

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 813**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 51/10** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2008** E 12195343 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016** EP 2653478

54 Título: **Antígeno nuevo asociado con la neovascularización de metástasis tumorales**

30 Prioridad:

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.04.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

**Observaciones:**

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

ES 2 609 813 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Antígeno nuevo asociado con la neovasculatura de metástasis tumorales

5 **[0001]** La presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo que se une al ED-A de la fibronectina.

**[0002]** La mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer están relacionadas con la propagación metastásica de la enfermedad (Hanahan y Weinberg 2000) y una vigorosa neovasculatura es una propiedad característica de las metástasis tumorales agresivas.

10

**[0003]** Los tumores se clasifican como benignos o malignos. Los tumores malignos son capaces de propagarse desde el sitio primario (el tumor primario) a otras partes del cuerpo, mientras que los tumores benignos no pueden propagarse. Los tumores malignos pueden propagarse desde el sitio primario por invasión y metástasis. Los tumores formados como resultado de la metástasis se conocen, por ejemplo, como metástasis, tumores secundarios, lesiones metastásicas o focos metastásicos.

15

**[0004]** La angiogénesis describe el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes. Los tumores pueden inducir la angiogénesis a través de la secreción de diversos factores de crecimiento (por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular). La angiogénesis tumoral permite a los tumores crecer por encima de unos pocos milímetros de diámetro y es también un requisito previo para la metástasis tumoral. Los nuevos vasos sanguíneos formados como resultado de la angiogénesis forman la neovasculatura del tumor o de las metástasis tumorales.

20

**[0005]** La fibronectina (FN) es una glicoproteína que se expresa ampliamente en una diversidad de tejidos normales y fluidos corporales. Es un componente de la matriz extracelular (MEC) y desempeña un papel en muchos procesos biológicos, por ejemplo, adhesión celular, migración celular, hemostasia, trombosis, cicatrización de heridas, diferenciación de tejidos y transformación oncogénica.

25

**[0006]** Las diferentes isoformas de la FN se generan por corte y empalme alternativo de tres regiones (ED-A, ED-B, IIICS) del transcrito primario, pre-ARN de FN, un proceso modulado por citocinas y el pH extracelular (Balza 1988, Carnemolla 1989, Borsi 1990, Borsi 1995). La fibronectina contiene dos dominios globulares extra del tipo III que pueden experimentar un corte y empalme alternativo: ED-A y ED-B (French-Constant 1995, Hynes 1990, Kaspar y col. 2006). Los ED-A de la fibronectina de ratón y de la fibronectina humana son idénticos en el 96,7% (solo hay tres aminoácidos diferentes entre las dos secuencias de 90 aminoácidos, véase la figura 5). Algunos anticuerpos dirigidos contra ED-A se describen en el documento EP0580859 y en Linnala y col. 1994, FEBS Letters, 337: 167-170 y Vartio y col. 1987, J. of Cell Science, 88: 419-430.

30

**[0007]** Se ha descrito la expresión del ED-A de la fibronectina en células tumorales y en tumores sólidos con respecto a ARNm (véase por ejemplo, Jacobs y col. 2002, Matsumoto y col. 1999, Oyama y col. 1989, Tavian y col. 1994), proteína aislada (Borsi y col. 1987) e inmunohistoquímica (Borsi y col. 1998, Heikinheimo y col. 1991, Koukoulis y col. 1993, Koukoulis y col. 1995, Lohi y col. 1995, Scarpino y col. 1999). También, Borsi y col. 1998, Exp. Cell Res., 240: 244-251, han descrito que ED-A está presente en la neovasculatura de los tumores primarios. Sin embargo no se ha proporcionado ninguna indicación con anterioridad de que ED-A esté asociado con la neovasculatura de las metástasis tumorales.

40

**[0008]** En este documento demostramos que el ED-A de la fibronectina se expresa selectivamente en la neovasculatura de las metástasis tumorales. Dado que los vasos sanguíneos de los tumores son fácilmente accesibles para la administración de agentes terapéuticos por vía intravenosa (Neri y Bicknell 2005, Rybak y col. 2006, Thorpe 2004, Trachsel y Neri 2006), algunas moléculas de unión, tales como moléculas de anticuerpos, que se unen a la A-FN y/o al ED-A de la fibronectina, representan agentes nuevos que pueden usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de metástasis tumorales y/o la metástasis tumoral.

45

**[0009]** En la técnica se han descrito varios anticuerpos específicos para ED-A (Scarpino y col., 1999; EP05808590; Borsi y col. 1998; Linnala y col., 1994, FEBS Lett. 337(2): 167-170; Vartio y col., 1987, J Cell Sci. 88 (Pt4): 419-430). Sin embargo, la mayoría de estos anticuerpos son anticuerpos murinos que no serían útiles para el tratamiento de pacientes humanos.

55

**[00010]** El tratamiento de la neovasculatura tumoral (reconocimiento específico de la vasculatura tumoral) es una estrategia prometedora para el tratamiento de las metástasis tumorales. El reconocimiento específico de la vasculatura tumoral tiene como objetivo la alteración de la vasculatura dentro del mismo tumor, con lo que se reduce el riego sanguíneo para privar al tumor de oxígeno y nutrientes y causar la muerte de las células tumorales.

60

**[00011]** En este documento se proporcionan anticuerpos dirigidos contra ED-A que reconocen selectivamente los vasos sanguíneos de nueva formación de las metástasis tumorales. La presente invención es según se expone en las reivindicaciones.

65

**[00012]** El miembro de unión de la presente invención es un anticuerpo que se une al ED-A de la fibronectina, que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo F8, tal como se expone en las reivindicaciones.

5 **[00013]** Un miembro de unión de la presente invención puede ser una molécula de anticuerpo humano. El miembro de unión comprende un dominio VH y/o VL de anticuerpo. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL hay regiones determinantes de complementariedad ("CDR") y regiones estructurales ("FR"). Un dominio VH comprende un conjunto de regiones HCDR y un dominio VL comprende un conjunto de regiones LCDR. Una molécula de anticuerpo comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3  
10 de VH y una región estructural. También comprende un dominio VL de anticuerpo que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de VL y una región estructural. Los dominios VH y VL y las CDR del anticuerpo F8 se describen en el presente documento.

**[00014]** Un miembro de unión de la presente invención comprende un dominio VH de anticuerpo que  
15 comprende las regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región estructural, en el que HCDR1 es la SEQ ID NO: 83 y en el que HCDR2 es la SEQ ID NO: 4 y la HCDR3 es la SEQ ID NO: 5.

**[00015]** Un miembro de unión de la presente invención comprende además un dominio VL de anticuerpo que  
20 comprende las regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región estructural, en el que LCDR1 es la SEQ ID NO: 86 y en el que LCDR2 es la SEQ ID NO: 7 y la LCDR3 es la SEQ ID NO: 8.

**[00016]** En un aspecto, el miembro de unión de la presente invención es una molécula de anticuerpo aislada para el ED-A de fibronectina, que comprende un dominio VH y un dominio VL, en la que el dominio VH comprende una región estructural y un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y  
25 en la que el dominio VL comprende las regiones determinantes de complementariedad LCDR1, CDR2 y LCDR3 y una región estructural, en la que  
HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 83,  
HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4,  
HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5,  
30 LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 86;  
LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7; y  
LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8, tal como se expone en las reivindicaciones.

**[00017]** Una o más regiones CDR o un conjunto de regiones CDR de un anticuerpo pueden injertarse en una  
35 región estructural (por ejemplo, una región estructural humana) para proporcionar una molécula de anticuerpo para uso en la invención. Las regiones estructurales pueden comprender secuencias de segmentos génicos de la línea germinal humana. Por lo tanto, la región estructural puede adaptarse a la línea germinal, en lo que se cambian uno o más restos dentro de la región estructural para que se correspondan con los restos en la posición equivalente en la región estructural más similar de la línea germinal humana. Un anticuerpo para uso en la invención puede ser una  
40 molécula de anticuerpo aislada que tiene un dominio VH que comprende un conjunto de regiones HCDR en una región estructural de la línea germinal humana, por ejemplo, DP47. El anticuerpo tiene también un dominio VL que comprende un conjunto de regiones LCDR, por ejemplo, en una región estructural de la línea germinal humana. La región estructural de la línea germinal humana del dominio VL puede ser DPK22.

45 **[00018]** Lo más preferiblemente, un dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 81. Lo más preferiblemente, un dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 82.

**[00019]** Un miembro de unión de la presente invención puede ser un Fv de cadena sencilla (scFv) que  
50 comprende un dominio VH y un dominio VL unidos mediante un enlazante peptídico. El experto en la técnica puede seleccionar una longitud y una secuencia apropiadas para el enlazante, por ejemplo, de al menos cinco o diez aminoácidos de longitud, hasta aproximadamente 15, 20 ó 25 aminoácidos de longitud. El scFv puede consistir en o comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9.

**[00020]** Un miembro de unión de la presente invención puede ser un diacuerpo (documento WO94/13804; Holliger 1993a), que es una molécula que comprende un primer polipéptido con un dominio V<sub>H</sub> y un dominio VL  
55 unidos mediante un enlazante peptídico y un segundo polipéptido con un dominio VH y un dominio VL unidos mediante un enlazante peptídico, en que el dominio VH y el dominio VL del primer polipéptido se aparean, respectivamente, con el dominio VL y el dominio VH del segundo polipéptido. El primer y el segundo polipéptidos pueden ser iguales (con lo que el apareamiento da lugar a una molécula bivalente) o diferentes (con lo que el apareamiento da lugar a una molécula biespecífica). El experto en la técnica puede seleccionar una longitud y una  
60 secuencia apropiadas para el enlazante, por ejemplo, de cinco o menos aminoácidos de longitud. El enlazante puede tener la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28.

**[00021]** Un miembro de unión de la presente invención puede estar conjugado con una molécula que tiene actividad biocida o citotóxica. Alternativamente, un miembro de unión de la presente invención puede estar  
65 conjugado con un radioisótopo. Como alternativa adicional, un miembro de unión de la presente invención puede estar marcado con un marcador detectable.

[00022] Estos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle a continuación.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

5

[00023]

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

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

Figura 3 A: la tinción inmunohistoquímica (líneas oscuras) de metástasis de células F9 en el hígado y de tejido de hígado normal de ratón adyacente con un anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con flag (anti-ED-A) reveló un patrón de tinción vascular intenso en las metástasis, mientras que en el tejido de hígado normal adyacente no pudo detectarse una tinción específica. En los controles negativos (control) se omitió el anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con flag. El patrón de tinción observado con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con flag es similar al patrón de tinción observado con el anticuerpo scFv(L19) dirigido contra ED-B marcado con flag (anti-ED-B) que reconoce el dominio extra B de la fibronectina, un marcador bien establecido de estructuras neovasculares. B: muestra los órganos (bazo, corazón, pulmón y una porción del hígado con dos metástasis) de ratones Sv190 a los que se les habían inyectado células tumorales F9DR y tres semanas después se les volvió a inyectar en la vena de la cola el anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con Alexa 750 (200 µl/ratón, es decir, 60 µg de anticuerpo por ratón) (en una concentración final de 0,3 mg/ml). Los órganos de los ratones se extirparon seis horas después de la inyección del anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con Alexa 750. La tinción con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con Alexa 750 se visualizó mediante un aparato de obtención de imágenes de fluorescencia infrarroja de fabricación propia (Birchler y col. 1999) equipado con una lámpara halógena de tungsteno, filtros de excitación y emisión específicos para Alexa 750 y una cámara CCD monocroma.

