcuerpos" sintéticos (Selecore GmbH), que se basan en ciclótidos - pequeñas proteínas que tienen enlaces disulfuro intramoleculares.

Además de las secuencias de anticuerpo y / o un sitio de unión al antígeno, un miembro de unión específica para su uso en la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, formando un péptido o polipéptido,

tal como un dominio plegado, o para impartir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad para unirse al antígeno. Los miembros de unión para su uso en la invención pueden llevar un marcador detectable, o puede conjugarse a una toxina o un resto o enzima dirigida (por ejemplo, mediante un enlace peptídico o enlazador). Por ejemplo, un miembro de unión puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio de enzima), así como un sitio de unión al antígeno, en el que el sitio de unión al antígeno se une al antígeno y, por lo tanto, dirige el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo, por escisión.

Aunque, como se ha indicado, las CDR pueden estar en armazones que no son anticuerpos, la estructura para portar una CDR o un conjunto de CDR será generalmente una secuencia de anticuerpo de cadena pesada o ligera o una porción sustancial de la misma en la que la CDR o un conjunto de CDR se encuentra en una localización correspondiente a la CDR o al conjunto de CDR de los dominios variables del anticuerpo VH y VL de origen natural codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y las ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse por referencia a Kabat 1987, y sus actualizaciones, ahora disponible en Internet (en immuno.bme.nwu.edu o encontrarse en "Kabat" utilizando cualquier motor de búsqueda).

Por región CDR o CDR se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina como se define en Kabat et al. (1987), (Kabat 1991a, y ediciones posteriores). Un anticuerpo contiene normalmente 3 CDR de la cadena pesada y 3 CDR de la cadena ligera. El término CDR se utiliza en el presente documento con el fin de indicar, de acuerdo con el caso, una de estas regiones o varias, o incluso la totalidad, de estas regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácidos responsables de la unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítipo que reconoce.

Entre las seis 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 disposición de los genes que la producen). Puede ser tan corta como de 2 aminoácidos, aunque el tamaño más largo conocido es 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).

Molécula de anticuerpo

Esto describe una inmunoglobulina producida de forma natural o sintética parcial o completamente. El término también se refiere a cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo. Se debe entender en el presente documento que la invención no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir, no están en su entorno natural sino que se han podido aislar u obtener mediante purificación a partir de fuentes naturales, o, de otro modo, obtener por recombinación genética, o mediante síntesis química, y que después pueden contener aminoácidos no naturales, 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 utilizar 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. Dichas técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las CDR, de un anticuerpo a las regiones constantes, o regiones constantes más regiones marco, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A y EP-A-239400, y una gran cantidad de literatura posterior. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo pueden estar sujetas a mutación genética o a otros cambios, que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Dado que los anticuerpos pueden modificarse de varias formas, la expresión "molécula de anticuerpo" debe interpretarse como que cubre cualquier miembro de unión o sustancia que tiene un sitio de unión antígeno - anticuerpo con la especificidad y / o la unión a antígeno requeridas. Por lo tanto, este término cubre fragmentos de anticuerpo y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión a antígeno del anticuerpo, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por tanto, están incluidas las moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión a antígeno del anticuerpo, o equivalente, fusionado a otro polipéptido (por ejemplo, derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo). La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y en una gran cantidad de literatura posterior.

Otras técnicas disponibles en la materia de la ingeniería de anticuerpos han hecho posible aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, los hibridomas humanos se pueden fabricar como describen Kontermann y Dubel (2001). La presentación en fagos, otra técnica establecida para la generación de miembros de unión, se ha descrito con detalle en muchas publicaciones tales como WO92/01047 (tratado más adelante) y las patentes de EE.UU. US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404 y Kontermann & Dubel (2001). Los ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpos de ratón están inactivados y funcionalmente sustituidos por genes de anticuerpos humanos mientras que dejan intactos otros componentes del sistema inmunológico del

ratón, se pueden utilizar para aislar anticuerpos humanos (Mendez 1997).

Las moléculas de anticuerpos sintéticos pueden crearse mediante la expresión de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados y ensamblados dentro de vectores de expresión adecuados, por ejemplo como se describe en Knappik et al. (2000) o Krebs et al. (2001).

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de antígenos de unión. Los 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 VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en los que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión de antígeno (Bird 1988; Huston 1988); (viii) dímeros Fv de cadena única biespecíficos (documento PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por fusión de genes (documento WO94/13804; Holliger 1993a). Las moléculas Fv, scFv o de diacuerpo pueden estabilizarse por la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter 1996). También pueden fabricarse 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 unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la 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 o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre.

Los fragmentos de anticuerpos para su uso en la invención se pueden obtener a partir de cualquiera de las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento, por ejemplo, moléculas de anticuerpo que comprenden los dominios VH y / o VL o CDR de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, por métodos tales como digestión enzimática, tales como pepsina o papaína y / o mediante escisión de los puentes disulfuro por reducción química. En otra forma, los fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden obtenerse mediante técnicas de recombinación genética igualmente bien conocidas por el experto en la materia o bien mediante síntesis peptídica por medio de, por ejemplo, sintetizadores de péptidos automáticos tales como los suministrados por la empresa Applied Biosystems, etc., o mediante síntesis y expresión de de ácidos nucleicos.

Los fragmentos de anticuerpos funcionales de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier fragmento funcional cuya semivida se incrementa por una modificación química, especialmente mediante PEGilación, o mediante incorporación en un liposoma.

Un dAb (anticuerpo de dominio) es un pequeño fragmento monomérico de unión al antígeno de un anticuerpo, a saber, la región variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo (Holt 2003). Los VH dAb se producen naturalmente en los camélidos (por ejemplo, camello, llama) y pueden producirse mediante la inmunización de un camélido con un antígeno diana, aislando las células B específicas de antígeno y la clonación directa de genes de dAb partir de células B individuales. Los dAb también se pueden producir en cultivo celular. Su pequeño tamaño, buena solubilidad y estabilidad a la temperatura hace que sean particularmente fisiológicamente útiles y adecuados para la selección y maduración de afinidad. Un miembro de unión de la presente invención puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL sustancialmente como se establece en el presente documento, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente tal como se establece en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la frase "sustancialmente tal como se establece" se refiere a la o las características de las CDR pertinentes del dominio VH o VL de los miembros de unión descritos en el presente documento serán idénticas o muy similares a las regiones especificadas de las cuales la secuencia se establece en el presente documento. Como se describe en el presente documento, la frase "muy similares" con respecto a la o las regiones especificadas de uno o más dominios variables, se contempla que se pueden hacer de 1 a aproximadamente 5, por ejemplo, de 1 a 4, incluyendo de 1 a 3, o 1 o 2, o 3 o 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 la que dos regiones variables diferentes se combinan en la misma molécula (Holliger 1999). Su uso ha sido demostrado tanto en el campo del diagnóstico como en el campo de la terapia por su capacidad para reclutar nuevas funciones efectoras o para apuntar a varias moléculas en la superficie de las células tumorales. Cuando se van a usar anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden fabricarse de muchas formas (Holliger 1993b), por ejemplo, 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 1. 995) o métodos somáticos (Staerz 1986; Suresh 1986), aunque también mediante técnicas de ingeniería genética que permiten forzar la heterodimerización y, de este modo, facilitar el proceso de purificación del anticuerpo buscado (Merchand 1998). Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen los de la tecnología BiTE[™] en la que los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad se pueden utilizar y directamente unir a través de péptidos cortos flexibles. Esto combina dos anticuerpos en una única cadena de polipéptido corta. Los diacuerpos y los scFv pueden

construirse sin una región Fc, usando solo dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de la reacción anti-idiotipo.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden construir como una IgG entera, un Fab'2 biespecífico, como Fab'PEG, como diacuerpos o bien como scFv biespecífico. Además, se pueden unir dos anticuerpos biespecíficos usando métodos de rutina conocidos en la técnica para formar anticuerpos tetravalentes.

Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos biespecíficos enteros, también pueden ser particularmente útiles porque pueden construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpos) de especificidades de unión apropiadas pueden seleccionarse fácilmente usando la presentación en fagos (documento WO94/13804) a partir de bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo debe mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra un antígeno diana, después se puede hacer una biblioteca en la que el otro brazo se varía y se selecciona un anticuerpo de especificidad apropiada. Los anticuerpos biespecíficos completos se pueden preparar por métodos de ingeniería alternativos como se describe en Ridgeway 1996.

En la técnica están disponibles varios métodos para la obtención de anticuerpos contra un antígeno diana. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, especialmente de origen humano, murino, quimérico o humanizado, que se pueden obtener de acuerdo con los métodos estándar bien conocidos por la persona experta en la técnica.

En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible hacer referencia a las 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.

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener, por ejemplo, a partir de una célula animal inmunizada contra A-FN o tenascina C, o uno de sus fragmentos que contienen el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo, un fragmento que comprende o que consiste en ED-A o el dominio A1, A2, A3, A4, B o D de la isoforma grande de la tenascina C, o un fragmento de péptido de la DE-A o el dominio A1, A2, A3, A4, B o dominio D de la isoforma grande de la tenascina C. A-FN o tenascina C, o uno de sus fragmentos, se pueden producir especialmente de acuerdo con los métodos de trabajo habituales, por recombinación genética empezando con una secuencia de ácido nucleico contenida en la secuencia de ADNc que codifica A-FN o tenascina C, o fragmento de la misma, mediante síntesis de péptidos a partir de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia peptídica de la A-FN o tenascina C y / o fragmento de la misma.

Los anticuerpos monoclonales pueden, por ejemplo, purificarse en una columna de afinidad en la que A-FN o tenascina C, o uno de sus fragmentos que contienen el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo, un fragmento que comprende o que consiste en ED-A o tenascina C, o un fragmento de péptido de ED-A DE-A o tenascina C, se ha inmovilizado previamente. Los anticuerpos monoclonales pueden purificarse por cromatografía en proteína A y / o G, seguida o no seguida de cromatografía de intercambio iónico dirigida a eliminar los contaminantes de proteínas residuales, así como el ADN y los LPS, en sí misma, seguida o no seguida de cromatografía de exclusión en gel de Sepharose para eliminar los agregados potenciales debido a la presencia de dímeros o de otros multímeros. El conjunto de estas técnicas se puede utilizar de forma simultánea o sucesivamente.

Sitio de unión al antígeno

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

Aislado

Esto se refiere al estado en el que miembros de unión específica para su uso en la invención o ácidos nucleicos que codifican dichos miembros de unión específica, en general, serán conforme a la presente invención. Por tanto, los miembros de unión específica, los dominios VH y/o VL de la presente invención se pueden proporcionar aislados y/o purificados, por ejemplo, de su entorno natural en una forma sustancialmente pura u homogénea o, en el caso de ácido nucleico, libres o sustancialmente libres de ácido nucleico o genes de origen distinto a la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. Los miembros aislados y el ácido nucleico aislado estarán libres o sustancialmente libres de material con el que están asociados naturalmente, tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su ambiente natural, o el entorno en el que se preparan (por ejemplo cultivo celular) cuando tal preparación es mediante tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los

miembros de unión específica y el ácido nucleico pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y todavía aislarse para fines prácticos, por ejemplo los miembros normalmente se mezclarán con gelatina u otros vehículos si se usan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se utilizan en el diagnóstico o terapia. Los miembros de unión específica

5 pueden estar glicosilados, bien de forma natural o mediante sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NS0 (ECACC 85110503), o pueden ser (por ejemplo si se producen mediante expresión en una célula procariota) no glicosilados.

10 Las preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpo también se pueden utilizar en la invención. 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 varios grados de glicosilación y / o con aminoácidos derivatizados, tales como ciclación de un ácido glutámico N-terminal de formar un residuo de ácido piroglutámico.

15 Uno o más miembros de unión específica para un antígeno, por ejemplo, A-FN, la tenascina C, el ED-A de la fibronectina, o los dominios A1, A2, A3, A4, B o D de la isoforma grande de la tenascina C se pueden obtener poniendo en contacto una biblioteca de miembros de unión específica de acuerdo con la invención y el antígeno o un fragmento del mismo, por ejemplo, un fragmento que comprende o que consiste en ED-A o tenascina C, o un fragmento peptídico de ED-A o tenascina C y seleccionando uno o más miembros de unión específica de la

20 biblioteca capaces de unirse al antígeno.

Una biblioteca de anticuerpos puede cribarse utilizando un cribado con filtros de colonias iterativo (ICFS). En el ICFS, las bacterias que contienen el ADN que codifica varias especificidades de unión se cultivan en un medio líquido y, una vez que se ha alcanzado la etapa de crecimiento exponencial, algunos miles de millones de ellas se

25 distribuyen sobre un soporte de crecimiento que consiste en un filtro de membrana adecuadamente pre-tratado, que se incuban hasta la aparición de colonias de bacterias completamente confluentes. Un segundo sustrato trampa consiste en otro filtro de membrana, prehumidificado y cubierto con el antígeno deseado.

El filtro de membrana trampa se coloca después sobre una placa que contiene un medio de cultivo adecuado y se cubre con el filtro de crecimiento con la superficie cubierta con colonias bacterianas que apuntan hacia arriba. El sándwich obtenido de este modo se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas. Por tanto, es posible obtener la expresión de los genes que codifican los fragmentos de anticuerpo scFv que tiene una acción de diseminación, de modo que los fragmentos que se unen específicamente con el antígeno que está presente en la membrana trampa quedan atrapados. Después, la membrana trampa se trata para destacar los fragmentos de

35 anticuerpos scFv unidos con técnicas colorimétricas utilizadas habitualmente para este propósito.