Figura 4: muestra la expresión de ED-A en metástasis humanas. Se usó el anticuerpo parental dirigido contra ED-A marcado con flag para evaluar la expresión de ED-A en metástasis humanas por inmunohistoquímica. Mientras que

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

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

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

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

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

## TERMINOLOGÍA

### Fibronectina

**[00024]** La fibronectina es un antígeno sometido a un corte y empalme alternativo y se conocen varias isoformas alternativas de fibronectina, según se describe en otra parte de este documento. El dominio extra A (EDA o ED-A) también se conoce como ED, repetición extra del tipo III A (EIIIA) o EDI. La secuencia del ED-A humano ha sido publicada por Kornblihtt y col. (1984), Nucleic Acids Res., 12: 5853-5868 y Paoletta y col. (1988), Nucleic Acids Res., 16: 3545-3557. La secuencia del ED-A humano también está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1631-1720 (dominio del tipo III de la fibronectina 12; dominio extra 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de acceso P02751. La secuencia del ED-A de ratón está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1721-1810 (dominio del tipo III de la fibronectina 13; dominio extra 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de acceso P11276.

**[00025]** La isoforma de la fibronectina con ED-A (A-FN) contiene el dominio extra A (ED-A). La secuencia de la

A-FN humana puede deducirse de la correspondiente secuencia precursora de la fibronectina humana disponible en la base de datos SwissProt con el número de acceso P02751. La secuencia de la A-FN de ratón puede deducirse de la correspondiente secuencia precursora de la fibronectina de ratón disponible en la base de datos SwissProt con el número de acceso P11276. La A-FN puede ser la isoforma con ED-A de la fibronectina humana. El ED-A puede ser el dominio extra A de la fibronectina humana.

**[00026]** El ED-A es una secuencia de 90 aminoácidos que se inserta en la fibronectina (FN) por corte y empalme alternativo y está situada entre los dominios 11 y 12 de la FN (Borsi y col. 1987, J. Cell Biol., 104: 595-600). Generalmente, el ED-A está ausente en la forma plasmática de la FN, pero es abundante durante la embriogénesis, la remodelación de tejidos, la fibrosis, el trasplante cardíaco y el crecimiento de tumores sólidos.

#### *Corte y empalme alternativo*

**[00027]** El corte y empalme alternativo se refiere a la existencia de distintos patrones de corte y empalme de un transcrito primario de ARN a partir de ADN para producir distintos ARNm. Después de la escisión de los intrones, la selección puede determinar qué exones se empalman juntos para formar el ARN. El corte y empalme alternativo conduce a la producción de distintas isoformas que contienen distintos exones y/o distinto número de exones. Por ejemplo, una isoforma puede comprender una secuencia de aminoácidos adicional correspondiente a uno o más exones, que puede comprender uno o más dominios.

#### *Miembro de unión*

**[00028]** Un miembro de unión tal como se refiere en el presente documento es una molécula de anticuerpo.

**[00029]** Además de las secuencias de anticuerpo y/o de un sitio de unión a antígeno, un miembro de unión, según la presente invención, puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, que forman un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para transmitir a la molécula otras características funcionales, además de la capacidad de unirse a un antígeno. Los miembros de unión de la presente invención pueden contener un marcador detectable o pueden estar conjugados con una toxina o con una fracción de reconocimiento o una enzima (por ejemplo, por medio de un enlace peptídico o un enlazante). Por ejemplo, un miembro de unión puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático), así como un sitio de unión a antígeno, en el que el sitio de unión a antígeno se une al antígeno y de este modo reconoce el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo, por escisión.

**[00030]** Aunque las regiones CDR pueden estar incorporadas en armazones que no son anticuerpos, la estructura a la que incorporar un conjunto de regiones CDR, tal como se describen en el presente documento, será una secuencia de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción sustancial de esta, en la que el conjunto de regiones CDR se localizan en una posición que se corresponde con el conjunto de regiones CDR de los dominios variables VH y VL naturales del anticuerpo codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y posiciones de los dominios variables de la inmunoglobulina pueden determinarse con referencia a Kabat 1987 y sus actualizaciones, disponible actualmente en internet (en [immuno.bme.nwu.edu](http://immuno.bme.nwu.edu) o busque "Kabat" con cualquier buscador).

**[00031]** Con región CDR o CDR se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina según se definen en Kabat y col. (1987) (Kabat 1991a y ediciones posteriores). Típicamente, un anticuerpo contiene tres CDR en la cadena pesada y tres CDR en la cadena ligera. El término región CDR o CDR se usa en este documento para indicar, según el caso, una de estas regiones o varias o incluso la totalidad de estas regiones que contienen la mayoría de los restos de aminoácidos responsables de la unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítipo que reconoce.

**[00032]** Entre las seis cortas secuencias CDR, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad, debida esencialmente a los mecanismos de ordenamiento de los genes que dan lugar a la misma). Su longitud puede ser de tan solo dos aminoácidos, aunque el mayor tamaño conocido son 26 aminoácidos. Desde el punto de vista funcional, la región CDR3 desempeña un papel en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal 1974, Amit 1986, Chothia 1987, Chothia 1989, Caton 1990, Sharon 1990a, Sharon 1990b, Kabat y col. 1991b).

#### *Molécula de anticuerpo*

**[00033]** Este término describe una inmunoglobulina ya sea natural o producida de manera parcial o totalmente sintética. El término abarca también cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión antígeno-anticuerpo. En este caso, debe entenderse que la invención no se refiere a los anticuerpos en su forma natural, es decir, que no se encuentran en su entorno natural, sino que han podido aislarse u obtenerse por purificación a partir de fuentes naturales u obtenerse de otra manera por recombinación genética o por síntesis química y que entonces pueden contener aminoácidos no naturales según se describirá más adelante. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión antígeno-anticuerpo incluyen, pero no se limitan a moléculas de anticuerpos como

Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd y diacuerpos.

**[00034]** Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que se unan al antígeno diana. Tales técnicas pueden suponer la incorporación del ADN codificante de la región variable de una inmunoglobulina o las CDR de un anticuerpo a las regiones constantes o las regiones constantes más las regiones estructurales de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400 y una extensa colección de bibliografía posterior. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo puede someterse a mutación genética o a otros cambios que pueden alterar o no la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

**[00035]** Dado que los anticuerpos pueden modificarse de muchas maneras, el término "molécula de anticuerpo" debe interpretarse como que abarca cualquier miembro de unión o sustancia que tiene un sitio de unión antígeno-anticuerpo de la especificidad requerida y/o que se une a un antígeno. Por lo tanto, este término abarca fragmentos y derivados de anticuerpos, incluido cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión antígeno-anticuerpo, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por consiguiente, se incluyen las moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión antígeno-anticuerpo o equivalente fusionado con otro polipéptido (por ejemplo, derivado de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpos). La clonación y la expresión de anticuerpos quiméricos se describe en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y en una extensa colección de bibliografía posterior.

**[00036]** Otras técnicas disponibles en la tecnología de la construcción de anticuerpos han hecho posible el aislamiento de anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, pueden prepararse hibridomas humanos según describen Kontermann y Dubel (2001). La expresión en fagos, otra técnica establecida para generar miembros de unión ha sido descrita en detalle en numerosas publicaciones, como el documento WO92/01047 (discutido más adelante), las patentes de los EE. UU. US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404 y Kontermann y Dubel (2001). Para el aislamiento de anticuerpos humanos pueden usarse ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpos del ratón se inactivan y se sustituyen con genes de anticuerpos humanos, mientras se dejan intactos otros componentes del sistema inmunitario del ratón (Mendez 1997).

**[00037]** Es posible crear moléculas de anticuerpo sintéticas mediante la expresión de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados e incorporados en vectores de expresión adecuados, por ejemplo, según describen Knappik y col. (2000) o Krebs y col. (2001).

**[00038]** Se ha demostrado que fragmentos de un anticuerpo completo pueden desempeñar la función de unirse a antígenos. Algunos ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward 1989, McCafferty 1990, Holt 2003) que consta de un dominio VH o un dominio VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados; (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están enlazados mediante un enlazante peptídico que permite a los dos dominios asociarse para formar un sitio de unión a un antígeno (Bird 1988, Huston 1988); (viii) dímeros Fv de cadena sencilla biespecíficos (documento PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (documento WO94/13804, Holliger 1993a). Los fragmentos Fv, scFv o las moléculas de diacuerpos pueden estabilizarse por la incorporación de puentes disulfuro que enlacen los dominios VH y VL (Reiter 1996). También pueden prepararse minicuerpos que comprenden un fragmento scFv unido a un dominio CH3 (Hu 1996). Otros ejemplos de fragmentos de unión son Fab', que difiere de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada, incluidas una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo y Fab'-SH que es un fragmento Fab' en el que el(los) resto(s) de cisteína de los dominios constantes tiene(n) un grupo tiol libre.

**[00039]** Los fragmentos de anticuerpo de la presente invención se pueden obtener a partir de cualquiera de las moléculas de anticuerpo descritas en este documento, por ejemplo, moléculas de anticuerpo que comprenden los dominios VH y/o VL o regiones CDR de cualquiera de los anticuerpos descritos en este documento, por procedimientos, tales como la digestión con enzimas, tal como pepsina o papaína y/o mediante la rotura de los puentes disulfuro por reducción química. De otra manera, los fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden obtenerse por técnicas de recombinación genética igualmente bien conocidas por el experto en la técnica o además por síntesis peptídica, por ejemplo, por medio de sintetizadores de péptidos automáticos, tales como los proporcionados por la empresa Applied Biosystems, etc. o por síntesis y expresión de ácidos nucleicos.

**[00040]** Los fragmentos de anticuerpo funcionales según la presente invención incluyen cualquier fragmento funcional cuya semivida se aumenta mediante una modificación química, especialmente una PEGilación, o mediante incorporación en un liposoma.

**[00041]** Según se usa en este documento, la frase "sustancialmente según se expone" se refiere a que la(s)

característica(s) de las regiones CDR relevantes del dominio VH o VL de los miembros de unión descritos en este documento serán idénticas o muy similares a las regiones especificadas cuya secuencia se expone en este documento. Según se describe en este documento, la expresión “muy similar” con respecto a una región especificada o regiones especificadas de uno o más dominios variables contempla que pueden llevarse a cabo de 5 una a aproximadamente cinco, por ejemplo, de una a cuatro, incluidas de una a tres o una o dos o tres o cuatro sustituciones de aminoácidos en la región CDR y/o el dominio VH o VL.

**[00042]** Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales forman una segunda generación de anticuerpos monoclonales en la que se combinan dos regiones variables diferentes en la misma molécula (Holliger 1999). Su 10 utilidad se ha demostrado tanto en el ámbito del diagnóstico como en el ámbito del tratamiento, a partir de su capacidad de incorporar nuevas funciones efectoras o de reconocer específicamente varias moléculas en la superficie de las células tumorales. En los casos en que han de usarse anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden prepararse de diversas maneras (Holliger 1993b), por ejemplo, químicamente a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo 15 biespecíficos mencionados anteriormente. Estos anticuerpos pueden obtenerse por procedimientos químicos (Glennie 1987, Repp 1995) o por procedimientos somáticos (Staerz 1986, Suresh 1986), pero igualmente por técnicas de ingeniería genética que permiten forzar la heterodimerización y de este modo facilitan el proceso de purificación del anticuerpo deseado (Merchand 1998). Algunos ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen los de la tecnología BiTE™, en la que pueden usarse los dominios de unión de dos anticuerpos de diferente especificidad y 20 enlazarse directamente por medio de péptidos flexibles de poca longitud. Esto combina dos anticuerpos en una única cadena polipeptídica de poca longitud. Los diacuerpos y fragmentos scFv pueden construirse sin una región Fc, usando solamente dominios variables, lo que potencialmente reduce los efectos de una reacción antiidiotípica.

**[00043]** Los anticuerpos biespecíficos pueden construirse como una IgG completa, como fragmentos Fab'2 25 biespecíficos, como Fab'PEG, como diacuerpos o además como fragmentos scFv biespecíficos. Además, dos anticuerpos biespecíficos puede enlazarse por los procedimientos de rutina conocidos en la técnica para formar anticuerpos tetravalentes.

**[00044]** Los diacuerpos biespecíficos, al contrario que los anticuerpos biespecíficos completos, pueden ser 30 también especialmente útiles porque pueden construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Es posible seleccionar fácilmente diacuerpos (y muchos otros polipéptidos como los fragmentos de anticuerpo) con las especificidades de unión adecuadas a partir de colecciones mediante expresión en fagos (documento WO94/13804). Si un brazo del diacuerpo ha de mantenerse constante, por ejemplo, con especificidad dirigida contra un antígeno diana, puede prepararse una colección en la que se varía el otro brazo y seleccionar un anticuerpo con la especificidad apropiada. 35 Los anticuerpos biespecíficos completos pueden prepararse por procedimientos de construcción alternativos según se describe en Ridgeway 1996.

**[00045]** Existen diversos procedimientos disponibles en la técnica para obtener anticuerpos dirigidos contra un antígeno diana. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, especialmente de origen humano, murino, 40 quimérico o humanizado, que pueden obtenerse de acuerdo con los procedimientos estándar bien conocidos por el experto.

**[00046]** En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o de sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible referirse a técnicas que se describen en particular en el manual 45 “Antibodies” (Harlow y Lane 1988) o a la técnica de preparación a partir de hibridomas descrita por Kohler y Milstein 1975.

**[00047]** Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de una célula animal inmunizada contra A-FN o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido por dichos anticuerpos 50 monoclonales, por ejemplo, un fragmento que comprende o consta de ED-A o un fragmento peptídico de ED-A. La A-FN o uno de sus fragmentos pueden producirse especialmente de acuerdo con los procedimientos de trabajo habituales, por recombinación genética a partir de una secuencia de ácido nucleico contenida en la secuencia de ADNc que codifica A-FN o un fragmento de esta, por síntesis peptídica a partir de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia peptídica de la A-FN y/o un fragmento de esta. 55

**[00048]** Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden purificarse en una columna de afinidad en la que se han inmovilizado previamente A-FN o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo, un fragmento que comprende o consta de ED-A o un fragmento peptídico de ED-A. Los anticuerpos monoclonales pueden purificarse por cromatografía sobre proteína A y/o G, seguida o no por 60 cromatografía de intercambio iónico con el objetivo de eliminar los contaminantes proteínicos residuales así como el ADN y los LPS, en sí misma, seguida o no por cromatografía de exclusión en gel de sefarsa con el fin de eliminar los agregados potenciales debidos a la presencia de dímeros o de otros multímeros. Todas estas técnicas pueden usarse simultánea o sucesivamente.

65 *Sitio de unión a antígeno*

**[00049]** Este describe la parte de una molécula que se une a y es complementaria de todo o a parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo se denomina el sitio de unión antígeno-anticuerpo y comprende la parte del anticuerpo que se une a y es complementaria de todo o parte del antígeno. Si el antígeno es de gran tamaño, un anticuerpo solo puede unirse a una parte concreta del antígeno, que se denomina epítipo. Un sitio de unión antígeno-anticuerpo puede ser proporcionado por uno o más dominios variables de un anticuerpo. Un sitio de unión antígeno-anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo (VH).

#### Aislado

10

**[00050]** Esto se refiere al estado en el que estarán generalmente, según la presente invención, los miembros de unión de la presente invención o el ácido nucleico que codifica dichos miembros de unión. Por lo tanto, los miembros de unión de la presente invención pueden proporcionarse aislados y/o purificados, por ejemplo, a partir de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea o, en el caso de un ácido nucleico, sin o sustancialmente sin ácidos nucleicos o genes de un origen distinto de la secuencia codificante de un polipéptido con la función requerida. Los miembros aislados y los ácidos nucleicos aislados no contendrán o sustancialmente no contendrán material con el que normalmente están asociados, tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular), cuando dicha preparación tiene lugar por tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y los ácidos nucleicos pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y aislarse incluso para fines prácticos. Por ejemplo, los miembros se mezclarán normalmente con gelatina u otros vehículos cuando se usen para recubrir placas de microtitulación para uso en inmunoensayos o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usen para diagnóstico o tratamiento. Los miembros de unión pueden estar glicosilados, bien de forma natural o por sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NS0 (ECACC 25 85110503)) o pueden no estar glicosilados (por ejemplo, si se producen por expresión en una célula procarionota).

**[00051]** Las preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpo también forman parte de la invención. Por ejemplo, dichas preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de la lisina C-terminal, con diversos grados de glicosilación y/o aminoácidos derivatizados, tales como la ciclación de un ácido glutámico N-terminal para formar un resto de ácido piroglutámico.

**[00052]** Se pueden obtener uno o más miembros de unión para un antígeno, por ejemplo la A-FN o el ED-A de la fibronectina, poniendo en contacto una colección de miembros de unión según la presente invención y el antígeno o un fragmento del mismo, por ejemplo, un fragmento que comprende o consiste en ED-A o un fragmento peptídico de ED-A y seleccionando uno o más miembros de unión de la colección capaces de unirse al antígeno.

**[00053]** Una colección de anticuerpos puede cribarse mediante cribado iterativo de filtros de colonias (ICFS). En la técnica ICFS, se cultivan bacterias que contienen el ADN que codifica varias especificidades de unión en un medio líquido y, una vez que se ha alcanzado la fase de crecimiento exponencial, se distribuyen miles de millones de estas en un soporte de crecimiento que consta de un filtro de membrana pretratado adecuadamente que se incubaba hasta que aparecen colonias de bacterias totalmente confluentes. Un segundo sustrato de retención consta de otro filtro de membrana, prehumidificado y cubierto con el antígeno deseado.

**[00054]** El filtro de membrana de retención se coloca después sobre una placa que contiene un medio de cultivo adecuado y se cubre con el filtro de crecimiento con la superficie cubierta con las colonias bacterianas hacia arriba. El sándwich así obtenido se incubaba a temperatura ambiente durante 16 h. De este modo es posible obtener la expresión de los genes codificantes de fragmentos de anticuerpo scFv con una acción de propagación, de modo que aquellos fragmentos que se unen específicamente al antígeno presente en la membrana de retención quedan retenidos. La membrana de retención se trata después para señalar los fragmentos de anticuerpo scFv unidos con las técnicas colorimétricas usadas normalmente para este fin.

**[00055]** La posición de los puntos coloreados en el filtro de retención permite remitirse a las colonias bacterianas correspondientes que están presentes en la membrana de crecimiento y han producido los fragmentos de anticuerpo retenidos. Estas colonias se recogen y se cultivan y las bacterias –algunos millones– se distribuyen sobre una nueva membrana de cultivo, repitiendo los procedimientos descritos anteriormente. Después se llevan a cabo ciclos análogos hasta que las señales positivas en la membrana de retención corresponden a colonias positivas individuales, cada una de las cuales representa una fuente potencial de fragmentos de anticuerpo monoclonal dirigidos contra el antígeno usado en la selección. La técnica ICFS se describe, por ejemplo, en el documento WO0246455. Una colección también puede expresarse en partículas o complejos moleculares, por ejemplo, en paquetes genéticos replicables como partículas de bacteriófagos (por ejemplo, T7) u otros sistemas de expresión *in vitro*, en que cada partícula o complejo molecular contiene un ácido nucleico que codifica el dominio variable de anticuerpo VH expresado en esta y, opcionalmente, también expresa un dominio VL si está presente. La expresión en fagos se describe en el documento WO92/01047 y en las patentes de los EE. UU. US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 y US6521404.