La posición de los puntos coloreados sobre el filtro trampa permite volver a las colonias bacterianas correspondientes que están presentes en la membrana de crecimiento y producen los fragmentos de anticuerpos atrapados. Estas colonias se recogen y se cultivan y las bacterias, unos pocos millones de ellas, se distribuyen sobre una nueva membrana de cultivo repitiendo los procedimientos descritos anteriormente. Después se llevan a cabo ciclos análogos hasta que las señales positivas en la membrana trampa corresponden a las colonias positivas individuales, cada una de las cuales representa una fuente potencial de fragmentos de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno utilizado en la selección. El ICFS se describe en, por ejemplo, el documento WO0246455.

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

Después de la selección de miembros de unión capaces de unirse al antígeno y expresarse en bacteriófagos u otras partículas o complejos moleculares de la biblioteca, el ácido nucleico se puede tomar de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que muestra dicho miembro de unión seleccionado. Tal ácido nucleico puede usarse en la posterior producción de un miembro de unión o un dominio variable VH o VL del anticuerpo mediante la expresión a partir del ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico tomada de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que muestra un dicho miembro de unión seleccionado.

60 Un dominio variable VH del anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio variable VH del anticuerpo de un dicho miembro de unión seleccionado puede proporcionarse en forma aislada, como también puede un miembro de unión que comprende un dominio VH tal.

65 La capacidad de unir la A-FN o la tenascina C, o el ED-A de la fibronectina o el dominio A1, A2, A3, A4, B o el D de la isoforma grande de la tenascina C, o de otro antígeno diana o isoforma puede determinarse después, 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 A-FN o un fragmento de la A-FN, por ejemplo, el ED-A de la fibronectina, o un anticuerpo anti-tenascina C, tales como F16-F16 o 4A1, por la unión a la tenascina C o a un fragmento de tenascina C, por ejemplo, el dominio A1, A2, A3, A4, B o D de la isoforma grande de la tenascina C.

- 5 Un miembro de unión específica para su uso en la invención puede unirse a A-FN y / o al ED-A de la fibronectina específicamente. Un miembro de unión específica de la presente invención puede unirse a A-FN y / o al ED-A de la fibronectina, o la tenascina C, y / o el dominio A1 de la isoforma grande de la tenascina C, con la misma afinidad que un anticuerpo anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9, por ejemplo, en el formato scFv, o como los anticuerpos anti-tenascina C F16 o 4A1-F16, respectivamente, o con una afinidad mejor. Un miembro de unión
- 10 específica para su uso en la invención puede unirse a A-FN y / o al ED-A de la fibronectina con una K_D de $3 \times 10^{-8}M$ o una afinidad que es mejor. Preferentemente, un miembro de unión específica para su uso en la invención se une a A-FN y / o al ED-A de la fibronectina con una K_D de $2 \times 10^{-8}M$ o una afinidad que es mejor. Más preferentemente, un miembro de unión específica para su uso en la invención se une a A-FN y / o al ED-A de la fibronectina con una K_D de $1,7 \times 10^{-8}M$ o una afinidad que es mejor. Todavía más preferentemente, un miembro de unión específica para su
- 15 uso en la invención se une a A-FN y / o al ED-A de la fibronectina con una K_D de $1,4 \times 10^{-8}M$ o una afinidad que es mejor. Lo más preferentemente, un miembro de unión específica para su uso en la invención se une a A-FN y / o al ED-A de la fibronectina con una K_D de $3 \times 10^{-9}M$ o una afinidad que es mejor.

- 20 Un miembro de unión específica de la presente invención puede unirse al mismo epítipo en A-FN y / o el ED-A de la fibronectina como uno de los anticuerpos anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9.

Un miembro de unión específico para su uso en la invención puede no mostrar ninguna unión significativa a moléculas distintas de la A-FN y / o ED-A de la fibronectina.

- 25 En particular, el miembro de unión específica puede no unirse a otras isoformas de la fibronectina, por ejemplo la isoforma ED-B y / o la isoforma IIICS de la fibronectina.

- 30 Las variantes de las moléculas de anticuerpo divulgadas en el presente documento pueden producirse y usarse en la presente invención. Las técnicas requeridas para hacer sustituciones dentro de secuencias de aminoácidos de las CDR, los dominios VH o VL de los anticuerpos y los miembros de unión generalmente están disponibles en la técnica. Las secuencias variantes se pueden hacer, con sustituciones que pueden o no predecirse que tienen un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, analizarse la capacidad de unirse a A-FN y / o a ED-A de la fibronectina, y / o por cualquier otra propiedad deseada.

- 35 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 usarse de conformidad con la presente invención, como se ha tratado. 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
- 40 aproximadamente 10 alteraciones o menos de aproximadamente 5 alteraciones, tal vez 5, 4, 3, 2 o 1. Las alteraciones se pueden hacer en una o más regiones estructurales y / o una o más CDR. Las alteraciones normalmente no dan lugar a pérdida de la función, por lo que un miembro de unión específica que comprende una secuencia de aminoácidos alterada de este modo puede retener la capacidad de unirse a A-FN y / o al ED-A de la fibronectina. Por ejemplo, puede mantener la misma unión cuantitativa como miembro de unión específica en la que
- 45 no se hace la alteración, por ejemplo, como se mide en un ensayo descrito en el presente documento. El miembro de unión específica que comprende una secuencia de aminoácidos alterada de este modo puede tener una mejor capacidad de unirse a A-FN y / o al ED-A de la fibronectina.

- 50 Se pueden generar nuevas regiones VH o VL que portan las secuencias derivadas de CDR para su uso en la invención usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes de VH y / o VL seleccionados para generar mutaciones dentro de todo el dominio variable. En algunas realizaciones se realizan una o dos sustituciones de aminoácidos dentro de un dominio variable completo o conjunto de CDR. Otro método que puede usarse es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de genes de VH o VL.

- 55 Como se ha indicado anteriormente, una secuencia de aminoácidos de CDR sustancialmente como se ha establecido en el presente documento se puede portar como una CDR en un dominio variable de anticuerpo humano o una porción sustancial del mismo. Las secuencias HCDR3 sustancialmente como se establecen en el presente documento representan formas de realización de la presente invención y, por ejemplo, cada una de estas puede llevar como una HCDR3 en un dominio variable de la cadena pesada humana o una porción sustancial de la misma.

- 60 Los dominios variables empleados en la invención pueden obtenerse o derivarse de cualquier línea germinal o dominio variable humano reordenado, o pueden ser un dominio variable sintético basado en secuencias consenso o reales de los dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable se puede derivar de un anticuerpo no humano. Una secuencia de CDR para su uso en la invención (por ejemplo, CDR3) puede introducirse en un
- 65 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 para producir repertorios de dominios variables

de anticuerpos en los que se usan cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' de la zona de dominio variable conjuntamente con cebadores consenso para la tercera región marco de los genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una CDR3. Marks et al. describen además cómo este repertorio se puede combinar con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención pueden mezclarse con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos barajados combinarse con un dominio VL o VH afín para proporcionar miembros de unión para su uso en la invención. El repertorio puede expresarse después en un sistema huésped adecuado tal como el sistema de expresión en fagos del documento WO92/01047 o cualquiera de un gran cantidad de literatura posterior, incluyendo Kay, Winter & McCafferty (1996), por lo que se pueden seleccionar los miembros de unión adecuados. Un repertorio puede consistir en cualquier desde 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.

Del mismo modo, una o más, o las tres CDR pueden injertarse en un repertorio de dominios VH o VL que luego se someten a detección selectiva para buscar un miembro de unión o miembros de unión para A-FN y / o el ED-A de la fibronectina.

Se pueden usar una o más de las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9, o el conjunto de HCDR de anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9, y/o se pueden usar una o más de las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9, o el conjunto de LCDR de anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9.

Del mismo modo, se pueden usar otros dominios VH y VL, conjuntos de CDR y conjuntos de HCDR y / o conjuntos de LCDR divulgados en el presente documento.

El A-FN y / o el ED-A de la fibronectina se pueden usar en una detección selectiva de moléculas de anticuerpo para uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la endometriosis, psoriasis o artritis psoriásica. La detección selectiva puede una detección selectiva de un repertorio como se ha divulgado en el presente documento.

Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina puede comprender al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones marco intermedias. La porción también puede incluir al menos aproximadamente 50 % de una o ambas de las regiones marco primera y cuarta, siendo el 50 % en C-terminal de la primera región marco y el 50 % en N-terminal de la cuarta región marco. 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 las regiones del dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión específica de la presente invención realizada mediante técnicas de ADN recombinante puede resultar en la introducción de residuos en los extremos N o C codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir dominios variables divulgados en otra parte del presente documento otras secuencias de proteínas que incluyen regiones constantes de anticuerpos, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o marcadores detectables / funcionales como se discute con más detalle en otra parte en el presente documento.

Aunque los miembros de unión específica pueden comprender un par de dominios VH y VL, los dominios de unión individuales basados en cualquiera de las secuencias de los dominios VH o VL también se pueden usar en la invención. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina individuales, especialmente los dominios VH, son capaces de unirse antígenos diana de una manera específica. Por ejemplo, véase la discusión de dAb anterior.

En el caso de cualquiera de los dominios de unión individuales, estos dominios pueden usarse para la detección selectiva de dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión de dos dominios capaz de unirse a A-FN y / o a ED-A de la fibronectina. Esto se puede lograr por métodos de detección selectiva de expresión en fagos utilizando el denominado enfoque combinatorio dual jerárquico como se describe en el documento WO92/01047, en la cual una colonia individual que contiene un clon de la cadena H o L se utilizó para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión de dos cadenas resultante se selecciona de acuerdo con técnicas de expresión en fagos tales como las descritas en esa referencia. Esta técnica también se divulga en Marks 1992.

Los miembros de unión específica para su uso en la presente invención pueden comprender además regiones constantes de anticuerpos o partes del mismo, por ejemplo, regiones constantes de anticuerpos humanos o partes de los mismos. Por ejemplo, un dominio VL puede estar unido en su extremo C-terminal a dominios constantes de la cadena ligera de anticuerpos, incluyendo las cadenas C κ o C λ humanas, por ejemplo, C λ . Del mismo modo, un miembro de unión específica basado en un dominio VH puede estar unido en su extremo C-terminal a la totalidad 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 isotipo, particularmente de IgG1 e IgG4. Cualquier variante de región constante sintética o de otro tipo que tenga estas propiedades y estabilice regiones variables también es útil en realizaciones de la presente invención.

Los miembros de unión específica para su uso en la invención pueden marcarse con un marcador detectable o funcional. Un marcador puede ser cualquier molécula que produce o puede inducirse para que produzca una señal, incluyendo, pero no limitado a, fluorescentes, marcadores radiactivos, enzimas, agentes quimioluminiscentes o fotosensibilizadores. Por lo tanto, la unión se puede detectar y / o medido mediante la detección de fluorescencia o luminiscencia, radioactividad, actividad enzimática o absorción de luz. Los marcadores detectables se pueden unir a anticuerpos para su uso en la invención utilizando la química convencional conocida en la materia.

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

Los miembros de unión específica marcados, por ejemplo, scFv marcado con un marcador detectable, se pueden usar para el diagnóstico *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, y / o terapéuticamente.

Por ejemplo, los miembros de unión radiomarcados (por ejemplo, los miembros de unión conjugados a un radioisótopo) pueden usarse en radiodiagnóstico y radioterapia. Los radioisótopos que se pueden conjugar con un miembro de unión para su uso en la invención incluyen isótopos tales como ^{94m}Tc , ^{99m}Tc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{47}Sc , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{121}Sn , ^{161}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{105}Rh , ^{177}Lu , ^{123}YO , ^{124}YO , ^{125}YO , ^{131}YO , ^{18}F , ^{211}A y ^{225}Ac . Preferentemente, emisores de positrones, tales como ^{18}F y ^{124}I , o emisores gamma, tales como emisores ^{99m}Tc , ^{111}Y en ^{123}T , se utilizan para aplicaciones de diagnóstico (por ejemplo, para el PET), mientras que los beta-emisores, tales como ^{131}YO , ^{90}Y y ^{177}Lu , se utilizan preferentemente para aplicaciones terapéuticas. Los emisores alfa, tales como ^{211}A y ^{225}Ac también se puede utilizar para la terapia.

Por ejemplo, un miembro de unión específica para su uso en la invención marcado con un marcador detectable puede usarse para detectar, diagnosticar o controlar la endometriosis en un ser humano o animal.

Un miembro de unión específica de la presente invención puede usarse para la fabricación de un producto de diagnóstico para su uso en el diagnóstico de endometriosis.

En el presente documento se divulga un método para detectar o diagnosticar endometriosis, psoriasis o artritis psoriásica en un humano o animal que comprende:

- (a) administrar al ser humano o animal un miembro de unión específica de la presente invención, por ejemplo marcado con un marcador detectable, que se une la isoforma de ED-A de la fibronectina y / o al ED-A de la fibronectina, o tenascina C y / o al dominio A1, A2, A3, A4, B y / o D de la isoforma grande de la tenascina C, y
- (b) determinar la presencia o ausencia del miembro de unión específico en los sitios de la endometriosis, psoriasis o artritis psoriásica del cuerpo humano o animal;

en el que la localización del miembro de unión específica a los sitios de la endometriosis, psoriasis o artritis psoriásica indica la presencia de endometriosis, psoriasis o artritis psoriásica.

Cuando el miembro de unión se marca con un marcador detectable, la presencia o ausencia del marcador detectable se puede determinar mediante la detección del marcador.