- 5 **[00056]** Después de la selección de los miembros de unión capaces de unirse al antígeno y expresarse en bacteriófagos o en otras partículas o complejos moleculares de colecciones, puede obtenerse el ácido nucleico de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que expresa dicho miembro de unión seleccionados. Dicho ácido nucleico puede usarse en la producción posterior de un miembro de unión o de los dominios variables de anticuerpo VH o VL mediante la expresión a partir del ácido nucleico con la secuencia del ácido nucleico obtenido de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que expresan dicho miembro de unión.
- 10 **[00057]** Un dominio variable de anticuerpo VH con la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo VH de dicho miembro de unión seleccionado puede proporcionarse en forma aislada, al igual que un miembro de unión que comprende un dominio VH.
- 15 **[00058]** La capacidad de unión a la A-FN o al ED-A de la fibronectina o a otro antígeno diana o isoforma puede analizarse adicionalmente, por ejemplo, la capacidad de competir, por ejemplo, con el anticuerpos F8 dirigido contra ED-A en la unión a la A-FN o a un fragmento de la A-FN, por ejemplo, el ED-A de la fibronectina.
- 20 **[00059]** Un miembro de unión de la presente invención puede unirse específicamente a la A-FN y/o al ED-A de la fibronectina. Un miembro de unión de la presente invención puede unirse al ED-A de la fibronectina con la misma afinidad que el anticuerpo F8 dirigido contra ED-A, por ejemplo en formato de scFv, o con una mejor afinidad. Un miembro de unión de la presente invención se une al ED-A de la fibronectina con una  $K_D$  de menos de  $1,4 \times 10^{-8}$ . Con la mayor preferencia, un miembro de unión de la presente invención se une al ED-A de la fibronectina con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-9}$  M o con una mejor afinidad.
- 25 **[00060]** Un miembro de unión de la presente invención puede unirse al mismo epítipo en la A-FN y/o el ED-A de la fibronectina que el anticuerpo F8 dirigido contra ED-A.
- 30 **[00061]** Un miembro de unión de la presente invención puede no mostrar ninguna unión significativa a moléculas distintas del ED-A de la fibronectina. En particular, el miembro de unión puede que no se una a otras isoformas de la fibronectina, por ejemplo, a la isoforma ED-B y/o la isoforma IIICS de la fibronectina.
- 35 **[00062]** En la presente invención pueden producirse y usarse variantes de las moléculas de anticuerpo descritas en este documento. Las técnicas requeridas para llevar a cabo sustituciones en las secuencias de aminoácidos de los dominios de anticuerpo VH o VL y los miembros de unión están disponibles generalmente en la técnica. Pueden prepararse secuencias variantes con sustituciones para las que puede predecirse o no un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad y analizarse en cuanto a su capacidad para unirse al ED-A de la fibronectina y/o en cuanto a cualquier otra propiedad deseada.
- 40 **[00063]** Tal como se describen, de acuerdo con la presente invención, pueden emplearse variantes de la secuencia de aminoácidos de dominios variables de cualquiera de los dominios VH y VL, cuyas secuencias se describen específicamente en este documento. Algunas variantes concretas pueden incluir una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un resto de aminoácido), pueden ser menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de aproximadamente 10 alteraciones o menos de aproximadamente 5 alteraciones, tal vez 5, 4, 3, 2 ó 1. Las alteraciones pueden llevarse a cabo en una o más regiones estructurales. Normalmente, las alteraciones no resultan en una pérdida de función, por lo que un miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos alterada de este modo puede mantener la capacidad de unión al ED-A de la fibronectina. Por ejemplo, puede mantener la misma unión cuantitativa que un miembro de unión en el que no se ha llevado a cabo la alteración, por ejemplo, según se mide en un ensayo descrito en este documento. El miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos alterada de este modo puede tener mejor capacidad de unión al ED-A de la fibronectina.
- 45 **[00064]** Es posible generar nuevas regiones VH o VL con las secuencias derivadas de CDR mediante mutagénesis al azar de uno o más genes seleccionados de VH y/o VL para generar mutaciones en todo el dominio variable. En algunas realizaciones, se llevan a cabo una o dos sustituciones de aminoácidos en todo un dominio variable.
- 50 **[00065]** Según se ha señalado anteriormente, una secuencia de aminoácidos de CDR, sustancialmente según se expone en este documento, puede estar contenida como CDR en un dominio variable de un anticuerpo humano o en una porción sustancial del mismo.
- 55 **[00066]** Los dominios variables pueden obtenerse o derivarse de cualquier dominio variable humano de la línea germinal o reordenado o puede ser un dominio variable sintético a base de secuencias consenso o reales de dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable puede derivarse de un anticuerpo no humano. Una secuencia de CDR de la invención (por ejemplo, CDR3) puede incorporarse en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (por ejemplo, CDR3) mediante la tecnología del ADN recombinante. Por ejemplo, Marks y col. (1992) describen procedimientos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que se usan cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable junto con
- 60 **[00066]** Los dominios variables pueden obtenerse o derivarse de cualquier dominio variable humano de la línea germinal o reordenado o puede ser un dominio variable sintético a base de secuencias consenso o reales de dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable puede derivarse de un anticuerpo no humano. Una secuencia de CDR de la invención (por ejemplo, CDR3) puede incorporarse en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (por ejemplo, CDR3) mediante la tecnología del ADN recombinante. Por ejemplo, Marks y col. (1992) describen procedimientos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que se usan cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable junto con
- 65 **[00066]** Los dominios variables pueden obtenerse o derivarse de cualquier dominio variable humano de la línea germinal o reordenado o puede ser un dominio variable sintético a base de secuencias consenso o reales de dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable puede derivarse de un anticuerpo no humano. Una secuencia de CDR de la invención (por ejemplo, CDR3) puede incorporarse en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (por ejemplo, CDR3) mediante la tecnología del ADN recombinante. Por ejemplo, Marks y col. (1992) describen procedimientos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que se usan cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable junto con

cebadores consenso a la tercera región estructural de los genes de VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de CDR3. Marks y col. describen además cómo puede combinarse este repertorio con una CDR3 de un anticuerpo concreto. Mediante técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 descritas en este documento pueden mezclarse con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR13 y los dominios VH y VL completos mezclados pueden combinarse con un dominio VL o VH afín para proporcionar miembros de unión. El repertorio puede expresarse a continuación en un sistema huésped adecuado, tal como el sistema de expresión en fagos del documento WO92/01047 o de cualquier documento de una extensa bibliografía posterior, incluyendo Kay, Winter y McCafferty (1996), de modo que puedan seleccionarse los miembros de unión adecuados. Un repertorio puede consistir en cualquier cantidad a partir de  $10^4$  miembros individuales, por ejemplo, al menos  $10^5$ , al menos  $10^6$ , al menos  $10^7$ , al menos  $10^8$ , al menos  $10^9$  o al menos  $10^{10}$  miembros.

**[00067]** De manera similar, una o más o las tres CDR pueden injertarse en un repertorio de dominios VH o VL que a continuación se criban para identificar un miembro de unión o miembros de unión para el ED-A de la fibronectina.

**[00068]** Pueden emplearse HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del anticuerpo F8 y LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del anticuerpo F8.

**[00069]** La A-FN y/o el ED-A de la fibronectina pueden usarse en un cribado para identificar moléculas de anticuerpo. El cribado puede ser un cribado de un repertorio según se describe en otra parte de este documento.

**[00070]** Una porción sustancial de un dominio variable de una inmunoglobulina puede comprender al menos las tres regiones CDR junto con sus regiones estructurales intercaladas. La porción puede incluir también al menos aproximadamente el 50% de una o dos de las regiones estructurales primera y cuarta, siendo el 50% el 50% C-terminal de la primera región estructural y el 50% N-terminal de la cuarta región estructural. Los restos adicionales en los extremos N-terminal y C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos que no se asocian normalmente con regiones de dominios variables naturales. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión por técnicas de ADN recombinante puede resultar en la introducción de restos N o C-terminales codificados por enlazantes introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazantes para unir dominios variables de la invención con otras secuencias proteínicas, incluyendo las regiones constantes de un anticuerpo, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o marcadores detectables/funcionales según se discute en más detalle en otra parte de este documento.

**[00071]** Los miembros de unión de la presente invención pueden comprender además regiones constantes de un anticuerpo o partes de las mismas, por ejemplo regiones constantes de un anticuerpo humano o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede unirse en su extremo C-terminal con dominios constantes de la cadena ligera de un anticuerpo, incluidas las cadenas C $\kappa$  y C $\lambda$  humanas, por ejemplo C $\lambda$ . De manera similar, un miembro de unión basado en un dominio VH puede unirse en su extremo C-terminal con 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 isotipos, en particular IgG1 e IgG4. Cualquier variante sintética o de otra región constante que tiene estas propiedades y estabiliza las regiones variables también es útil en las realizaciones de la presente invención.

**[00072]** Los miembros de unión de la presente invención pueden estar marcados con un marcador detectable o funcional. Un marcador puede ser cualquier molécula que produce o que puede ser inducida para producir una señal, incluidos, pero sin limitarse a, sustancias fluorescentes, radiomarcadores, enzimas, sustancias quimioluminiscentes o fotosensibilizantes. Por lo tanto, la unión puede detectarse y/o medirse mediante la detección de fluorescencia o luminiscencia, radiactividad, actividad enzimática o absorbancia de luz. Los marcadores detectables pueden unirse a los anticuerpos mediante procedimientos químicos convencionales conocidos en la técnica.

**[00073]** Existen numerosos procedimientos por los que el marcador puede producir una señal detectable por medios externos, por ejemplo, por examen visual, radiación electromagnética, calor y reactivos químicos. El marcador puede unirse también a otro miembro de unión que se une al anticuerpo de la presente invención, o a un soporte.

**[00074]** Los anticuerpos marcados, por ejemplo, scFv marcado con un marcador detectable, pueden usarse para diagnóstico *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* y/o para tratamiento.

**[00075]** Por ejemplo, los anticuerpos radiomarcados (por ejemplo, anticuerpos conjugados con un radioisótopo) pueden usarse en radiodiagnóstico y en radioterapia. Los radioisótopos que pueden conjugarse con un miembro de unión de la invención incluyen isótopos como  $^{94m}\text{Tc}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{121}\text{Sn}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{105}\text{Rh}$  y  $^{177}\text{Lu}$ .

**[00076]** Un miembro de unión según se describe en este documento puede usarse también para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competición, es decir, un procedimiento para la medición del nivel de antígeno

en una muestra mediante el empleo de un miembro de unión proporcionado por la presente invención en un ensayo de competición. Esto puede ser cuando no se requiera la separación física del antígeno unido del antígeno no unido. Una posibilidad es el acoplamiento de una molécula indicadora al miembro de unión, de modo que se produzca un cambio físico u óptico al tener lugar la unión. La molécula indicadora puede generar de manera directa o indirecta 5 señales detectables, que pueden ser cuantificables. El acoplamiento de las moléculas indicadoras puede ser directo o indirecto, covalente, por ejemplo, por medio de un enlace peptídico, o no covalente. El acoplamiento por medio de un enlace peptídico puede ser el resultado de la expresión recombinante de una fusión génica que codifica el anticuerpo y la molécula indicadora.

10 **[00077]** Los ensayos de competición pueden usarse también en el mapeo de epítomos. En un caso, el mapeo de epítomos puede usarse para identificar el epítomo al que se une un miembro de unión. Dicho epítomo puede ser lineal o conformacional. Un epítomo conformacional puede comprender al menos dos fragmentos diferentes de la A-FN o del ED-A de la fibronectina, en que dichos fragmentos se sitúan próximos entre sí cuando se plegan la A-FN o el ED-A de la fibronectina en su estructura terciaria o cuaternaria para formar un epítomo conformacional que es 15 reconocido por un miembro de unión a la A-FN o el ED-A de la fibronectina. Para ensayar la competición puede emplearse un fragmento peptídico del antígeno, especialmente un péptido que incluya o consista esencialmente en un epítomo de interés. Puede usarse un péptido que tenga la secuencia epitópica más uno o más aminoácidos en cualquiera de los dos extremos. Los miembros de unión según la presente invención pueden ser tales que su unión al antígeno sea inhibida por un péptido que tenga o incluya la secuencia proporcionada

20 **[00078]** También se describe un conjugado o una fusión entre un miembro de unión de la presente invención y una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre las células diana en las lesiones y un anticuerpo dirigido contra un componente de la matriz extracelular que está presente en tales lesiones. Por ejemplo, la molécula biocida o citotóxica puede ser interleucina 2 (IL-2), doxorubicina, interleucina 12 (IL-12), interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), el factor 25 de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) o el factor tisular (preferentemente truncado). Tales conjugados pueden usarse terapéuticamente, por ejemplo, para el tratamiento de metástasis tumorales y/o tumores según se menciona en este documento. La producción y el uso de fusiones o conjugados de miembros de unión con moléculas biocidas o citotóxicas se describen, por ejemplo, en el documento WO01/622988.

30 **[00079]** Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico en las células diana por interacción celular y (ii) un miembro de unión que se une al ED-A de la fibronectina humana según la presente invención. Preferentemente, dicho conjugado comprende una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y dicho miembro de unión o, cuando el miembro de unión es de cadena doble o múltiple, una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o 35 citotóxica y un componente de cadena polipeptídica de dicho miembro de unión. Preferentemente, el miembro de unión es un polipéptido de cadena sencilla, por ejemplo, una molécula de anticuerpo de cadena sencilla, tal como scFv. Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y una molécula de anticuerpo Fv de cadena sencilla de la invención.

40 **[00080]** La molécula biocida o citotóxica que ejerce su efecto sobre las células diana por interacción celular puede interaccionar directamente con las células diana, puede interaccionar con un receptor unido a la membrana en la célula diana o perturbar el potencial electroquímico de la membrana celular. Las moléculas que interaccionan con un receptor unido a la membrana incluyen quimiocinas, citocinas y hormonas. Los compuestos que perturban el potencial electroquímico de la membrana celular incluyen hemolisina, ionóforos, fármacos que actúan sobre los 45 canales iónicos. En realizaciones ejemplares preferidas, la molécula es interleucina 2, el factor tisular (preferentemente truncado) o doxorubicina. Otras realizaciones pueden emplear interleucina 12, interferón  $\gamma$ , IP-10 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

**[00081]** Según se discute más adelante, el miembro de unión específico es un anticuerpo. Convenientemente, 50 el miembro de unión específico puede ser un polipéptido de cadena sencilla, tal como un anticuerpo de cadena sencilla. Esto permite la producción conveniente de una proteína de fusión que comprende el anticuerpo de cadena sencilla y la molécula biocida o citotóxica (por ejemplo, interleucina 2 o el factor tisular). En otras realizaciones se proporciona un sitio de unión a antígeno del anticuerpo por medio de la asociación de un dominio de anticuerpo VH y un dominio de anticuerpo VL en polipéptidos separados, por ejemplo, en un anticuerpo completo o en un fragmento 55 de anticuerpo, tal como Fab o un díacuerpo. Cuando el anticuerpo es una molécula de cadena doble o de cadena múltiple (por ejemplo, Fab o un anticuerpo completo, respectivamente), la molécula biocida o citotóxica puede estar conjugada como un polipéptido de fusión con una o más cadenas polipeptídicas en el miembro de unión específico.

**[0082]** El miembro de unión puede estar conjugado con la molécula biocida o citotóxica por medio de un 60 enlace peptídico, es decir, dentro de un polipéptido de fusión que comprende dicha molécula y el miembro de unión específico o un componente de cadena polipeptídica del mismo. Véase Taniguchi y col. (1983) Nature, 302: 305-310; MaED-A y col. (1983) Biochem. Biophys. Res. Comm., 115: 1040-1047; Devos y col. (1983) Nucl. Acids Res., 11: 4307-4323, para información sobre la secuencia de IL-2 útil en la preparación de un polipéptido de fusión que comprende IL-2. La información sobre la secuencia del factor tisular truncado la proporcionan Scarpati y col. (1987) 65 Biochemistry, 26: 5234-5238 y Ruf y col. (1991) J. Biol. Chem., 226: 15719-15725. Otros medios para la conjugación incluyen la conjugación química, especialmente el entrecruzamiento mediante un agente bifuncional (por ejemplo,

mediante DOUBLE-REAGENTS™, Cross-linking Reagents Selection Guide, Pierce).

**[0083]** Cuando se desea una liberación lenta, por ejemplo, cuando la molécula biocida o citotóxica es doxorubicina u otra molécula que perturba el potencial electroquímico de la membrana celular, la conjugación química puede tener lugar mediante la formación de una base de Schiff (imina) entre un grupo amino primario del miembro de unión específico (un polipéptido, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo) y una fracción de azúcar oxidada (daunosamina) de la molécula biocida o citotóxica, tal como doxorubicina.

**[0084]** La presente invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión de la presente invención tal como se expone en las reivindicaciones. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN. En un aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo, por ejemplo scFv o IgG, por ejemplo IgG1, de la presente invención, tal como se define anteriormente. Las secuencias de nucleótidos preferidas son las secuencias de nucleótidos que codifican los dominios VH y VL descritas en este documento.

**[0085]** La presente invención también proporciona construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido según se describe anteriormente.

**[0086]** La presente invención también proporciona una célula huésped recombinante que comprende una o más construcciones según se describen anteriormente, tal como se expone en las reivindicaciones. Un ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG1 o IgG4, tal como se proporcionan, forma por sí mismo un aspecto de la presente invención, al igual que un procedimiento para la producción del producto codificado, tal como se expone en las reivindicaciones, en el que el procedimiento comprende la expresión a partir del ácido nucleico codificante. La expresión puede conseguirse convenientemente mediante el cultivo en las condiciones apropiadas de células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, puede aislarse un dominio VH o VL o un miembro de unión y/o purificarse mediante cualquier técnica adecuada y, a continuación, usarse según sea apropiado.

**[0087]** Un ácido nucleico, según la presente invención, puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos, según se expone en este documento, abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada, en la que T se sustituye por U, a menos que el contexto requiera lo contrario.

**[0088]** Además se describe un procedimiento para la producción de un dominio variable de anticuerpo VH, en el que el procedimiento incluye inducir la expresión a partir del ácido nucleico codificante. Dicho procedimiento puede comprender el cultivo de las células huésped en las condiciones para la producción de dicho dominio variable de anticuerpo VH.

**[0089]** También se proporcionan procedimientos análogos para la producción de dominios variables VL y miembros de unión que comprenden un dominio VH y VL.

**[0090]** Un procedimiento de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto. Un procedimiento de producción puede comprender la formulación del producto en una composición que incluye al menos un componente adicional, como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

**[0091]** Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de células huésped diferentes son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, células vegetales, hongos filamentosos, levaduras y sistemas de baculovirus y plantas y animales transgénicos. La expresión de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpo en células procariontas está bien establecida en la técnica. Como revisión, véase, por ejemplo, Pluckthun 1991. Un huésped bacteriano común es *E. coli*.

**[0092]** La expresión en un cultivo de células eucariotas también es una opción disponible para los expertos en la técnica para la producción de un miembro de unión, por ejemplo Chadd y Chamow (2001), Andersen y Krummen (2002), Larrick y Thomas (2001). Las líneas celulares de mamíferos disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células ováricas de hámster chino (CHO), células HeLa, células renales de cría de hámster, células de melanoma de ratón NS0, células de mieloma de rata YB2/0, células embrionarias humanas de riñón, células embrionarias humanas de retina y muchas otras.

**[0093]** Pueden elegirse o construirse vectores adecuados que contengan las secuencias reguladoras apropiadas, incluidas secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, por ejemplo, fagémidos, o víricos, por ejemplo, fagos, según sea apropiado. Para más detalles, véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001). Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, para la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica y análisis de proteínas, se describen en detalle en Ausubel 1999.

**[0094]** Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una célula huésped que contiene un ácido nucleico descrito en este documento, tal como se expone en las reivindicaciones. Dicha célula huésped puede estar *in vitro* y puede estar en cultivo. Dicha célula huésped puede estar *in vivo*. La presencia *in vivo* de la célula huésped puede permitir la expresión intracelular de los miembros de unión de la presente invención como "intracuerpos" o anticuerpos intracelulares. Los intracuerpos pueden usarse para terapia génica.

**[0095]** También se describe en este documento un procedimiento que comprende la introducción de un ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción mediante retrovirus u otros virus, por ejemplo, el virus vacuna o, para células de insectos, baculovirus. La introducción de un ácido nucleico en una célula huésped, en particular en una célula eucariota, puede usar un sistema a base de virus o plásmidos. El sistema plasmídico puede mantenerse en forma episómica o puede incorporarse en la célula huésped o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser por integración al azar o dirigida de una o más copias en locus únicos o múltiples. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección mediante bacteriófagos.

**[0096]** Después de la introducción puede inducirse o permitirse la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, mediante el cultivo de las células huésped en las condiciones para la expresión del gen. La purificación del producto expresado puede conseguirse por procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

**[0097]** Un ácido nucleico según se describe en este documento puede integrarse en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración puede estimularse por la inclusión de secuencias que estimulan la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.

**[0098]** También se describe un procedimiento que comprende el uso de una construcción según se expone anteriormente en un sistema de expresión con el fin de expresar un miembro de unión o un polipéptido según se describe anteriormente.

**[0099]** Los miembros de unión de la presente invención están diseñados para su uso en procedimientos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, por ejemplo, humanos. Los miembros de unión pueden usarse en procedimientos para el diagnóstico o el tratamiento de metástasis tumorales y/o la metástasis tumoral.

## **EXPERIMENTAL**

### **MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS**

#### *Modelo animal*

**[00100]** Los experimentos con animales fueron aprobados por la Oficina Veterinaria Federal Suiza y realizados de acuerdo con la Ordenanza de Protección Animal Suiza. Los ratones se monitorizaron regularmente. Los animales que mostraron cualquier señal de dolor o sufrimiento se sacrificaron, así como en caso de pérdidas de peso corporal superiores al 15%. Ratones Sv129 macho (RCC, Fullingsdorf, Suiza) recibieron una inyección intravenosa de 10<sup>6</sup> células de teratocarcinoma murino F9 (Terrana y col. 1987), proporcionadas amablemente por Dario Rusciano (SIFI, Catania, Italia). Los ratones se usaron tres semanas después de la inyección de células tumorales para biotilación *in vivo*, experimentos de reconocimiento específico o extirpación de órganos para inmunohistoquímica.

#### *Biotilación in vivo*

**[00101]** Los experimentos de biotilación *in vivo* se llevaron a cabo según se ha descrito previamente (Roesli y col. 2006, Rybak y col. 2005). Brevemente, el pecho del ratón anestesiado se abrió mediante un esternotomía mediana. El ventrículo izquierdo del corazón se perforó con una aguja de perfusión y se hizo un pequeño corte en la aurícula derecha para permitir la salida de las disoluciones de perfusión. Inmediatamente después, se llevó a cabo una perfusión de la circulación sistémica con una presión de 100 mm de Hg (13,33 kPa) y una tasa de flujo de 1,5 ml/min. En una primera etapa, la perfusión se llevó a cabo con 15 ml de una disolución biotilada (precalentada a 38°C) que contenía 1 mg/ml de sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce, Rockford, IL, EE- UU.) en PBS, pH 7,4, enriquecida con dextrano-40 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) al 10% (p/v) como expansor de plasma. De este modo, los componentes sanguíneos que podrían competir con la reacción de biotilación se eliminaron de la circulación en los primeros minutos de la perfusión y las proteínas que contenían aminas primarias accesibles (y ciertos glicolípidos y fosfolípidos) en los diferentes tejidos pudieron modificarse covalentemente con biotina. Para neutralizar el reactivo de biotilación sin reaccionar, la biotilación *in vivo* fue seguida de una etapa de lavado de 10 min con Tris 50 mM, dextrano-40 al 10% (p/v) en PBS, pH 7,4, precalentado a 38°C. Durante la perfusión con el reactivo de biotilación (y durante los primeros tres minutos de la perfusión siguiente con la disolución de neutralización), la región alrededor del corazón se lavó con Tris 50 mM en PBS, pH 7,4 (38°C), para neutralizar el reactivo de biotilación sin reaccionar del flujo de salida y evitar el marcado no deseado de moléculas en las superficies de los órganos. Después de la perfusión, se extirparon los órganos y tumores y las muestras se sometieron a congelación instantánea en fresco

para la preparación de homogenados de los órganos o se incorporaron en un compuesto para crioincorporación (Microm, Walldorf, Alemania) y se congelaron en isopentano en nitrógeno líquido para la preparación de criosecciones para el análisis histoquímico. Como controles negativos para el análisis proteómico se usaron ratones sin perfundir.