Un conjugado o fusión entre un miembro de unión para su uso en la invención y una molécula que ejerce un efecto biocida, citotóxico, inmunosupresor o antiinflamatorio en las células diana en las lesiones y un anticuerpo dirigido contra un componente de la matriz extracelular que está presente en tales lesiones pueden usarse en la presente invención. Por ejemplo, la molécula conjugada puede ser, entre otras, interleucina-10, TGF- β , IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, IL-24, IL-33, factor de necrosis tumoral (TNF), o interferón- α , - β o - γ , un fármaco antiinflamatorio o de otro tipo, un fotosensibilizador o un radionúclido. Tales conjugados se pueden usar terapéuticamente, por ejemplo, para el tratamiento de endometriosis, psoriasis o artritis psoriásica como se hace referencia en el presente documento.

La producción y uso de fusiones o conjugados de miembros de unión específica con moléculas biocidas o citotóxicas se describen por ejemplo en el documento WO01/62298.

En el presente documento se divulga un método de tratamiento de la endometriosis, comprendiendo el método administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión específica para su uso en la invención.

El miembro de unión para su uso en la invención específico puede ser un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto antiinflamatorio en las células diana mediante interacción celular, una molécula antiinflamatoria, una citocina, por ejemplo IL-10, TGF- β , IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, IL-24, IL-33, factor de necrosis tumoral (TNF), interferón- α , - β o - γ , o otro fármaco, y (ii) una molécula de anticuerpo para la isoforma ED-A de fibronectina y / o el ED-A de la fibronectina.

El miembro de unión específica para su uso en la invención específico puede ser un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto inmunosupresor o antiinflamatorio y (ii) una molécula de anticuerpo para la isoforma de ED-A de la fibronectina y / o el ED-A de la fibronectina.

5 El miembro de unión específica para su uso en la invención específico puede ser un conjugado de (i) la interleucina-10 (IL10) o TGF beta y (ii) una molécula de anticuerpo para la isoforma de ED-A de la fibronectina y / o el ED-A de la fibronectina. Tal miembro de unión específica es útil en aspectos de la invención divulgados en el presente documento en relación al tratamiento de la endometriosis.

10 La invención proporciona el uso de un miembro de unión específica como se describe en el presente documento para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la endometriosis.

El miembro de unión específica para su uso en la invención puede ser un conjugado o fusionado a una molécula que ejerce un efecto biocida, citotóxico, inmunosupresor o antiinflamatorio tal como se describe en el presente documento. El miembro de unión específica para su uso en la invención específico puede ser un conjugado de (i)

15 una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre las células diana mediante interacción celular o tiene un efecto inmunosupresor o antiinflamatorio y (ii) una molécula de anticuerpo para la isoforma de ED-A de la fibronectina y / o el ED-A de la fibronectina.

20 En el presente documento también se describe un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre las células diana mediante interacción celular o tiene un efecto inmunosupresor o antiinflamatorio y (ii) una molécula de anticuerpo para la isoforma de ED-A de la fibronectina y / o el ED-A de la fibronectina. Dicho conjugado comprende preferentemente una proteína de fusión que comprende la molécula biocida, citotóxica, inmunosupresora o antiinflamatoria y un dicho miembro de unión, o, cuando el miembro de unión es una proteína de fusión, de dos cadenas o de múltiples cadenas, una proteína de fusión que comprende la molécula biocida, citotóxica, inmunosupresora o antiinflamatoria y un componente de cadena polipeptídica de dicho miembro de unión. Preferentemente, el miembro de unión es un polipéptido de una sola cadena, por ejemplo, una molécula de anticuerpo de una sola cadena, tal como scFv.

25

30 Una proteína de fusión que comprende la molécula inmunosupresora o antiinflamatoria y un anticuerpo Fv de cadena sencilla de se pueden usar en la invención.

La molécula inmunosupresora o antiinflamatoria que ejerce su efecto sobre las células diana mediante interacción celular, puede interaccionar directamente con las células diana, puede interaccionar con un receptor unido a la

35 membrana en la célula diana o perturbar el potencial electroquímico de la membrana celular. Preferentemente, la molécula es IL-10 o TGF- β .

Ejemplos de otras moléculas que pueden conjugarse con el miembro de unión específica incluyen IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, IL-24, IL-33, factor de necrosis tumoral (TNF), o interferón- α , - β o - γ .

40

Como se discute más adelante, el miembro de unión específica para su uso en la invención es una molécula de anticuerpo. Convenientemente, el miembro de unión específica puede ser un polipéptido de una sola cadena, tal como un anticuerpo de una sola cadena. Esto permite la producción conveniente de una proteína de fusión que comprende el anticuerpo de una sola cadena y, por ejemplo, la molécula inmunosupresora o antiinflamatoria (por ejemplo, interleucina-10 o TGF beta). Un sitio de unión a antígeno del anticuerpo puede proporcionarse por medio de 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 miembro de unión específica es una molécula de cadena doble o de múltiples cadenas (por ejemplo, Fab o anticuerpo entero, respectivamente), una molécula inmunosupresora o antiinflamatoria, por ejemplo, se puede conjugar como un polipéptido de fusión con una o más cadenas polipeptídicas en el miembro de unión específica

45

50

El miembro de unión específica puede conjugarse con la molécula inmunosupresora o antiinflamatoria por medio de un enlace peptídico, es decir, dentro de un polipéptido de fusión que comprende dicha molécula y el miembro de unión específica o un componente de cadena polipeptídica de la misma (véase, por ejemplo, Trachsel et al.). Otros medios para la conjugación incluyen conjugación química, especialmente la reticulación usando un reactivo bifuncional (por ejemplo, empleando DOUBLE-REAGENTS™ Cross-linking Reagents Selection Guide, Pierce).

55

En el presente documento también se describe un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión específica para su uso en la presente invención. El ácido nucleico puede incluir ADN y / o ARN. Un ácido nucleico puede codificar una CDR o un conjunto de CDR o un 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 ha definido anteriormente. Las secuencias de nucleótidos pueden codificar los dominios VH y / o VL divulgados en el presente documento.

60

En el presente documento también se describen construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido como se ha descrito anteriormente.

65

- También se describen una célula huésped recombinante que comprende una o más construcciones como anteriormente. Se describe un ácido nucleico que codifica 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 como se ha proporcionado, como también un método de producción del producto codificado, cuyo procedimiento comprende la expresión a partir de ácido nucleico codificante. La expresión puede conseguirse convenientemente cultivando en condiciones apropiadas células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Tras la producción mediante la expresión de un dominio VH o VL o el miembro de unión específica se puede aislar y/o purificar usando cualquier técnica adecuada, después se puede usar según sea adecuado.
- Un ácido nucleico puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos 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 U se sustituye por T, a menos que el contexto requiera lo contrario.
- También se describe un método de producción de un dominio variable VH de anticuerpo, incluyendo el procedimiento el método causar la expresión a partir de ácido nucleico codificante. Dicho método puede comprender el cultivo de 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 la formulación del producto en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Se conocen bien sistemas para clonación y expresión de un polipéptido en varias células huésped diferentes. Entre células huésped adecuadas se 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 anticuerpos en células procariotas está bien establecida en la técnica. Para una revisión, véase por ejemplo, Pluckthun 1991. Un huésped bacteriano común es *E. coli*.
- La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica como una opción para la producción de un miembro de unión específica, por ejemplo Chadd & Chamow (2001), Andersen & Krummen (2002), Larrick & 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 de riñón de cría de hámster, células de melanoma de ratón NS0, células de mieloma de rata YB2 / 0, células de riñón de embriones humanos, células retina embrionaria humana y muchas otras.
- Se pueden escoger o construir vectores adecuados que contengan las secuencias reguladoras adecuadas, incluidas secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras o genes marcadores y otras secuencias, según sea adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, por ejemplo fagemidos, o virales, por ejemplo, fagos, según sea adecuado. Para detalles adicionales, véase, por ejemplo, Sambrook & Russell (2001). Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen con detalle en Ausubel 1999.
- Una célula huésped puede contener un ácido nucleico como se describe en el presente documento. Dicha célula huésped puede ser *in vitro* y pueden estar en cultivo. Dicha célula huésped puede ser *in vivo*. La presencia *in vivo* de la célula huésped puede permitir la expresión intracelular de un miembro de unión para su uso en la presente invención como "intracuerpos" o anticuerpos intracelulares. Los intracuerpos pueden usarse para la terapia génica.
- También se describe un método que comprende introducir un ácido nucleico divulgado en el presente documento en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas de transfección adecuadas pueden incluir transfección con fosfato cálcico, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. La introducción de ácido nucleico en la célula huésped, en particular una célula eucariota, puede utilizar un virus o un sistema basado en plásmido. El sistema de plásmido puede mantenerse episomal o se puede incorporar en la célula huésped o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser mediante integración aleatoria o dirigida de una o más copias en los loci individuales o múltiples. Para las células bacterianas, técnicas adecuadas pueden incluir transformación de cloruro cálcico, electroporación y transfección usando bacteriófagos.
- La introducción puede ir seguida de causar o permitir la expresión a partir del ácido nucleico, por ejemplo, mediante el cultivo de células huésped en condiciones para la expresión del gen. La purificación del producto expresado puede lograrse por métodos conocidos para un experto en la técnica.
- El ácido nucleico puede integrarse en el genoma (por ejemplo cromosoma) de la célula huésped. La integración puede estimularse mediante la inclusión de secuencias que estimulan la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.

También se describe un método que comprende el uso de una construcción como se ha indicado anteriormente en un sistema de expresión para expresar un miembro de unión específico o polipéptido como anteriormente.

Los miembros de unión específica para su uso en la presente invención están diseñados para usarse en métodos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, por ejemplo, humano. Los miembros de unión específica para su uso en la invención se pueden usar en el diagnóstico o el tratamiento de la endometriosis.

De acuerdo con lo anterior, en el presente documento se divulgan métodos de tratamiento que comprenden la administración de un miembro de unión específica como se describe, composiciones farmacéuticas que comprenden dicho miembro de unión específica, y el uso de dicho miembro de unión específica en la fabricación de un medicamento para la administración, por ejemplo en un método de preparar un medicamento o composición farmacéutica que comprende formular el miembro de unión específica con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y serán adaptados por la persona experta en la técnica como una función de la naturaleza y del modo de administración del o los compuestos activos elegidos.

Los miembros de unión específica para su uso en la presente invención generalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión específica. Por tanto, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento y para usar de acuerdo con la presente invención pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otro material farmacéuticamente aceptables bien conocidos para los expertos en la técnica. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir en la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, inhalada o mediante inyección, por ejemplo intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral, tales como por ejemplo nanocuerpos etc. también se contemplan en la presente invención. Tales formulaciones orales pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvo, líquidas o semi-sólidas. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. En general, las composiciones farmacéuticas líquidas pueden comprender un vehículo líquido, tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se puede incluir solución fisiológica salina, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para la inyección intravenosa, o la inyección en el punto de afección, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que carece de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica tienen la capacidad de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Según se requiera se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos. Muchos métodos para la preparación de formulaciones farmacéuticas son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Robinson, 1978.

Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, simultáneamente o secuencialmente o como un preparado combinado con otro agente o agentes terapéuticos, dependiendo de la afección que se va a tratar.

Un miembro de unión específica para su uso en la presente invención puede usarse como parte de una terapia de combinación junto con un componente medicinal adicional. Los tratamientos de combinación pueden usarse para proporcionar efectos sinérgicos significativos, particularmente la combinación de un miembro de unión específica para su uso en la presente invención con uno o más de otros fármacos. Un miembro de unión específica para su uso en la presente invención puede administrarse simultáneamente o secuencialmente o como un preparado combinado con otro agente o agentes terapéuticos, para el tratamiento de una o más de las afecciones mencionadas en el presente documento.

Por ejemplo, un miembro de unión específica para su uso en la invención puede usarse en combinación con un agente terapéutico existente para el tratamiento de la endometriosis.

Un miembro de unión específico para su uso en la invención y uno o más de los componentes medicinales adicionales anteriores se pueden utilizar en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para la administración separada o combinada a un individuo y, de acuerdo con lo anterior, puede comprender el miembro de unión específica y el componente adicional como una preparación combinada o como preparaciones separadas. Las preparaciones separadas se pueden utilizar para facilitar la administración independiente y secuencial o simultánea, y permitir la administración de los componentes por diferentes vías por ejemplo, la administración oral y parenteral.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones proporcionadas pueden administrarse a mamíferos. La administración puede ser en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esto suficiente para mostrar un beneficio a un paciente. Dicho beneficio puede ser, al menos, mejora de al menos un síntoma. Por tanto, "tratamiento de la endometriosis," se refiere a la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la velocidad y el

curso temporal de la administración, dependerá de la naturaleza y gravedad de lo que está siendo tratado, el mamífero particular que se esté tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de liberación de la composición, el tipo de miembro de unión específica, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos generales y otros médicos, y pueden depender de la gravedad de los síntomas y / o progresión de una enfermedad que se está tratando. Las dosis apropiadas de anticuerpo son bien conocidas en la técnica (Ledermann 1991 y Bagshawe 1991). Se pueden usar las dosis específicas indicadas en el presente documento, o en Physician's Desk Reference (2003) según sea apropiado para el tipo de medicamento que se administra. Una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis adecuada de un miembro de unión específica para su uso en la invención se pueden determinar comparando su actividad *in vitro* y la actividad *in vivo* en un modelo animal. Se conocen métodos para la extrapolación de las dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de prueba a los seres humanos. La dosis precisa dependerá de una serie de factores, incluyendo si el anticuerpo es para el diagnóstico, la prevención o para el tratamiento, el tamaño y la ubicación de la zona a tratar, la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo completo, fragmento o diacuerpo), y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis típica del anticuerpo estará en el intervalo de 100 µg hasta 1 g para aplicaciones sistémicas, y de 1 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguida de uno o más dosis menores. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo entero, por ejemplo el isotipo IgG1 o IgG4. Esta es una dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños y lactantes, y también ajustarse para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a diario, dos veces a la semana, 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 período entre administraciones es de aproximadamente dos semanas o más, por ejemplo de 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 la cirugía, y se puede administrar o aplicar directamente en el sitio anatómico del tratamiento quirúrgico.

Otros aspectos y realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica dada la presente divulgación, incluyendo la siguiente ejemplificación experimental.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

RESULTADOS

Análisis histoquímico de muestras de endometriosis humana

La expresión de los dominios ED-A y ED-B de la fibronectina y el dominio A1 de la isoforma grande de la tenascina se investigó mediante inmunohistoquímica en muestras de endometriosis humana utilizando los anticuerpos F8, L19- y F16-SIP biotinilados, respectivamente. Los resultados del análisis histológico se muestran en la figura 1.

En la Figura 1, la tinción más oscura indica la expresión de los respectivos antígenos (indicado con flechas negras).

Tanto el ED-A de la fibronectina (reconocido por el anticuerpo F8-SIP biotinilado) como el dominio A1 de la tenascina C (reconocido por el anticuerpo F16-SIP biotinilado) se expresaron fuertemente alrededor de las estructuras perivasculares de biopsias de muestras de endometriosis humana (véanse Figuras 1A, B y C para la tinción con F8-SIP y las Figuras 1G, H & I para la tinción con F16-SIP). La intensa tinción de estructuras vasculares con F16-SIP FUE más fuerte que la observada con F8-SIP. No hay tinción visible para el control negativo, es decir, el mismo tipo de muestra de endometriosis incubada con el reactivo de estreptavidina, pero sin ningún anticuerpo primario (véanse las Figuras 1J, K y L).

El dominio ED-B de la fibronectina (reconocido por el anticuerpo L19-SIP biotinilado) solo fue débilmente positivo (véanse las figuras 1D, E y F).

Análisis histoquímico de muestras de colitis ulcerosa humana

La expresión de los dominios ED-A y ED-B de la fibronectina y el dominio A1 de la isoforma grande de la tenascina se investigó mediante inmunohistoquímica en muestras de colitis ulcerosa humana utilizando los anticuerpos F8, L19- y F16-SIP biotinilados, respectivamente. Los resultados del análisis histológico se muestran en la figura 2.

En la figura 2, las áreas de tinción negativa alrededor de las estructuras perivasculares se indican usando las flechas blancas.

El análisis inmunohistoquímico de muestras de colitis ulcerosa humana reveló tinción casi negativa para los tres anticuerpos, F8, L19 y F16 (véase la Figura 2A, B y C respectivamente). Solo se observó una positividad débil con F8-SIP en algunas muestras.

Análisis histoquímico de muestras de artritis psoriásica humana

La expresión de los dominios ED-A y ED-B de la fibronectina y el dominio A1 de la isoforma grande de la tenascina se investigó mediante inmunohistoquímica en muestras de artritis psoriásica humana utilizando los anticuerpos F8, L19- y F16-SIP biotinilados, respectivamente. Los resultados del análisis histológico se muestran en la figura 3.

En la Figura 3, la tinción más oscura indica la expresión de los respectivos antígenos (indicado con flechas negras).

El dominio A1 de la tenascina C (reconocido por el anticuerpo F16-SIP biotinilado) se expresó fuertemente alrededor de las estructuras perivasculares de las biopsias de muestras de artritis psoriásica humana, es decir, se observó una tinción más intensa (véase la Figura 3C). No hubo tinción visible para el control negativo ni para el dominio ED-B de la fibronectina (reconocido por el anticuerpo L19-SIP biotinilado) o el dominio ED-A de la fibronectina (reconocido por el anticuerpo F8-SIP biotinilado) (véanse las Figuras 3A, B y D, respectivamente).

Análisis histoquímico de las muestras de pacientes con esclerosis múltiple

La expresión de los dominios ED-A y ED-B de la fibronectina y el dominio A1 de la isoforma grande de la tenascina se investigó mediante inmunohistoquímica en muestras de pacientes con esclerosis múltiple utilizando los anticuerpos F8, L19- y F16-SIP biotinilados, respectivamente. Los resultados del análisis histológico se muestran en la figura 4.

En la figura 4, las áreas de tinción negativa alrededor de las estructuras perivasculares se indican usando las flechas blancas.

El análisis inmunohistoquímico de secciones de tejido de muestras patológicas de pacientes con esclerosis múltiple reveló solo positividad extremadamente débil en estructuras vasculares para L19, F8 y F16 (véanse las Figuras 4A, B y C).

Análisis histoquímico de las muestras de pacientes con psoriasis

La expresión de los dominios ED-A y ED-B de la fibronectina y el dominio A1 de la isoforma grande de la tenascina se investigó mediante inmunohistoquímica en muestras de pacientes con psoriasis utilizando los anticuerpos F8, L19- y F16-SIP biotinilados, respectivamente. Los resultados del análisis histológico se muestran en la figura 5.

En la Figura 5, la tinción más oscura indica la expresión de los respectivos antígenos (indicado con flechas negras).

El dominio A1 de la tenascina C (reconocido por el anticuerpo F16-SIP biotinilado) se expresó fuertemente alrededor de las estructuras perivasculares de las biopsias de muestras de psoriasis humana, es decir, se observó una tinción más intensa (véase la Figura 5C). No hubo tinción visible para el control negativo ni para el dominio ED-B de la fibronectina (reconocido por el anticuerpo L19-SIP biotinilado) o el dominio ED-A de la fibronectina (reconocido por el anticuerpo F8-SIP biotinilado) (véanse las Figuras 5D, B y A, respectivamente).

Basándose en los hallazgos descritos anteriormente, la expresión de ED-A y la isoforma grande de la tenascina C no se encuentra en todas las enfermedades relacionadas con la angiogénesis. La endometriosis es particularmente adecuada para la liberación del fármaco utilizando moléculas de anticuerpo anti-ED-A, mientras que la endometriosis, la psoriasis y la artritis psoriásica son particularmente adecuadas para la liberación de fármacos usando moléculas de anticuerpo anti-tenascina C.

Formación de imágenes en el infrarrojo cercano de las lesiones de endometriosis en ratones

Un modelo de ratón de la endometriosis se generó como se describe a continuación. La acumulación selectiva de F8-SIP en ratones con endometriosis se analizó mediante análisis de imágenes en el infrarrojo cercano, como se describe en Birchler et al. [Birchler et al., J Immunological Methods 1999, 231, 239-248]. F8-SIP y F16-SIP se marcaron utilizando Alexa750 (Molecular Probes), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, y se inyectaron en la vena de la cola de los ratones con endometriosis. Se sacrificó a los ratones y la imagen se formó en un formador de imágenes en el infrarrojo cercano 24 horas después de la inyección. F16-SIP se utilizó como control negativo, ya que reconoce el dominio A1 humano de tenascina C pero no el antígeno murino.

Como se muestra en las Figuras 10A y B, SIP(F8)-ALEXA750 se acumula en las lesiones de endometriosis (indicado por flechas), mientras que SIP (F16) -ALEXA750 no (Figura 10C), de modo que se confirma la especificidad *in vivo* de F8-SIP.

Detección ex vivo de SIP (F8) -ALEXA750

Tan pronto como se completó la formación de imágenes en el infrarrojo cercano, las lesiones de endometriosis se eliminaron de los animales sacrificados, se embebieron en el compuesto de crioinclusión (Microm, Walldorf,

Alemania) y se almacenaron a -80 °C. Después, se cortaron secciones (10 µm) y se fijaron en acetona. SIP (F8) - ALEXA750 se detectó utilizando un anticuerpo IgE anti-humano de conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca), seguido de anti-IgG anti-conejo de cabra Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos). Para la detección de los vasos sanguíneos, se realizó tinción doble con anticuerpo anti-CD31 de rata, seguido de IgG anti-rata de burro Alexa Fluor 594. Como control negativo, la muestra se sondó con IgG de cabra anti-conejo Alexa Fluor 488 menos el anticuerpo IgE humano.

Los resultados muestran claramente la correspondencia entre los vasos sanguíneos (véanse las áreas más brillantes en las Figuras 11D, E y F) y tinción con SIP (F8) -ALEXA750 (véase las áreas más brillantes en las Figuras 11A, B y C). Estos resultados confirman que SIP (F8) -ALEXA750 se había acumulado alrededor de las estructuras vasculares durante los estudios de imagen.

Estos datos muestran el primer intento con éxito en la formación de imágenes *in vivo* de endometriosis sin la necesidad de laparoscopia, u otra forma de la cirugía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inmunohistoquímica con anticuerpos SIP biotinilados

Las secciones de tejido se fijaron en acetona fría (-20 °C) durante 10 minutos y los portaobjetos se secaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se aplicó silicio utilizando una pluma y los portaobjetos se sumergieron entonces en TBS (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4, 0,01 % de aprotinina) durante 5 minutos. Los portaobjetos se secaron con papel sin tocar las secciones. Las secciones se bloquearon con suero de ternera fetal al 20 % (FCS) en TBS durante 30 minutos. A continuación, la solución de bloqueo se retiró y los portaobjetos se sumergieron en TBS durante 5 minutos. El anticuerpo biotinilado primario en formato SIP se diluyó en TBS / BSA al 3 % hasta una concentración final de 1,6 µg / ml y se aplicó a las secciones durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron dos veces con TBS + MgCl₂ 2 mM (406 mg / l) (2x 5 minutos). La parte posterior de los portaobjetos se secó con papel y el complejo SAP a 1: 150 (Biopsa F014-62) en TBS + MgCl₂ 2 mM / 3 % de BSA durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron tres veces con TBS + MgCl₂ 2 mM (3 x 5 minutos). Se añadió el sustrato (compuesto por disolución de Tris 1 y 1 comprimido FastRed por 1 ml de agua MilliQ) y se incubó en las secciones durante 10 minutos. Las secciones se lavaron dos veces con agua desionizada (2x 2 minutos) y se transfirieron a solución de hematoxilina de Gill nº 2 durante 2 minutos. Los portaobjetos se transfirieron rápidamente a agua desionizada y se enjuagaron con agua durante 5 minutos. Los portaobjetos se dejaron secar y se montaron con glicerol y se visualizaron con un microscopio óptico (Zeiss Axiovert 5100 TV).

Modelo de ratón de la endometriosis

Ratones C57BL / 6 de 6-8 semanas de edad s fueron sometidos a ovariectomía 7 días antes de la inducción de la endometriosis. Los ratones se anestesiaron con isoflurano en combinación con carprofeno (Rimadyl). Después de la ovariectomía, se trató a los ratones con estrógenos (3x / semana 4 µg de estradiol / ratón en un volumen de aceite de cacahuete de 100 µl por vía subcutánea inyectada, comenzando el día del trasplante). La ovariectomía más suplemento con estrógeno se realizó con el fin de anular las diferencias relacionadas con la etapa del ciclo estral. El día 0, los ratones se dividieron en 2 grupos: ratones donantes (33 %) y ratones receptores (66 %). Se sacrificó a los ratones donantes y se extrajeron ambos cuernos uterinos y posteriormente se colocaron en una placa Petri estéril que contiene solución salina estéril. El endometrio se separó del músculo uterino y se picó utilizando un bisturí. Los fragmentos endometriales se suspendieron en solución salina y se inyectaron en la cavidad peritoneal de los ratones receptores. 4 semanas después del trasplante, se utilizaron ratones para formación de imágenes en el infrarrojo cercano.