5

*Preparación de extractos proteínicos para el análisis proteómico*

**[00102]** Las muestras se resuspendieron en 40  $\mu$ l por mg de tejido de tampón de lisis (SDS al 2%, Tris 50 mM, EDTA 10 mM, cóctel de inhibidores de proteinasas Complete E (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en PBS, pH 7,4) y se homogeneizaron mediante un aparato dispersador Ultra-Turrax T8 (IKA-Werke, Staufen, Alemania). Los homogenados se sometieron a ultrasonidos mediante un aparato Vibra-cell (Sonics, New Town, CT, EE. UU.), a lo que siguió una incubación de 15 min a 99°C y 20 min de centrifugación a 15.000 x g. El sobrenadante se usó como extracto de proteína total. La concentración de proteína se determinó mediante el kit de reactivos para análisis de proteínas BCA (Pierce).

15

*Purificación de proteínas biotiniladas*

**[00103]** Para cada muestra, 960  $\mu$ l de una lechada de estreptavidina-sefarosa (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) se lavaron tres veces en tampón A (NP40 al 1%, SDS al 0,1% en PBS), se sedimentaron y se mezclaron con 15 mg de extracto de proteína total. La captura de las proteínas biotiniladas se dejó proceder durante 2 h a temperatura ambiente en un mezclador agitador. Se eliminó el sobrenadante y la resina se lavó tres veces con tampón A, dos veces con tampón B (NP40 al 0,1%, NaCl 1 M en PBS) y una vez con bicarbonato de amonio 50 mM. Finalmente, la resina se suspendió en 400  $\mu$ l de una disolución de bicarbonato de amonio 50 mM y se le añadieron 20  $\mu$ l de tripsina porcina modificada de calidad de secuenciación (disolución madre de 40 ng/ $\mu$ l en bicarbonato de amonio 50 mM) (Promega, Madison, WI, EE. UU.). La digestión con proteasa se llevó a cabo durante la noche a 37°C en agitación constante. Los péptidos se desalaron, purificaron y concentraron con microcolumnas C18 (ZipTip C18, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Después de su liofilización, los péptidos se almacenaron a -20°C.

30

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

**[00104]** Los péptidos tripticos se separaron por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) mediante el sistema de CL en nanoescala UltiMate y un microcargador de muestras automático FAMOS (LC Packings, Ámsterdam, Países Bajos) controlado por el software Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, CA, EE. UU.). La fase móvil A constó de acetonitrilo al 2% y ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%, la fase móvil B fue acetonitrilo al 80% y TFA al 0,1% en agua. La tasa de flujo fue de 300 nl/min. Los péptidos liofilizados derivados de la digestión de las proteínas biotiniladas, purificados por afinidad a partir de 1,5 mg de proteína total se disolvieron en 5  $\mu$ l de tampón A y se cargaron en la columna (diámetro interno: 75  $\mu$ m, longitud: 15 cm, rellena con C18 PepMap 100, 3  $\mu$ m y microesferas de 100 Å; LC Packings). Los péptidos se eluyeron con un gradiente del 0-30% de B durante 7 min, del 30-80% de B durante 67 min, del 80-100% de B durante 3 min y B al 100% durante 5 min; la columna se equilibró con A al 100% durante 20 min antes de analizar la muestra siguiente. Las fracciones de elución se mezclaron con una disolución de 3 mg/ml de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, 277 pmol/ml de neurotensina (estándar interno), TFA al 0,1% y acetonitrilo al 70% en agua y se depositaron en una placa diana de MALDI de 192 pocillos mediante un sistema Probot en línea (Dionex). El flujo de la disolución matriz de MALDI se fijó en 1,083  $\mu$ l/min. Por lo tanto, cada fracción recogida durante 20 s contenía 361 nl de la disolución matriz de MALDI y 100 nl de la muestra. La concentración final de neurotensina fue de 100 fmol por pocillo.

*Espectrofotometría de masas MALDI-TOF/TOF*

**[00105]** El análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF se llevó a cabo con el analizador proteómico 4700 (Applied Biosystems, Framingham, MA, EE. UU.). Para la selección de iones precursores se midieron todas las fracciones en el modo EM, antes de realizar la EM/EM. Se seleccionaron un máximo de 15 precursores por punto de muestra para una fragmentación posterior por disociación inducida por colisión. Los espectros se procesaron y analizaron mediante la Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems), que usa el software interno MASCOT (Matrix Science, London, Reino Unido) para comparar los datos de EM y EM/EM con bases de datos de proteínas digeridas por medios informáticos. Los datos obtenidos se cribaron por comparación con una base de datos de ratón descargada de la página de internet del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las identificaciones de proteínas realizadas por medio del software MASCOT se consideraron como resultados positivos dentro del intervalo de confianza del 95% para el mejor ión peptídico.

**[00106]** Los análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF se llevaron a cabo mediante el analizador proteómico 4700 (Applied Biosystems). Las masas peptídicas se obtuvieron en un intervalo de 750 a 4.000 m/z, con una masa foco de 2.000 m/z. Se sumaron los espectros de EM de 2.000 disparos de un láser de Nd:YAG que operaba a 335 nm y 200 Hz. Se llevó a cabo una calibración automática de las placas mediante cinco estándares peptídicos (masas de 900-2.400 m/z; Applied Biosystems) en seis pocillos de calibración. Esta calibración de placas se usó para actualizar la calibración de masas por defecto del instrumento que se aplicó a todos los espectros de EN y EM/EM. Además se llevó a cabo una calibración interna de cada espectro de EM

mediante el péptido estándar interno añadido a la matriz de MALDI. Un máximo de 15 precursores por pocillo de muestra con una razón señal/ruido superior a 100 se seleccionó automáticamente para una fragmentación posterior por disociación inducida por colisión. Se sumaron los espectros de EM/EM de 2.500 a 5.000 disparos de láser. Los espectros se procesaron y analizaron mediante la Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems), que usa el software interno MASCOT (Matrix Science) para comparar los datos de EM y EM/EM con bases de datos de proteínas digeridas por medios informáticos. Los parámetros de búsqueda de MASCOT fueron (i) una base de datos de ratón descargada de la página de internet del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) el 9 de septiembre de 2006 ([ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/SPproteomes/fasta/proteomes/59.M\\_musculus.fasta.gz](ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/SPproteomes/fasta/proteomes/59.M_musculus.fasta.gz)); (ii) enzimas: tripsina y semitripsina; (iii) número permitido de sitios no cortados: 1; (iv) modificaciones postraduccionales variables: oxidación de metionina; (v) tolerancia para los péptidos:  $\pm 30$  ppm; (vi) tolerancia de EM/EM:  $\pm 0,2$  Da; (vii) carga de los péptidos: +1; (viii) mínimo % del IC de la puntuación iónica para péptidos: 95 y (ix) rango peptídico máximo: 1. Además, se usó una filtración de los picos de EM/EM con los siguientes parámetros: (i) intervalo de masas: 60 Da a 20 Da por debajo de la masa del precursor; (ii) mínima razón señal/ruido: 6; (iii) filtro de densidad de los picos: un máximo de 30 picos por 200 Da y (iv) máximo número de picos por espectro: 65.

15 *Anticuerpos*

**[00107]** El aislamiento del fragmento de anticuerpo scFv(L19) dirigido contra ED-B ha sido descrito previamente (Pini y col. 1998). El anticuerpo parental dirigido contra ED-A se aisló de la colección ETH-2 mediante procedimientos publicados (Giovannoni, *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(5): E27). La maduración de la afinidad del anticuerpo parental dirigido contra ED-A, que produce los anticuerpos de gran afinidad dirigidos contra ED-A, se describe en la sección siguiente.

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

**[00108]** El anticuerpo parental dirigido contra ED-A (un anticuerpo derivado de la colección ETH-2) se usó como molde para la construcción de una colección para maduración de afinidad. La variabilidad de secuencia en la CDR1 de VH (DP47 de la línea germinal) y en la CDR1 de VL (DPK22 de la línea germinal) de la colección se introdujo por PCR mediante los cebadores parcialmente degenerados 5'-CTGGAGCCTGGCGGACCCAGCTCATMNNMNMNNGCTAAAGGTGAATCCAGA-3' (SEQ ID NO: 17) para VH y 5'-CCAGGTTTCTGCTGGTACCAGGCTAAMNEPNMNMNMNGCTAACACTCTGACTGGCCCTGC-3' (SEQ ID NO: 18) para VL (todos los nucleótidos se adquirieron de Operon Biotechnologies, Colonia, Alemania) en un proceso que genera mutaciones al azar en las posiciones 31, 32 y 33 de la CDR1 de VH y en las posiciones 31, 31a y 3% de la CDR1 de VL. Las combinaciones VH-VL se ensamblaron en formato scFv por ensamblaje por PCR mediante los cebadores LMB3long (5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3') (SEQ ID NO: 19) y fdseqlong (5'-GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG-3') (SEQ ID NO: 20), con segmentos de VH y VL purificados por gel como moldes. Los fragmentos VH-VL ensamblados se sometieron a una doble digestión con *NcoI/NotI* y se clonaron en el vector fagémido pHEN1 (Hoogenboom y col. 1991) digerido con *NcoI/NotI*. El producto de ligación resultante se introdujo por electroporación en células TG-1 de *E. coli* electrocompetentes de acuerdo con (Viti y col 2000), para dar lugar a una colección que contenía  $1,5 \times 10^7$  clones de anticuerpos individuales, la cual se cribó para la identificación de anticuerpos que se unieran a ED-A con una mayor afinidad.

*Selección de anticuerpos dirigidos contra ED-A*

45 **[00109]** La colección de anticuerpos descrita anteriormente se cribó para la identificación de anticuerpos que se unieran a ED-A con mayor afinidad que el anticuerpo parental dirigido contra ED-A mediante un análisis BIAcore. El antígeno (11A12) usado en el análisis BIAcore contenía el dominio ED-A de la fibronectina humana y tiene la secuencia de aminoácidos siguiente (SEQ ID NO: 120):

```
MRSYRTEIDKPSQMQVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTTFKNGPGPTKTKTAGPDQ
TEMTIEGLQPTVEYVVSVYAQNPSGESQPLVQTAVTNI DRPKGLAFTD VDVDSIKIAWES
PQQQVSRYRVTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPL
IGTQSTAI PAFTDLKFTQVTPTSLSAQWTPPNVQLTGYRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDS
SSVVVSGLMVATKYEVSVYALKDTLTSRPAQGVVTTLENVRSRHHHHH
```

50

**[00110]** La secuencia de nucleótidos del antígeno (11A12) (SEQ ID NO: 121) es la siguiente:

```

atgagatcctaccgaacagaaattgacaaaccatcccagatgcaagtgaccgatgttcaggacaaca
gcattagtgtcaagtggtgccttcaagttccctgttactggttacagagtaaccaccactcccaa
aaatggaccaggaccaacaaaaactaaaactgcaggtccagatcaaacagaaatgactattgaaggc
ttgcagcccacagtgagtgatgtgggttagtgtctatgctcagaatccaagcggagagagtcagcctc

ttccatcaaaattgcttgggaaagccccacaggggcaagttccaggtacaggggtgacctactcgagc
cctgaggatggaatccatgagctattccctgcacctgatgggtgaagaagacactgcagagctgcaag
gcctcagaccgggttctgagtacacagtcagtggtggttgccttgccagatgatatggagagccagcc
cctgattggaaccagtcacagctattccctgcaccaactgacctgaagttcaactcaggtcacacc
acaagcctgagcgcgccagtgagacaccacccaatgttcagctcactggatategagtgccgggtgacc
ccaaggagaagaccggaccaatgaaagaaatcaaccttgctcctgacagctcatccgtgggtgtatc
aggacttatgggtggccaccaaatatgaagtgagtgctctatgctcttaaggacactttgacaagcaga
ccagctcagggagttgtcaccactctggagaatgtcagatctcatcaccatcaccatcactaa

```

[00111] La secuencia de nucleótidos del antígeno se amplificó por PCR con cebadores que contenían sitios de restricción para *Bam*HI y *Bgl*II en los extremos 5' y 3', respectivamente. El producto de PCR resultante y el vector pQE12 (QIAGEN) se digirieron con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Bgl*II y después se ligaron en una reacción que contenía una razón inserto/vector de 3:1. El vector resultante se secuenció para comprobar que la secuencia era correcta.