TABLA 1

Secuencias de nucleótidos de las cadenas pesadas (VH) de los anticuerpos anti-tenascina C y anti-ED-A. Las secuencias de CDR1 de VH están subrayadas; las secuencias de CDR2 de VH están en <i>cursiva y subrayadas</i> ; las secuencias CDR 3 de VH están en negrita y subrayadas .	
Anticuerpo	Dominio VH
H1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCGCGGAGGATG AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT <u>AGTGGTAGTGGTAGCACA</u>TACTACGCAGACTCCGTGAAGGCCGGTTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCGGTATATTACTGTGCGAAA<u>AGTACTCATTTGTAT</u> CTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCCTCGAGT (SEC ID N° 1)
B2	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCGCGCTAAGATG AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT <u>AGTGGTAGTGGTAGCACA</u>TACTACGCAGACTCCGTGAAGGCCGGTTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCGGTATATTACTGTGCGAAA<u>AGTACTCATTTGTAT</u> CTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCCTCGAGT (SEC ID N° 3)
C5	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCCGATTACTATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTA <u>GTGGTAGTGGTAGCACA</u>TACTACGCAGACTCCGTGAAGGCCGGTTC CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCGGTATATTACTGTGCGAAA<u>AGTACTCATTTGTAT</u> CTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCCTCGAGT (SEC ID N° 5)
D5	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCGTGATGAAGATG AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT <u>AGTGGTAGTGGTAGCACA</u>TACTACGCAGACTCCGTGAAGGCCGGTTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCGGTATATTACTGTGCGAAA<u>AGTACTCATTTGTAT</u> CTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCCTCGAGT (SEC ID N° 7)

E5	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTTAGCACTGGTTCATGA GCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATT<u>A</u> <u>GTTGGTAGTGGTAGC</u>ACATACGACACTCCGTGAAGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATCCAAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAA<u>AGTACATTTGTA</u> <u>CTTTT</u>GACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEC ID N° 9)
C8	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTTAGCCTTCAGACTATGA GCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATT<u>A</u> <u>GTTGGTAGTGGTAGC</u>ACATACGACACTCCGTGAAGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATCCAAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAA<u>AGTACATTTGTA</u> <u>CTTTT</u>GACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEC ID N° 11)
F8 VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTTAGCCTGTTACGATGA GCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATT<u>A</u> <u>GTTGGTAGTGGTAGC</u>ACATACGACACTCCGTGAAGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATCCAAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAA<u>AGTACATTTGTA</u> <u>CTTTT</u>GACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEC ID N° 13)
F8 VH V5L	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTTAGCCTGTTACGATGA GCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATT<u>A</u> <u>GTTGGTAGTGGTAGC</u>ACATACGACACTCCGTGAAGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATCCAAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAA<u>AGTACATTTGTA</u> <u>CTTTT</u>GACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEC ID N° 15)

F1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCTAGGCGGTATG AGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATT AGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGAGACTCCGTGAAGGCCGGTTC ACCATCTCCAGAGACAAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGTACTCATTGTAT CTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEC ID N° 17)
B7	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCATTTTGATATGA GCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATT GTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGAGACTCCGTGAAGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGTACTCATTGTAT CTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEC ID N° 19)
E8	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCGATATGCATATGA GCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATT GTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGAGACTCCGTGAAGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGTACTCATTGTAT CTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT (SEC ID N° 21)

G9	<u>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC</u> <u>CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCATATGCAGATGA</u> <u>GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT</u> <u>GTGGTAGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGCCCGGTTC</u> <u>CCATCTCCAGAGACAAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCT</u> <u>GAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGTACTCATTTGAT</u> <u>CTTTTGA</u> (SEC ID N° 23)
F16	<u>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC</u> <u>CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCCGTAATGGTATG</u> <u>AGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT</u> <u>AGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACACGCAGACTCCGTGAAGGCCCGGTTT</u> <u>ACCATCTCCAGAGACAAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCT</u> <u>GAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGCGCATAAATGCTTTT</u> <u>GACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCCGTGTCGAGA</u> (SEC ID N° 25)
4A1-F16	<u>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC</u> <u>CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCCGTAATGGTGG</u> <u>AGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT</u> <u>AGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACACGCAGACTCCGTGAAGGCCCGGTTT</u> <u>ACCATCTCCAGAGACAAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCT</u> <u>GAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGCGCATAAATGCTTTT</u> <u>GACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCCGTGTCGAGA</u> (SEC ID N° 27)

TABLA 2

Secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas (VH) de los anticuerpos anti-tenascina C y anti-ED-A. Las secuencias de CDR1 de VH están subrayadas; las secuencias de CDR2 de VH están en cursiva y subrayadas; las secuencias CDR 3 de VH están en negrita y subrayadas.	
Anticuerpo	Dominio VH
H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPPRMSWVRQAPGKGLEWWSAISG SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK <u>STHLYLFDY</u> WGQGTLVTVSS (SEC ID Nº 2)
B2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAAKMSWVRQAPGKGLEWWSAISG SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK <u>STHLYLFDY</u> WGQGTLVTVSS (SEC ID Nº 4)
C5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPTMSWVRQAPGKGLEWWSAISG <u>SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK</u> <u>STHLYLFDY</u> WGQGTLVTVSS (SEC ID Nº 6)
D5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVMKMSWVRQAPGKGLEWWSAISG <u>SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK</u> <u>STHLYLFDW</u> GQGTLVTVSS (SEC ID Nº 8)
E5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIGMSWVRQAPGKGLEWWSAISG <u>SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK</u> <u>STHLYLFDW</u> GQGTLVTVSS (SEC ID Nº 10)
C8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLQTMWSWVRQAPGKGLEWWSAISG <u>SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK</u> <u>STHLYLFDY</u> WGQGTLVTVSS (SEC ID Nº 12)
F8 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWWSAISG <u>SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK</u> <u>STHLYLFDY</u> WGQGTLVTVSS (SEC ID Nº 14)
F8 VH V5L	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWWSAISG <u>SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK</u> <u>STHLYLFDY</u> WGQGTLVTVSS (SEC ID Nº 16)

F1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQARMSWVRQAPGKGLEWWSAISG SGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDY WGQGTLVTVSS (SEC ID N° 18)
B7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHFDMSWVRQAPGKGLEWWSAISG SGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDY WGQGTLVTVSS (SEC ID N° 20)
E8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDMHMSWVRQAPGKGLEWWSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFD YWQGTLVTVSS (SEC ID N° 22)
G9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHMQMSWVRQAPGKGLEWWSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFD YWQGTLVTVSS (SEC ID N° 24)
F16	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWWSAISG SGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYW GQGTLVTVSR (SEC ID N° 26)
4A1-F16	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGASWVRQAPGKGLEWWSAISG SGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYW GQGTLVTVSR (SEC ID N° 28)

TABLA 3

Secuencias de nucleótidos de las cadenas ligeras (VL) de los anticuerpos anti-tenascina C y anti-ED-A. Las secuencias de CDR1 de VL están subrayadas; las secuencias de CDR2 de VL están en <i>cursiva y subrayadas</i> ; las secuencias CDR 3 de VL están en negrita y subrayadas .	
Anticuerpo	Domínio VL
H1	<u>GAAATTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCCTTTGTCCTCCAGGGGAAA</u> <u>AAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCTCTGCGIGGTTAGC</u> <u>CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA</u> <u>TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTAGTGCCAGTGGTCTGGG</u> <u>ACAGACTTCACCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA</u> <u>TTACTGTCAGCAGATGCGTGGTCGGCCGCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAA</u> GGTGGAAATCAAA (SEC ID N° 63)
B2	GAAATTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCCTTTGTCCTCCAGGGGAAA AAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCGTGGCTTTTITAGC CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA <u>TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTAGTGCCAGTGGTCTGGG</u> ACAGACTTCACCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA <u>TTACTGTCAGCAGATGCGTGGTCGGCCGCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAA</u> GGTGGAAATCAAA (SEC ID N° 65)
C5	GAAATTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCCTTTGTCCTCCAGGGGAAA AAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCTTGCAATGCTTTITAGC CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA <u>TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTAGTGCCAGTGGTCTGGG</u> ACAGACTTCACCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA <u>TTACTGTCAGCAGATGCGTGGTCGGCCGCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAA</u> GGTGGAAATCAAA (SEC ID N° 67)
D5	GAAATTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCCTTTGTCCTCCAGGGGAAA AAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAATGCTTTITAGC CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA <u>TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTAGTGCCAGTGGTCTGGG</u> ACAGACTTCACCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA <u>TTACTGTCAGCAGATGCGTGGTCGGCCGCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAA</u> GGTGGAAATCAAA (SEC ID N° 69)

E5	GAAATTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCTCCAGGGGAAA AAGCCACCCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCCCTTGCGCAITTAGC CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA <u>TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGTCTGGG</u> ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGT TACTGTACGCAGATGCGTGTCGGCCGCGACGTTCCGCCAAGGGACCAA GGTGGAATCAAA (SEC ID N° 71)
C8	GAAATTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCTCCAGGGGAAA AAGCCACCCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCCCTTCTTTTATAGC CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA <u>TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGTCTGGG</u> ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGT TACTGTACGCAGATGCGTGTCGGCCGCGACGTTCCGCCAAGGGACCAA GGTGGAATCAAA (SEC ID N° 73)
F8 VL	GAAATTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCTCCAGGGGAAA AAGCCACCCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCCCTTGCGITTTAGC CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA <u>TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGTCTGGG</u> ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGT TACTGTACGCAGATGCGTGTCGGCCGCGACGTTCCGCCAAGGGACCAA GGTGGAATCAAA (SEC ID N° 75)
F8 VL R18R	GAAATTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCTCCAGGGGAAA GAGCCACCCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCCCTTGCGITTTAGC CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA <u>TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGTCTGGG</u> ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGT TACTGTACGCAGATGCGTGTCGGCCGCGACGTTCCGCCAAGGGACCAA GGTGGAATCAAA (SEC ID N° 77)

F1	GAAATTGTTGACGGAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA AAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCGGCCCTTTTITAGC CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA <u>TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGG</u> ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA TTACTGTCAGCAGATGGTGTTGGCCGCCGACGTTCCGCCCAAGGGACCAA GGTGGAAATCAAA (SEC ID N° 79)
B7	GAAATTGTTGACGGAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA AAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCIGGCTTTTTTAGC CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGG ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA TTACTGTCAGCAGATGGTGTTGGCCGCCGACGTTCCGCCCAAGGGACCAA GGTGGAAATCAAA (SEC ID N° 81)
E8	GAAATTGTTGACGGAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA AAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCTCGTCTTTTTTAGC CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGG ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA TTACTGTCAGCAGATGGTGTTGGCCGCCGACGTTCCGCCCAAGGGACCAA GGTGGAAATCAAA (SEC ID N° 83)
G9	GAAATTGTTGACGGAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA AAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTTTTTTAGC CTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGG ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA TTACTGTCAGCAGATGGTGTTGGCCGCCGACGTTCCGCCCAAGGGACCAA GGTGGAAATCAAA (SEC ID N° 85)

F16 y 4A1-F16	TCGTCAGCTGACTCAGGACCCCTGCTGTGTCTGTGGCCCTGGGACAGACAG TCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTA CCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTCTATCTATGGTAAACCAAC CGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACA GCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACT GTAACCTCCCTGTTTATCTATGCCGCCCGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAA GCTGACCGTCCTA (SEC ID N° 87)
---------------	---

TABLA 4

Secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras (VL) de los anticuerpos anti-tenascina C y anti-ED-A. Las secuencias de CDR1 de VL están subrayadas; las secuencias de CDR2 de VH están en <i>cursiva y subrayadas</i> ; las secuencias CDR 3 de VH están en negrita y subrayadas .	
Articuerpo	Dominio VL
H1	EIVLTQSPGTLSLSPGEKATLSRASQSVSSAWLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR <u>RA</u> IGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYCCQ MRGRPP TFGGGTKVEIK (SEC ID N° 64)
B2	EIVLTQSPGTLSLSPGEKATLSRASQSVSAFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR <u>AT</u> GIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYCCQ MRGRPP TFGGGTKVEIK (SEC ID N° 66)
C5	EIVLTQSPGTLSLSPGEKATLSRASQSVSLHFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR <u>AT</u> GIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYCCQ MRGRPP TFGGGTKVEIK (SEC ID N° 68)
D5	EIVLTQSPGTLSLSPGEKATLSRASQSVSAFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR <u>AT</u> GIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYCCQ MRGRPP TFGGGTKVEIK (SEC ID N° 70)
E5	EIVLTQSPGTLSLSPGEKATLSRASQSVSLAHLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR <u>AT</u> GIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYCCQ MRGRPP TFGGGTKVEIK (SEC ID N° 72)
C8	EIVLTQSPGTLSLSPGEKATLSRASQSVSLPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR <u>AT</u> GIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYCCQ MRGRPP TFGGGTKVEIK (SEC ID N° 74)
F8 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGEKATLSRASQSVSMIPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR <u>AT</u> GIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYCCQ MRGRPP TFGGGTKVEIK (SEC ID N° 76)

F8 VL K18R	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSMPELAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR <u>ATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPP</u>TFGGGTKVEIK (SEC ID N° 78)
F1	EIVLTQSPGTLSPGEKATLSCRASQSVSAPELAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR <u>ATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPP</u>TFGGGTKVEIK (SEC ID N° 80)
B7	EIVLTQSPGTLSPGEKATLSCRASQSVSLAFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR <u>ATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPP</u>TFGGGTKVEIK (SEC ID N° 82)
E8	EIVLTQSPGTLSPGEKATLSCRASQSVSSSELAFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR <u>ATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPP</u>TFGGGTKVEIK (SEC ID N° 84)
G9	EIVLTQSPGTLSPGEKATLSCRASQSVSTAFALAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR <u>ATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPP</u>TFGGGTKVEIK (SEC ID N° 86)
F16 y 4A1-F16	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGNRNP <u>SGIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAEADYYCNSSVYTMP</u>PPWFGGGTKLTVL (SEC ID N° 88)

Secuencias divulgadas en la solicitud

SEC ID N° 1 (dominio VH de H1)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCCGCGGAGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
GACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACC
CTGGTCACCGTCTCGAGT

SEC ID N° 2 (dominio VH de H1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPRRMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGLTVTVSS

SEC ID N° 3 (dominio VH de B2)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCGCGGCTAAGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
TGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
GTTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGT

SEC ID N° 4 (dominio VH de B2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAAKMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGLTVTVSS

SEC ID N° 5 (dominio VH de C5)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCCGATTACTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
TGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
GTTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGT

SEC ID N° 6 (dominio VH de C5)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPITMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGLTVTVSS

SEC ID N° 7 (dominio VH de D5)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCGTGATGAAGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
TGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
GTTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGT

SEC ID N° 8 (dominio VH de D5)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVMKMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGLTVTVSS

SEC ID N° 9 (dominio VH de E5)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCACTGGTCTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGC
TGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
GTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGT

5 SEC ID N° 10 (dominio VH de E5)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTGSMWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGLTVTVSS

10 SEC ID N° 11 (dominio VH de C8)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCTTCAGACTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGC
TGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
GTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGT

SEC ID N° 12 (dominio VH de C8)

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLQTMWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGLTVTVSS

SEC ID N° 13 (dominio VH de F8)