10 [00112] El antígeno se preparó de la manera siguiente:

[00113] Un precultivo electrocompetente de células TG1 en 10 ml de 2TY, Amp, glucosa al 1%, se sometió a electroporación en presencia de 1 µl de una minipreparación de ADN de 11A12. Después, el precultivo se diluyó 1:100 (8 ml en 800 ml de 2YT, Amp, glucosa al 0,1%) y se incubó hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,4-0,6 y entonces se indujo con IPTG durante la noche. Al día siguiente, las células se sedimentaron por centrifugación y el sobrenadante se filtró (Millipore 0,22 µm). Después de la centrifugación y clarificación del cultivo, 11A12 se purificó mediante una columna Hitrap en un sistema de FPLC. La columna de Ni se regeneró de la manera siguiente: la columna se lavó con cinco volúmenes de la columna (VC) de H<sub>2</sub>O, y a continuación se aplicaron 3 VC de EDTA 0,5 M, Tris 0,2 M, pH 8, para lixiviar de la columna el níquel antiguo. A esto siguió un lavado de la columna con 5 VC de H<sub>2</sub>O. La columna se recargó después con 2 VC de NiSO<sub>4</sub> 100 mM, a lo que siguió un lavado de la columna con varios VC de H<sub>2</sub>O. Después, la columna se equilibró con 5 VC de tampón de lisis (imidazol 20 mM, NaCl 250 mM, PBS, pH 7,4). El lisado celular se filtró (Millipore 0,45 µm) y se cargó en la columna (manualmente). La columna se puso de nuevo en el sistema de FPLC y el tampón de lisis se dejó fluir hasta que la señal UV fue estable (constante), aproximadamente 3 VC. Entonces se inició el programa de elución: un gradiente del 0% al 100% del tampón de elución (imidazol 400 mM, NaCl 250 mM, PBS, pH 7,4) en 5 VC. Las fracciones que contenían el antígeno eluido se reunieron y se dializaron en PBS durante la noche.

*Expresión y purificación de los anticuerpos dirigidos contra ED-A*

[00114] Los anticuerpos dirigidos contra ED-A se expresaron y purificaron de la manera siguiente: un precultivo electrocompetente de células TG1 en 10 ml de 2TY, Amp, glucosa al 1%, se sometió a electroporación en presencia de 1 µl de una minipreparación de ADN de uno de los anticuerpos dirigidos contra ED-A. Después, el precultivo se diluyó 1:100 (8 ml en 800 ml de 2YT, Amp, glucosa al 0,1%) y se incubó hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,4-0,6 y entonces se indujo con IPTG durante la noche. Al día siguiente, las células se sedimentaron por centrifugación y el sobrenadante se filtró (Millipore 0,22 µm). Los scFv se purificaron en una columna de proteína A-sefarosa, usando trietilamina para eluir las fracciones de scFv de la columna. Las fracciones que contenían los scFv eluidos se dializaron en PBS durante la noche a 4°C. Después, las fracciones de scFv se cargaron en una columna Superdex 75 con un flujo de PBS de 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 0,25 ml. Las fracciones monoméricas se usaron para el análisis BIAcore.

40 *Análisis BIAcore 1*

[00115] El chip BIAcore se sometió durante la noche a un flujo de 5 µl/min del tampón HBS-EP de BIACORE, Hepes 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005% (el mismo tampón usado en el ensayo). El antígeno (11A12) se diluyó hasta una concentración de 50 µg/ml en tampón de acetato (pH 4,0) y los

grupos COOH del chip se activaron por la inyección de 50 µl de una mezcla de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y etil-*N*-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Un volumen de 40 µl del antígeno 11A12 se inyectó sobre el chip y los grupos COOH libres residuales se bloquearon con 30 µl de etanolamina. Después de una filtración a través de un filtro de 0,22 µm, se inyectaron sobre el chip 20 µl de cada sobrenadante bacteriano individual y la interacción con el antígeno se monitorizó en tiempo real.

*Análisis BIAcore 2*

**[00116]** Las constantes  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  y  $K_D$  del anticuerpo parental dirigido contra ED-A y los anticuerpos B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 dirigidos contra ED-A se evaluaron mediante resonancia de plasma superficial. El chip se equilibró durante la noche con el mismo tampón usado durante el ensayo con una tasa de flujo de dicho tampón de 5 µl/min. Todo el procedimiento de recubrimiento se llevó a cabo con esta tasa de flujo. El antígeno 11A12 se diluyó 1:25 con tampón de acetato pH 4,00 (proporcionado por BIACORE) hasta una concentración final de 20 µg/ml. Después se mezclaron NHS y EDC y se inyectaron 50 µl para activar los grupos COOH en el chip CM5. A continuación se inyectaron 40 µl del antígeno (esto dura aproximadamente 40 s). Después se inyectaron 30 µl de etanolamina para bloquear la reactividad de los posibles grupos COOH libres.

**[00117]** Todos los ejemplos se ensayaron con una tasa de flujo de 20 µl/min. Se inyectaron 20 µl de la proteína monomérica sin diluir (según se obtiene de la filtración en gel). La disociación se dejó proceder durante aproximadamente 200 s. Después se inyectaron 10 µl de HCl 10 mM para regenerar el chip. La inyección de la proteína monomérica se repitió con diluciones diferentes, es decir, dilución 1:2 (en PBS), seguida de la regeneración con HCl. A continuación se llevó a cabo una tercera inyección de la proteína, a una dilución 1:4, seguida de nuevo por una regeneración con HCl. Los valores de  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  y  $K_D$  para cada anticuerpo dirigido contra ED-A se evaluaron con el software de evaluación BIAevaluation.

*Histoquímica*

**[00118]** Con el fin de verificar una satisfactoria biotinylación *in vivo*, se llevó a cabo una tinción posterior de las estructuras biotiniladas según se describe en Rybak y col. 2005. Se cortaron secciones (10 µm) de muestras congeladas en fresco, se fijaron con acetona, se incubaron sucesivamente con un complejo de estreptavidina y fosfatasa alcalina biotinilada (Biospa, Milán, Italia) y con Fast-Red TR (Sigma) (en presencia de levamisol 1mM para inhibir la fosfatasa alcalina endógena) y se tiñeron con una disolución de hematoxilina (Sigma) como contraste.

**[00119]** La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos scFv, que contenían un marcador FLAG, se llevó a cabo según se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, Brack y col. 2006). Brevemente, se incubaron las secciones con los fragmentos scFv (concentración final 2-10 µg/ml) y con el anticuerpo monoclonal M2 dirigido contra FLAG. Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo de conejo dirigido contra inmunoglobulina de ratón (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) seguido del complejo de anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra fosfatasa alcalina y fosfatasa alcalina (DakoCytomation). Como sustrato de la fosfatasa se usó Fast Red (Sigma) y las secciones se tiñeron con hematoxilina (Sigma) como contraste.

**[00120]** Todas las secciones se montaron con Glycergel (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) y se analizaron con un microscopio Axiovert S100 TV (Carl Zeiss, Feldbach, Suiza) mediante el software Axiovision (Carl Zeiss).

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

**[00121]** El anticuerpo parental scFv dirigido contra ED-A se marcó con el derivado fluoróforo infrarrojo éster de succinimidilo de ácido carboxílico, Alexa Fluor 750, disponible comercialmente (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del proveedor. El anticuerpo marcado se separó del colorante sin reaccionar por filtración en gel mediante una columna PD-10 (GE Healthcare). El grado de marcado, estimado de acuerdo con el protocolo de marcado de Invitrogen, fue de cinco moléculas de colorante por molécula de anticuerpo. El anticuerpo parental scFv dirigido contra ED-A marcado con Alexa 750 (en una concentración final de 0,3 mg/ml) se inyectó (200 µl/ratón, es decir, 60 µg de anticuerpo por ratón) en la vena de la cola de ratones Sv190, tres semanas después de la inyección de células tumorales F9DR. Los órganos de los ratones se extirparon seis horas después de la inyección del anticuerpo marcado y se obtuvieron imágenes con un aparato de obtención de imágenes de fluorescencia infrarroja de fabricación propia (Birchler y col. 1999) equipado con una lámpara halógena de tungsteno, filtros de excitación y emisión específicos para Alexa 750 y una cámara CCD monocroma.

*Biodistribución del diacuerpo F8*

**[00122]** El diacuerpo F8 comprende los mismos dominios VH y VL que el anticuerpo F8 dirigido contra ED-A, por ejemplo, según se emplea en formato scFv. El diacuerpo F8 y el anticuerpo scFv F8 dirigido contra ED-A tienen diferentes secuencias enlazantes entre los dominios VH y VL. La secuencia de aminoácidos del enlazante del diacuerpo F8 es GSSGG (SEQ ID NO: 28) (secuencia de nucleótidos: gggctccagtagcggg (SEQ ID NO: 29)). Por lo tanto, la secuencia enlazante del diacuerpo F8 tiene una longitud de cinco aminoácidos, mientras que en el scFv F8

dirigido contra ED-A, el enlazante tiene una longitud de 20 aminoácidos (véase SEQ ID NO: 11). La reducción de la longitud del enlazante entre los dominios VL y VH significa que se favorece el apareamiento intermolecular, más que intramolecular entre los dominios VL y VH. En consecuencia, es más probable el apareamiento del dominio VL de un polipéptido F8 con el dominio VH de otro polipéptido F8, que el apareamiento con el dominio VH del mismo

5 polipéptido F8.

**[00123]** El diacuerpo F8 se expresó en células TG1 de *E. coli* de la manera siguiente: el ADN codificante del diacuerpo F8 se introdujo en células TG1 de *E. coli* por electroporación. Las células de *E. coli* electroporadas se precultivaron en 10 ml de medio 2YT, Amp, glucosa al 1%. El precultivo se diluyó 1:100 en 800 ml de medio 2YT, 10 Amp, glucosa al 0,1% y el cultivo se incubó hasta alcanzar una densidad ( $DO_{600}$ ) de 0,6. La expresión del diacuerpo F8 se indujo entonces con IPTG 1 mM.