20 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCTGTTACGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGC
TGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
GTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGT

SEC ID N° 14 (dominio VH de F8)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGLTVTVSS

25 SEC ID N° 15 (dominio VH V5L de F8)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCTGTTACGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCT
GGTCACCGTCTCGAGT

SEC ID N° 16 (dominio VH V5L de F8)

30 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGLTVTVSS

SEC ID N°: 17 (dominio VH de F1)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCTAGGCGCGTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGC
TGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
GTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGT

5 SEC ID N° 18 (dominio VH de F1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQARMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQGLTVTVSS

10 SEC ID N° 19 (dominio VH de B7)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCATTTTGATATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGC
GGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
GGTCACCGTCTCGAGT

SEC ID N° 20 (dominio VH de B7)

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHFDMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQGLTVTVSS

SEC ID N°: 21 (dominio VH de E8)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCGATATGCATATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGC
TGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
GTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGT

20 SEC ID N°: 22 (dominio VH de E8)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDMHMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQGLTVTVSS

25 SEC ID N° 23 (dominio VH de G9)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCATATGCAGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGC
TGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
GTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGT

30 SEC ID N° 24 (dominio VH de G9)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHMMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQGLTVTVSS

SEC ID N° 25 (dominio VH de F16)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCGGTATGGTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGCGCATAATGCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA
CCGTGTCGAGA

5 SEC ID N° 26 (dominio VH de F16)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGLTVTSR

10 SEC ID N° 27 (dominio VH de 4A1-F16)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCGGTATGGTGCAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGCGCATAATGCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA
CCGTGTCGAGA

SEC ID N° 28 (dominio VH de 4A1-F16)

15 SEC ID N° 29 (dominio VH de 4A1-F16)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGASWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGLTVTSR

SEC ID N° 29 (CDR1 VH de H1)
CCGCGGAGG

20 SEC ID N° 30 (CDR1 VH de H1)
PRR

SEC ID N° 31 (VH CDR1 de B2)
GCGGCTAAG

25 SEC ID N° 32 (VH CDR1 de B2)
AAK

30 SEC ID N° 33 (VH CDR1 de CS)
CCGATTACT

SEC ID N° 34 (VH CDR1 de C5)
PIT

35 SEC ID N° 35 (VH CDR1 de D5)
GTGATGAAG

SEC ID N° 36 (VH CDR1 de D5)
VMK

40 SEC ID N° 37 (VH CDR1 de E5)
ACTGGTTCT

45 SEC ID N° 38 (VH CDR1 de E5)
TGS

SEC ID N° 39 (VH CDR1 de C8)
CTTCAGACT

50 SEC ID N° 40 (VH CDR1 de C8)
LQT

	<u>SEC ID N° 41</u> (VH de F8 y VH V5L CDR1 de F8) CTGTTTACG
5	<u>SEC ID N° 42</u> (VH de F8 y VH V5L CDR1 de F8) LFT
	<u>SEC ID N° 43</u> (VH CDR1 de F1) TAGGCGCGT
10	<u>SEC ID N° 44</u> (VH CDR1 de F1) QAR
	<u>SEC ID N° 45</u> (VH CDR1 de B7) CATTTTGAT
15	<u>SEC ID N° 46</u> (VH CDR1 de B7) HFD
	<u>SEC ID N° 47</u> (CDR1 VH de E8) GATATGCAT
20	<u>SEC ID N° 48</u> (CDR1 VH de E8) DMH
	<u>SEC ID N° 49</u> (VH CDR1 de G9) CATATGCAG
25	<u>SEC ID N° 50</u> (VH CDR1 de G9) HMQ
30	<u>SEC ID N° 51</u> (VH CDR1 de F16) CGGTATGGTATGAGC
	<u>SEC ID N° 52</u> (VH CDR1 de F16) RYGMS
35	<u>SEC ID N° 53</u> (VH CDR1 de 4A1-F16) CGGTATGGTGCGAGC
40	<u>SEC ID N° 54</u> (VH CDR1 de 4A1-F16) RYGAS
	<u>SEC ID N° 55</u> (VH CDR2 de H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F8 V5L, F1, B7, E8 y G9) AGTGGTAGTGGTGGTAGC
45	<u>SEC ID N° 56</u> (VH CDR2 de H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F8 V5L, F1, B7, E8 y G9) SGSGGS
	<u>SEC ID N° 57</u> (VH CDR2 de F16 y 4A1-F16) GCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC
50	<u>SEC ID N° 58</u> (VH CDR2 de F16 y 4A1-F16) AISGSGGSTYYADSVKG
55	<u>SEC ID N° 59</u> (VH CDR3 de H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F8 V5L, F1, B7, E8 y G9) AGTACTCATTGTATCTT
	<u>SEC ID N° 60</u> (VH CDR3 de H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F8 V5L, F1, B7, E8 y G9) STHLYL
60	<u>SEC ID N° 61</u> (VH CDR3 de F16 y 4A1-F16) GCGCATAATGCTTTTACTAC
65	<u>SEC ID N° 62</u> (VH CDR3 de F16 y 4A1-F16) AHNAFDY

SEC ID N° 63 (dominio VL de H1)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCTCTGCGTGGTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGC
AGATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

5 SEC ID N° 64 (dominio VL de H1)

EIVLTQSPGTLSPGKATLSRASQSVSSAWLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPFTFGQGTKVEIK

10 SEC ID N° 65 (dominio VL de B2)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCGTGGCTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTG
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA
GATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

15 SEC ID N° 66 (dominio VL de B2)

EIVLTQSPGTLSPGKATLSRASQSVSVAFLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPFTFGQGTKVEIK

20 SEC ID N° 67 (dominio VL de C5)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCTTGCAATTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTG
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA
GATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

SEC ID N° 68 (dominio VL de C5)

25 EIVLTQSPGTLSPGKATLSRASQSVSLHFLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPFTFGQGTKVEIK

SEC ID N° 69 (dominio VL de D5)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAATGCTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTG
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA
GATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

30 SEC ID N° 70 (dominio VL de D5)

EIVLTQSPGTLSPGKATLSRASQSVSNAFLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPFTFGQGTKVEIK

35

SEC ID N° 71 (dominio VL de E5)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCTTGCGCATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGC
AGATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

5 SEC ID N° 72 (dominio VL de E5)

EIVLTQSPGTLSPGKATLSCRASQSVSLAHLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

10 SEC ID N° 73 (dominio VL de C8)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCTTCTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTC
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA
GATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

15 SEC ID N° 74 (dominio VL de C8)

EIVLTQSPGTLSPGKATLSCRASQSVSLPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

20 SEC ID N° 75 (dominio VL de F8)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCATGCCGTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTC
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA
GATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

SEC ID N° 76 (dominio VL de F8)

25 EIVLTQSPGTLSPGKATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

SEC ID N° 77 (dominio VL K18R de F8)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCATGCCGTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTC
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA
GATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

30 SEC ID N° 78 (dominio VL K18R de F8)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

35

SEC ID N° 79 (dominio VL de F1)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCGCGCCTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTC
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA
GATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

5 SEC ID N° 80 (dominio VL de F1)

EIVLTQSPGTLSPGKATLSRASQSVSAPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

10 SEC ID N° 81 (dominio VL de B7)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCTGGCTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTC
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA
GATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

15 SEC ID N° 82 (dominio VL de B7)

EIVLTQSPGTLSPGKATLSRASQSVSLAFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

20 SEC ID N° 83 (dominio VL de E8)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCTCGTCTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTC
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA
GATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

SEC ID N° 84 (dominio VL de E8)

25 EIVLTQSPGTLSPGKATLSRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

SEC ID N° 85 (dominio VL de G9)

30 GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCACTGCTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTC
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA
GATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

SEC ID N° 86 (dominio VL de G9)

35 EIVLTQSPGTLSPGKATLSRASQSVSTAFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

SEC ID N° 87 (dominio VH de F16 y 4A1-F16)

TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCA
AGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTG
TCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAAC
ACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCTCTGTT
TATACTATGCCGCGCGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

5 SEC ID N° 88 (dominio VH de F16 y 4A1-F16)

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTAS
LTITGAQAE DEADYYCNSSVYTMPPVVFGGGTKLTVL

10 SEC ID N° 89 (VL CDR1 de H1)
TCTGCGTGG

SEC ID N° 90 (VL CDR1 de H1)
SAW

15 SEC ID N° 91 (VL CDR1 de B2)
GTGGCTTTT

SEC ID N° 92 (VL CDR1 de B2)
VAF

20 SEC ID N° 93 (VL CDR1 de C5)
TTGCATTTT

25 SEC ID N° 94 (VL CDR1 de C5)
LHF

SEC ID N° 95 (VL CDR1 de D5)
AATGCTTTT

30 SEC ID N° 96 (VL CDR1 de D5)
NAF

SEC ID N° 97 (VL CDR1 de E5)
CTTGCGCAT

35 SEC ID N° 98 (VL CDR1 de E5)
LAH

40 SEC ID N° 99 (VL CDR1 de C8)
CTTCCTTTT

SEC ID N° 100 (VL CDR1 de C8)
LPF

45 SEC ID N° 101 (VL de F8 y VL K18R CDR1 de F8)
ATGCCGTTT

SEC ID N° 102 (VL de F8 y VL K18R CDR1 de F8)
MPF

50 SEC ID N° 103 (VL CDR1 de F1)
GCGCCTTTT

55 SEC ID N° 104 (VL CDR1 de F1)
APF

SEC ID N° 105 (VL CDR1 de B7)
CTGGCTTTT

SEC ID N° 106 (VL CDR1 de B7)
LAF

5 SEC ID N° 107 (VL CDR1 de E8)
TCGTCTTTT

SEC ID N° 108 (VL CDR1 de E8)
SSF

10 SEC ID N° 109 (VL CDR1 de G9)
ACTGCTTTT

SEC ID N° 110 (VL CDR1 de G9)
TAF

15 SEC ID N° 111 (VL CDR1 de F16 y 4A1-F16)
CAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGC

20 SEC ID N° 112 (VL CDR1 de F16 y 4A1-F16)
QGDLSRSYYAS

SEC ID N° 113 (VH CDR2 de H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F8 K18R, F1, B7, E8 y G9)
GGTGCATCCAGCAGGGCCACT

25 SEC ID N° 114 (VH CDR2 de H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F8 K18R, F1, B7, E8 y G9)
GASSRAT

SEC ID N° 115 (VL CDR2 de F16 y 4A1-F16)
GGTAAAAACAACCGGCCCTCA

30 SEC ID N° 116 (VL CDR2 de F16 y 4A1-F16)
GKNNRPS

35 SEC ID N° 117 (VH CDR3 de H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F8 K18R, F1, B7, E8 y G9)
ATGCGTGGTCGGCCGCCG

SEC ID N° 118 (VH CDR3 de H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F8 K18R, F1, B7, E8 y G9)
MRGRPP

40 SEC ID N° 119 (VL CDR3 de F16 y 4A1-F16)
AACTCCTCTGTTTATACTATGCCGCCCGTGGTA

SEC ID N° 120 (VL CDR3 de F16 y 4A1-F16)
NSSVYTMPPVV

45 SEC ID N° 121 (enlazador de F8, F16 y 4A1-F16)
GGCGGTAGCGGAGGG

50 SEC ID N° 122 (enlazador de F8, F16 y 4A1-F16)
GGSGG

SEC ID N° 123 (dominio VH V5L de H1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPRRMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSS

55 SEC ID N° 124 (dominio VH V5L de B2)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAAKMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSS

60 SEC ID N° 125 (dominio VH V5L de C5)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPITMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSS

SEC ID N° 126 (dominio VH V5L de D5)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVMKMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQGLTVTVSS

5 SEC ID N° 127 (dominio VH V5L de E5)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTGMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQGLTVTVSS

10 SEC ID N° 128 (dominio VH V5L de C8)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLQTMSSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQGLTVTVSS

SEC ID N° 129 (dominio VH V5L de F1)

15 SEC ID N° 129 (dominio VH V5L de F1)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQARMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQGLTVTVSS

SEC ID N° 130 (dominio VH V5L de B7)

20 SEC ID N° 130 (dominio VH V5L de B7)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHFDMSSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQGLTVTVSS

SEC ID N° 131 (dominio VH V5L de E8)

25 SEC ID N° 131 (dominio VH V5L de E8)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDMHMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQGLTVTVSS

SEC ID N° 132 (dominio VH V5L de G9)

30 SEC ID N° 132 (dominio VH V5L de G9)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHMQMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQGLTVTVSS

SEC ID N° 133 (dominio VL K18R de H1)

35 SEC ID N° 133 (dominio VL K18R de H1)
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSAWLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

SEC ID N° 77 (dominio VL K18R de B2)

40 SEC ID N° 77 (dominio VL K18R de B2)
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSVAFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

SEC ID N° 135 (dominio VL K18R de C5)

45 SEC ID N° 135 (dominio VL K18R de C5)
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSLHFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

SEC ID N° 136 (dominio VL K18R de D5)

SEC ID N° 136 (dominio VL K18R de D5)
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSNAFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

SEC ID N° 137 (dominio VL K18R de E5)

50 SEC ID N° 137 (dominio VL K18R de E5)
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSLAFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

SEC ID N° 138 (dominio VL K18R de C8)

**EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSLPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK**

5 SEC ID N° 139 (dominio VL K18R de F1)

**EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSAPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK**

10 SEC ID N° 140 (dominio VL K18R de B7)

**EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSLAFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK**

SEC ID N° 141 (dominio VL K18R de E8)

15 **EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK**

SEC ID N° 142 (dominio VL K18R de G9)

20 **EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSTAFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK**

REFERENCIAS

Todas las referencias citadas en cualquier lugar en esta memoria descriptiva, incluyendo las citadas en cualquier lugar anteriormente.

- 25 Amit et al. (1986), Science, 233:747-753.
Andersen et al. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 117
Ausubel et al. (1999) 4ª eds., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current
30 Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons.
Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922
Balza et al., (1990), FEBS Lett., 261, 175-178.
Batista et al. J. Exp. Med., 184: 2197-205, 1996.
Berndt et al. Histochem Cell Biol 1998, 109(3):249-255.
Berndt et al., (2006) J Cancer Res Clin Oncol, 132, 537-546.
35 Bigner et al., J Clin Oncol (1998) 16, 2202-2212.
Binz y Plückthun, (2005), Nature Biotechnology, 23, 1257-1268
Birchler et al. (1999), J. Immunol. Methods, 231, 239-248.
Birchler et al. (1999), Nature Biotechnology, 17, 984-988.
Bird et al. (1988) Science, 242, 423-426
40 Borsi et al. (1987), J. Cell. Biol., 104, 595-600.
Borsi et al. (1995), J. Biol.Chem., 270: 6243-6245.
Borsi et al., 102, 75-85 (2002) Int. J. Cancer.
Bosslet et al. (1998), Cancer Res., 58, 1195-1201.
Brack et al. (2006), Clin. Cancer Res., 12, 3200-3208.
45 Brosens I., 15, 229-233 (1997) Semin Reprod Endocrinol
Buyalos y Agarwal, 12, 377-381, (2000) Curr Opin Obstet Gynecol
Carnemolla et al. (1999), Am. J. Pathol. 154, 1345-1352.
Caton et al. (1990), J. Immunol., 144:1965-1968.
Chadd et al. (2001), Current Opinion in Biotechnology 12: 188-194
50 Chothia et al. (1987), J. Mol. Biol., 196:901-917.
Chothia et al. (1989), Nature, 342:877- 883.
Compston A. y Coles A., (2002) Lancet, 359:1221-1231
Demartis et al., 28, 534-539 (2001) Eur. J. Nucl. Med.
Dennis et al. (2007) Cancer Res., 67, 254-261
55 Glennie M J et al., (1987) J. Immunol. 139, 2367-2375
Haan et al. (2004), BioCentury, 12(5): A1-A6.
Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp.
726, 1988
Holliger y Bohlen 1999 Cancer and metastasis rev. 18: 411-419.

- Holliger et al. (1993a), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448.
- Holliger et al. (1993b), *Current Opinion Biotechnol* 4, 446-449.
- Holt et al. (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490.
- Huston et al. (1988) *PNAS USA*, 85, 5879-5883.
- 5 Kabat et al. (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4ª Edición. US Department of Health and Human Services.
- Kabat et al. (1991a), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Edición. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington. (a)
- Kabat et al. (1991b), *J. Immunol.*, 147:1709-1719.
- 10 Knappik et al., (2000) *J. Mol. Biol.* 296, 57-86.
- Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975
- Koide et al. (1998), *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151.
- Kontermann et al. (2001), *S, Antibody Engineering*, Springer-Verlag New York, LLC; ISBN: 3540413545.
- Kornblihtt et al. (1984), *Nucleic Acids Res.* 12, 5853-5868.
- 15 Krebs et al. (2001), *Journal of Immunological Methods*, 254 67-84.
- Kriegsmann et al. (2004) *Rheumatol Int*, 24(1):25-33.
- 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
- Li et al. *Protein Engineering*, 10: 731-736, 1997
- 20 Low et al., (2008) *Acc. Chem. Res.* 41, 120-129
- Matter et al., (2004) *Circulation Res.* 95, 1225-1233
- 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
- 25 Muse K, 31, 813-822 (1988) *Clin Obstet Gynecol*
- Neri, D., y Bicknell, R. (2005), *Nat Rev Cancer* 5, 436-446.
- Nygren et al. (1997), *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463-469.
- Paganelli et al., *Eur J Nucl Med* (1994) 21, 314-321.
- Paolella et al. (1988), *Nucleic Acids Res.* 16, 3545-3557.
- 30 Pini et al. (1998), *J. Biol. Chem.*, 273, 21769-21776.
- Pluckthun (1991), *Bio/Technology* 9: 545-551.
- Reardon et al., *J Clin Oncol* (2002), 20, 1389-1397.
- Reiter et al. (1996), *Nature Biotech*, 14, 1239-1245.
- Repp et al., (1995) *J. Hemat.* 377-382.
- 35 Ridgeway et al. (1996), *Protein Eng.*, 9, 616-621.
- Riva et al., *Int J Cancer* (1992) 51:7-13.
- Riva et al., *Cancer Res* (1995), 55, 5952s-5956s.
- Robinson ed., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- Rock y Markham, (1992), *Lancet*, 340, 1264-1267.
- 40 Rybak et al., (2007), *Chem. Med. Chem*, 2, 22-40
- Rybak et al., (2007), *Cancer Res.*, 67, 10948-10957
- Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schliemann y Neri, (2008), *Biochim Biophys Acta*, 1776, 175-192 Segal et al. (1974), *PNAS*, 71:4298-4302.
- 45 Sergeeva et al. (2006), *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 58, 1622-1654
- Sharon et al. (1990a), *PNAS*, 87:4814-4817.
- Sharon et al. (1990b), *J. Immunol.*, 144:4863-4869.
- Shrama et al. (2006), *Nat. Rev. Drug Discovery*, 5, 147-159.
- Staerz U. D. y Bevan M. J. 1986 *PNAS* 83
- 50 Summers RW, Elliott DE, Qadir K, Urban JF, Thompson R, Weinstock JV (2003) *Am. J. Gastroentol* 98:2034-2041
- Suresh et al. (1986) *Method Enzymol.* 121: 210-228
- Tarli et al. *Blood* 1999, 94(1):192-198.
- Trachsel et al. *Arthritis Res Ther* 2007, 9(1):R9.
- 55 Trachsel et al., (2007) *J. Inv. Dermatol.*, 127, 881-886.
- Villa et al., (2008) *Int. J. Cancer*, 122, 2405-2413
- Viti et al. (2000), *Methods Enzymol.*, 326, 480-505.
- Viti et al., 59, 347-352, (1999) *Cancer Res.*
- Ward et al. (1989), *Nature* 341, 544-546.
- 60 Wess In: *BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness*, 12(42), A1-A7, 2004.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina para su uso en un método de diagnóstico de la endometriosis, en donde el método de diagnóstico de la endometriosis comprende las etapas de:
 - (a) administrar la molécula de anticuerpo al ser humano o animal, y
 - (b) determinar la presencia o ausencia de la molécula de anticuerpo en los sitios de la endometriosis del cuerpo humano o animal;
 en donde la localización de la molécula de anticuerpo en los sitios de la endometriosis indica la presencia de endometriosis.
2. Una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina para su uso en un método de formación de imágenes del tejido endometrial, en donde el método comprende las etapas de:
 - (a) administrar la molécula de anticuerpo al ser humano o animal, y
 - (b) detectar la unión de la molécula de anticuerpo a tejido endometrial en el cuerpo humano o animal.
3. Una molécula de anticuerpo que se une la isoforma del dominio extra-A (ED-A) de la fibronectina para su uso en un método de tratamiento de la endometriosis.
4. Una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma de ED-A de la fibronectina para su uso en un método de proporcionar a la neovascularización de tejido endometrial una molécula conjugada con la molécula de anticuerpo, en donde el método comprende administrar el conjugado al ser humano o animal.
5. La molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en donde la molécula de anticuerpo está conjugada a una molécula bioactiva, tal como una citocina, una hormona, un radioisótopo terapéutico o un fármaco citotóxico, y en donde la molécula bioactiva está opcionalmente conjugada con la molécula de anticuerpo mediante un enlazador escindible.
6. La molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde molécula de anticuerpo se une a la ED-A de la fibronectina.
7. La molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6, en donde la molécula de anticuerpo está conjugada con un marcador detectable.
8. La molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6, en donde la molécula de anticuerpo está conjugada con un radioisótopo.
9. La molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de anticuerpo comprende un dominio VH que comprende un marco y un conjunto de regiones de determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en donde
 - HCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 42,
 - HCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 56,
 - HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 60;
 o en donde el dominio VH comprende un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad que tienen diez o menos sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3.
10. La molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el marco del dominio VH es un marco de la línea germinal humana, y en donde el dominio VH tiene opcionalmente una secuencia de aminoácidos SEC ID N° 14 o 16.
11. La molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, en donde la molécula de anticuerpo comprende además un dominio VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y un marco.
12. La molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde
 - LCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 102,
 - LCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 114, y
 - LCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 118;
 o en donde el dominio VL comprende un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad que tienen diez o menos sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3.
13. La molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, en donde el marco del dominio VL es un marco de la línea germinal humana, y en donde el dominio VL tiene opcionalmente una secuencia

de aminoácidos SEC ID Nº 76 o 78.

5 14. La molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde la molécula de anticuerpo comprende un Fv de cadena sencilla, y en donde la molécula de anticuerpo es opcionalmente una inmunoproteína (SIP) pequeña.

15. La molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde la molécula de anticuerpo es un diacuerpo.

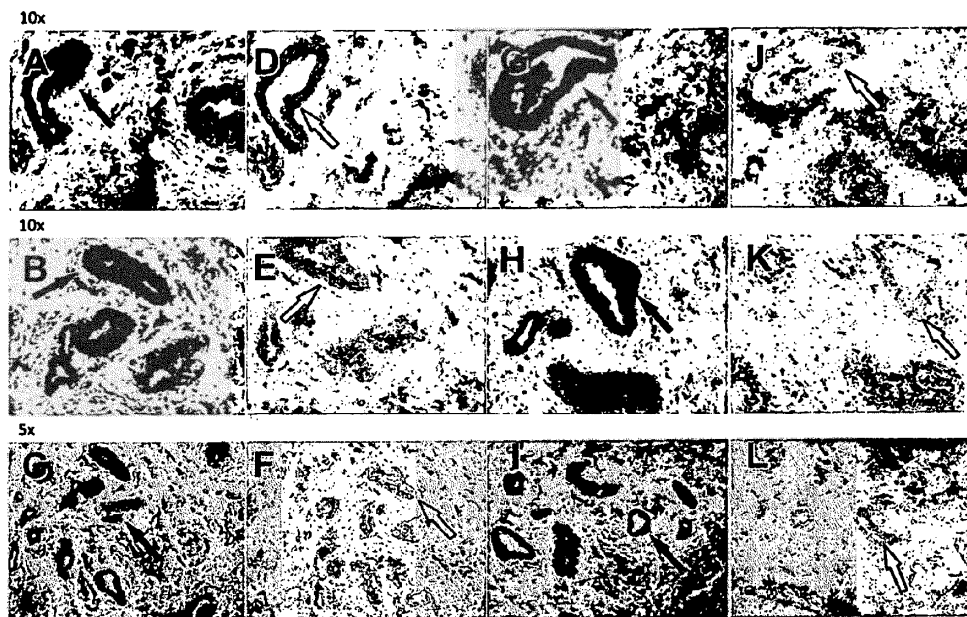


Figura 1

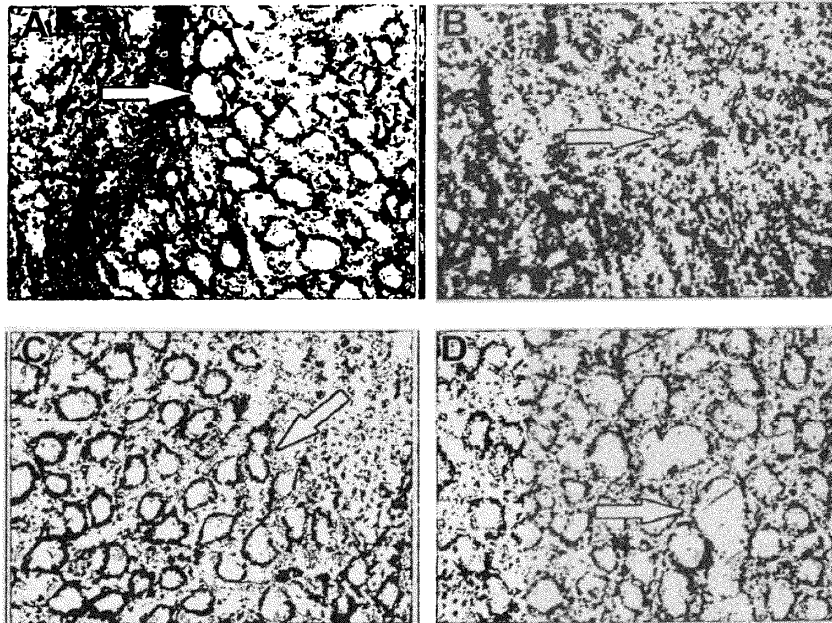


Figura 2

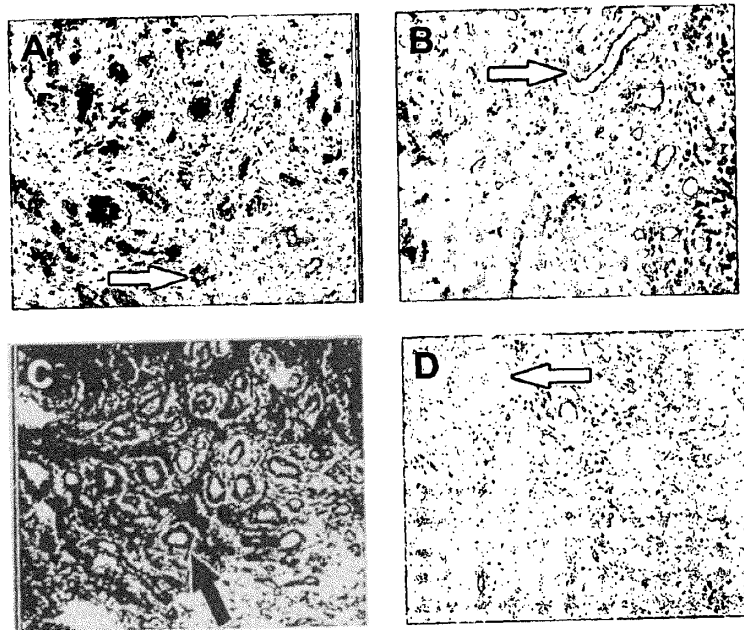


Figura 3

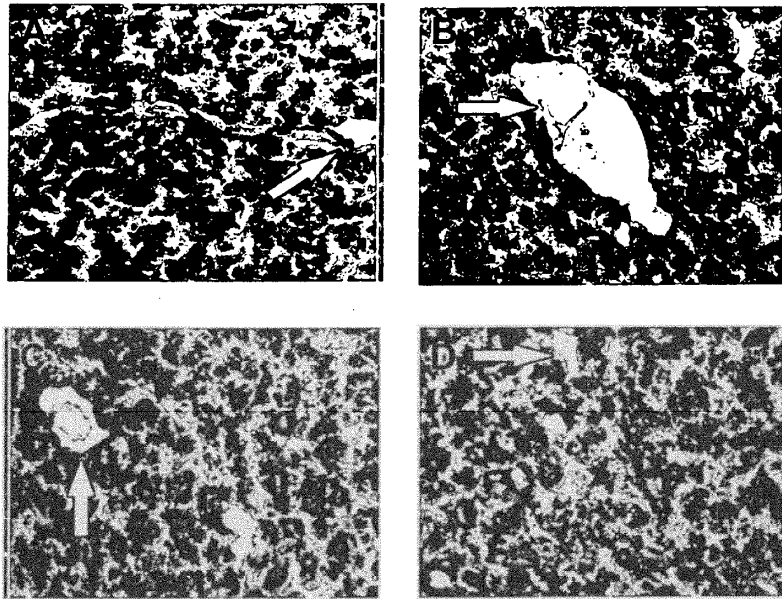


Figura 4

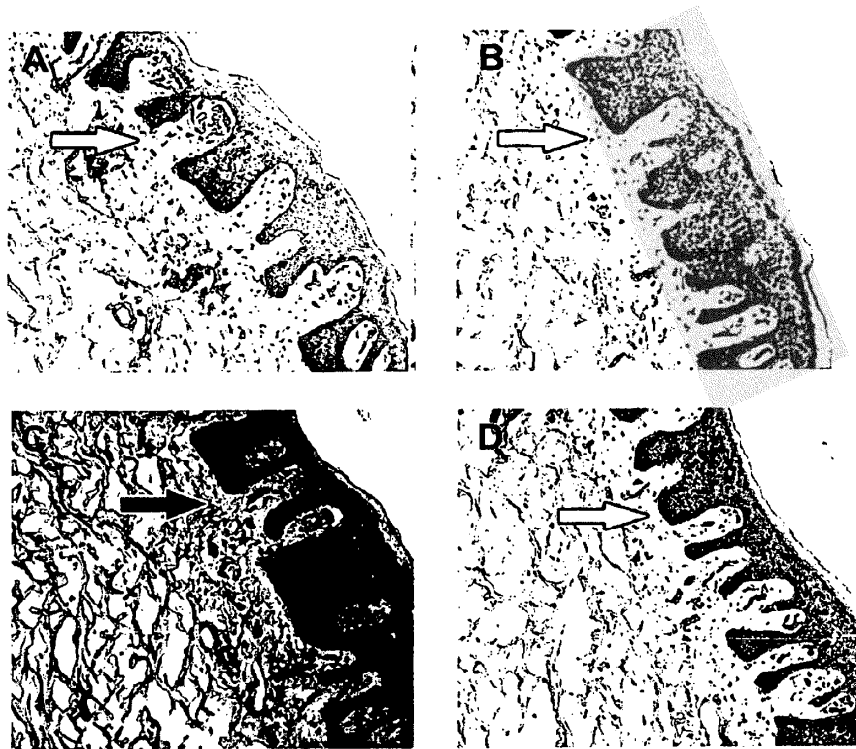


Figura 5

Figura 6A
Dominio VH de F8 de SEC ID N° 13

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCTGT
TTACGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG
GTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTC
CGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC
TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATAT
TACTGTGCGAAA**AGTACTCATTGTATCTT**TTTGA TACTACTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT

Dominio V5L VH de F8 de SEC ID N° 15

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCCTGT
TTACGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG
GTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTC
CGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC
TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATAT
TACTGTGCGAAA**AGTACTCATTGTATCTT**TTTGA TACTACTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT

Figura 6B
Enlazador de F8 SEC ID N° 121

GGCGGTAGCGGAGGG

Figura 6C
Dominio VL de F8 SEC ID N° 75

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG
GGAAAAAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCATGC
CGTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC
CTCATCTATGGTGTCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTT
CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC

TGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGATGCGTGGT
CGGCCGCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

Figura 6C cont.

Dominio VL K18R de F8 SEC ID N° 77

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG
GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCATGC
CGTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC
CTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTT
CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC
TGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGATGCGTGGT
CGGCCGCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

Figura 7A

Dominio VH de F8 SEC ID N° 14

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSLFTMSWVRQAPGKGLEW
VSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY
YCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSS

Dominio VL5 VH de F8 SEC ID N° 16

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSLFTMSWVRQAPGKGLEW
VSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY
YCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSS

Figura 7B

Enlazador F8 SEC ID N° 122

GGSGG

Figura 7C

Dominio VL de F8 SEC ID N° 76

EIVLTQSPGTLSSLSPGEKATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRL
LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRG
RPPTFGQGTKVEIK

Dominio K18R VL de F8 SEC ID N° 78

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRL
LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRG
RPPTFGQGTKVEIK

Figura 8A

Dominio VH de F16 SEC ID N° 25

GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA
 CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC
 TCT GGA TTC ACC TTT AGC CGG TAT GGT ATG AGC TGG
 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC
 TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC
GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA
 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC
 AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT
 GCG AAA **GCG CAT AAT GCT TTT GAC TAC** TGG GGC CAG
 GGA ACC CTG GTC ACC GTG TCG AGA

Dominio VH de 4A1-F16 SEC ID N° 27

GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA
 CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC
 TCT GGA TTC ACC TTT AGC CGG TAT GGT GCG AGC TGG
 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC
 TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC
GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA
 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC
 AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT
 GCG AAA **GCG CAT AAT GCT TTT GAC TAC** TGG GGC CAG
 GGA ACC CTG GTC ACC GTG TCG AGA

Figura 8B

Enlazador de F16 SEC ID N° 121

GGC GGT AGC GGA GGG

Figura 8C

Dominio VL de F16 SEC ID N° 87

```

TCG TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG
GCC TTG GGA CAG ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA
GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA AGC TGG TAC CAG
CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT
GGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA
TTC TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG
ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC
TAT TAC TGT AAC TCC TCT GTT TAT ACT ATG CCG CCC
GTG . GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA
    
```

Figura 9A

Dominio VH de F16 SEC ID N° 26

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSRYGMSWVRQA
PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGTLVTVSR

Dominio VH de 4A1-F16 SEC ID N° 28

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGASWVRQA
PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGTLVTVSR

Figura 9B

Enlazador de F16 y 4A1-F16 SEC ID N° 122

GGSGG

Figura 9C

Dominio VL de F16 y 4A1-VL SEC ID N° 88

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPG
QAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAE
DEADYYCNSSVYTMPVVFGGGTKLTVL

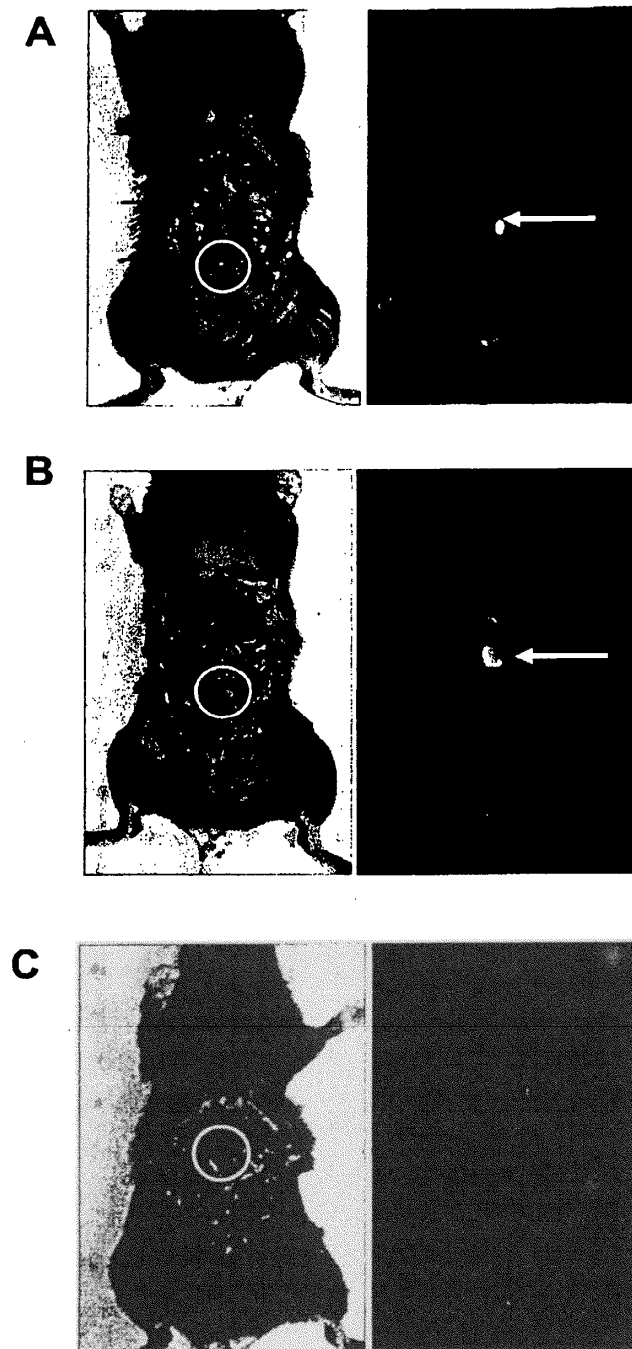


Figura 10

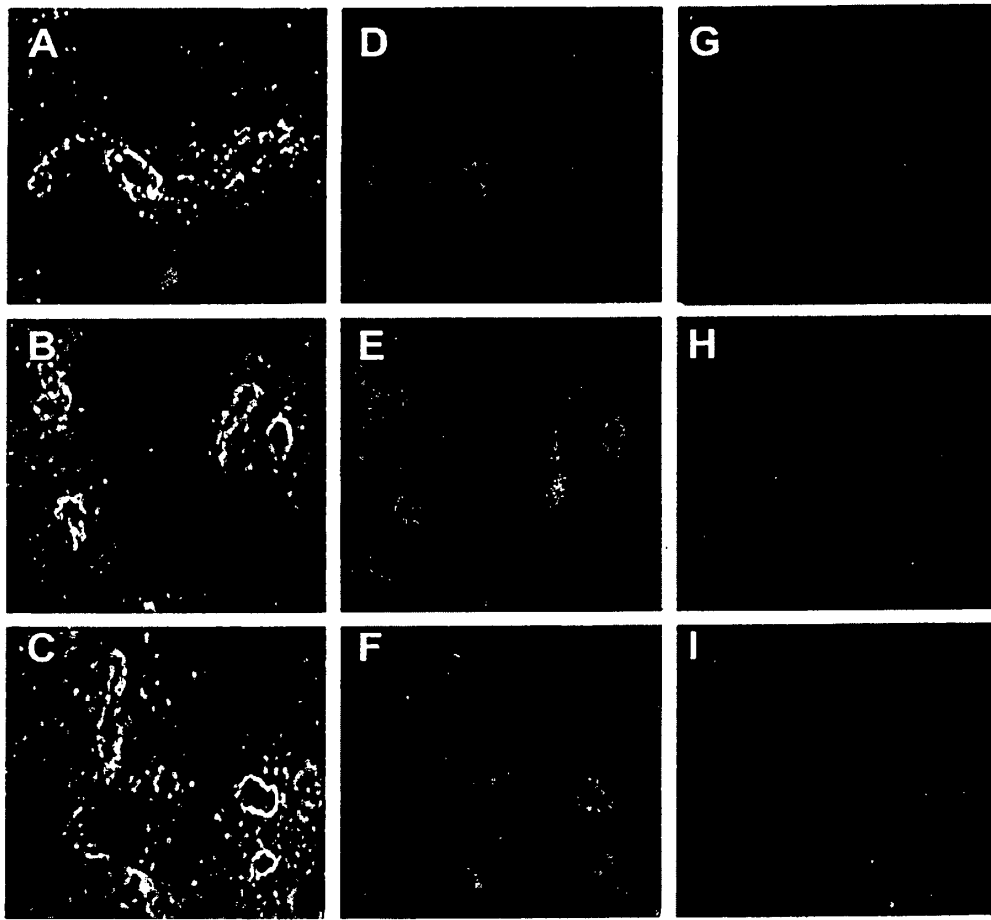


Figura 11