**[00124]** El diacuerpo F8 expresado se marcó con  $^{125}I$  de la manera siguiente: a un tubo de Iodogen (recubierto con 50  $\mu$ l de Iodogen, 0,1 mg/ml en cloroformo) se añadieron 10  $\mu$ l de PBS estéril, a lo que siguió la adición de 2  $\mu$ l 15 de  $^{125}I$  yoduro de sodio (~200  $\mu$ Ci) y una incubación a temperatura ambiente (TA) durante 5 min.

**[00125]** Después se añadieron al tubo de Iodogen 400  $\mu$ l del diacuerpo F8 a una DO de 0,2 (~60  $\mu$ g) y se incubó a TA durante 25 min. Se recogió 1/100 de esta mezcla para medir la radiactividad contenida en la mezcla (denominada "INPUT"). El diacuerpo F8 marcado se cargó después en una columna cromatográfica de exclusión por 20 tamaños (PD10: Sephadex G-25M, GE Healthcare) con el fin de separar el diacuerpo yodado F8 del yodo libre. Se midió la radiactividad del diacuerpo F8 yodado recogido y el porcentaje de yodo incorporado en el diacuerpo F8 se calculó (CPM (cuentas por minuto) de diacuerpo F8 yodado / CPM INPUT) como del 30-40%.

**[00126]** Cuatro ratones con tumores de células F9 se pusieron en lugol durante dos días (600  $\mu$ l en 300 ml) con 25 el fin de bloquear la tiroides y a cada uno de los ratones se les inyectaron por vía intravenosa 200  $\mu$ l del diacuerpo F8 yodado (aproximadamente 5-8  $\mu$ g de diacuerpo F8 yodado (18  $\mu$ Ci) por ratón). Después de 24 horas, los ratones se sacrificaron y se extirparon tumores, hígado, pulmón, bazo, riñones, intestino y cola y se extrajo la sangre (denominados colectivamente en este documento en este contexto como "tejidos" de ratón) y se usaron para el conteo radiactivo. El nivel de radiactividad en cada muestra de tejido se midió mediante un contador de rayos y 30 Perkin. El resultado ("output") se calculó por división del porcentaje de la dosis inyectada (en CPM) entre el peso del tejido (en gramos) (% DI/g).

## **RESULTADOS**

### 35 *Identificación de proteínas y variantes de corte y empalme expresadas diferencialmente*

**[00127]** La metodología química proteómica a base de perfusión usada para el análisis comparativo de las proteínas accesibles en el hígado y en metástasis de células F9 en el hígado (Terrana y col. 1987) se muestra en la figura 1A. Estos tumores desarrollan grandes focos metastásicos en la superficie y el interior del hígado de ratón 40 (Figura 1B). Los ratones con tumores se perfundieron, con anestesia terminal, con 15 ml de una disolución de 6-[biotinamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo 1,8 mM (1 mg/ml) en PBS, pH 7,4, enriquecida con dextrano-40 al 10%, como expansor de plasma. El procedimiento, que típicamente duró diez minutos, permitió la eliminación de la sangre de todos los órganos de la circulación principal y la biotilación selectiva de las proteínas accesibles en los lados tanto luminal como abluminal de los vasos sanguíneos. Prácticamente, todos los vasos sanguíneos de las 45 metástasis de células F9 en el hígado se marcaron eficaz y selectivamente con este procedimiento, según confirma la tinción inmunohistoquímica con un conjugado de estreptavidina y fosfatasa alcalina (figura 1C). En el hígado normal, los vasos sanguíneos se tiñeron intensamente, pero también se detectó el marcado de algunos sinusoides, lo que es compatible con la función fisiológica de filtro del hígado (figura 1C). La biotilación *in vivo* se detuvo por perfusión con una disolución que contenía aminos primarias. Posteriormente, se extirparon muestras de las 50 metástasis del hígado, que se homogeneizaron y se usaron para la recuperación de proteínas biotiladas en presencia del fuerte detergente SDS por cromatografía de afinidad en resina con estreptavidina (figura 1A). Con el fin de minimizar el riesgo de difusión de las proteínas metastásicas en el hígado del huésped, se usó el hígado de ratones sanos biotilados *in vivo* para el estudio de la vasculatura del hígado normal. El uso del hígado del huésped de ratones con tumores de células F9 también habría sido problemático debido al poco tejido residual sano y porque 55 habría sido difícil excluir macroscópicamente la ausencia de micrometástasis. En total, para el análisis proteómico se usaron muestras de siete ratones sanos biotilados *in vivo* y nueve ratones con tumores de células F9 biotilados *in vivo*. Además, se usaron muestras de dos ratones sanos y tres con metástasis no biotilados como controles negativos. Mediante procedimientos de lavado restrictivo y digestión trípica sobre resina de las proteínas capturadas por estreptavidina de metástasis de células F9 y de hígado normal (procesados en paralelo) se obtuvo una colección 60 de péptidos que pudieron separarse, identificarse y compararse mediante nano-HPLC y procedimientos de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Roesli y col. 2006).

**[00128]** En total, se identificaron 1.291 péptidos diferentes (intervalo de confianza de MASCOT > 95%) que fueron agrupados por el software MASCOT en 480 conjuntos de péptidos diferentes. Algunos de estos conjuntos de 65 péptidos también se encontraron en las muestras de los controles negativos de los ratones sin biotilinar (como carboxilasas que contienen biotina endógena como cofactor, queratinas como contaminantes o proteínas muy

abundantes como seroalbúmina). De los restantes 435 conjuntos de péptidos identificados, 331 pudieron ser asignados por el software MASCOT sin ambigüedad a una única proteína, mientras que 104 conjuntos de péptidos se asignaron a varias proteínas (358 en total). En la mayoría de los casos, las varias proteínas asignadas al mismo conjunto de péptidos pertenecen a una familia de proteínas relacionadas (por ejemplo, inmunoglobulinas) o pueden ser incluso las mismas proteínas con diferentes números de acceso en las bases de datos. De los 435 conjuntos de péptidos diferentes, 117 se encontraron exclusivamente en muestras de metástasis, 193 solo en muestras de hígado sano y 125 en los dos tipos de tejidos. Por ejemplo, se encontraron péptidos que corresponden a la fibronectina (Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), número de acceso P11276) en cuatro muestras de hígado sano y ocho muestras de metástasis.

10

**[00129]** Las proteínas encontradas en las muestras de hígado sano y en las de metástasis (por ejemplo, fibronectina) pueden estar presentes en cantidades sustancialmente diferentes en las dos muestras. Si este fuera el caso, debería reflejarse en el número de muestras en que se detectaron las proteínas y/o en el número de péptidos (así como en la intensidad de la señal de los péptidos normalizada (Scheurer y col. 2005) observado en las muestras de hígado y de metástasis. Por ejemplo, 38 péptidos tripticos de fibronectina (NCBI, número de acceso P11276) se encontraron solo en muestras de metástasis, mientras que un péptido se encontró solo en las muestras de hígado sano. Once péptidos se encontraron en los dos tipos de muestras.

15

**[00130]** La notable abundancia de péptidos derivados de fibronectina detectados en las metástasis del hígado, a pesar del hecho de que el hígado es el lugar de biosíntesis de la fibronectina, nos impulsó a investigar diferencias en la abundancia relativa de los péptidos derivados de la fibronectina y la expresión en exceso de los dominios de corte y empalme alternativo. La tabla 1 resume todos los péptidos de fibronectina identificados en el análisis proteómico. La fibronectina de ratón contiene dos dominios globulares extra del tipo III que pueden experimentar un corte y empalme alternativo: ED-A y ED-B (French-Constant 1995, Hynes 1990, Kaspar y col. 2006). Además, el segmento IIIICS experimenta distintos patrones de corte y empalme en ratones y en humanos. De manera interesante, los tres péptidos derivados de ED-A, así como el péptido derivado de IICS se observaron solo en las muestras tumorales.

20

25

**[00131]** Los péptidos derivados de ED-B no serían visibles en este análisis, ya que ED-B no contiene ningún resto de lisina y las dos argininas dan lugar a péptidos de un tamaño demasiado grande para su detección. La figura 2A muestra la localización de los péptidos identificados en las muestras tumorales (tumor) y en muestras de hígado sano (normal) en la estructura de dominios de la fibronectina. La figura 2B muestra la intensidad relativa de las señales de EM normalizadas para dos péptidos derivados de la fibronectina: IAWESPQQVSR (SEQ ID NO: 16), que se localiza dentro del dominio ED-A y FLTTTPNSLLVSWQAPR (SEQ ID NO: 15), que se localiza en el dominio ED-B. Este último péptido fue más abundante en las muestras de metástasis, pero fue claramente detectable también en el hígado sano correspondiente. En contraste, los péptidos derivados de ED-A mostraron señales intensas en las muestras de metástasis, pero no fueron detectables en absoluto (es decir, una señal más de 100 veces inferior) en el hígado normal.

30

35

#### 40 *Inmunohistoquímica*

**[00132]** La diferenciación más notable entre las estructuras hepáticas y la neovasculatura metastásica se observó para los dominios ED-A y ED-B de la fibronectina. En ambos casos se observó una tinción intensa y específica de los vasos sanguíneos metastásicos, mientras que el hígado normal y prácticamente todos los órganos normales (con excepción del endometrio en la fase proliferativa y algunos vasos de los ovarios) dieron resultado negativo en este análisis inmunohistoquímico (figura 3A). De manera importante, también se encontró que el ED-A se expresaba en gran medida en la neovasculatura de metástasis en el pulmón y en el hígado humanos (figura ml).

45

#### *Reconocimiento in vivo*

50

**[00133]** Con el fin de comprobar la utilidad de ED-A como diana para el reconocimiento vascular específico de metástasis basado en ligandos, se llevó a cabo un experimento de reconocimiento específico *in vivo* con la obtención de imágenes fluorescentes en el infrarrojo cercano. El anticuerpo parental scFv dirigido contra ED-A se marcó con Alexa Fluor 750 y se inyectó por vía intravenosa en ratones con metástasis de células F9. La obtención de imágenes fluorescentes en el infrarrojo cercano de los órganos extirpados reveló una notable acumulación del agente de reconocimiento en las lesiones metastásicas (figura 3B).

55

#### *Selección de anticuerpos dirigidos contra ED-A*

#### 60 *Análisis BIAcore 1*

**[00134]** El análisis BIAcore produjo un gráfico para cada anticuerpo dirigido contra ED-A que se analizó para deducir la afinidad de un anticuerpo por el antígeno de la manera siguiente: el eje x de cada gráfico corresponde al tiempo y el eje y corresponde a las unidades de resonancia (una medida que indica la afinidad de unión del anticuerpo ensayado por el antígeno que recubre el chip BIAcore). Cada uno de los gráficos mostró 3 picos y una depresión, correspondientes a los cambios de tampón y por lo tanto irrelevantes para la interpretación de los

65

resultados.

**[00135]** La parte ascendente de cada gráfico representa la fase de asociación. Cuanto más empinada es la curva en esta parte del gráfico, más rápida es la asociación del anticuerpo con el antígeno. La parte descendente de cada gráfico representa la fase de disociación del anticuerpo del antígeno. Cuanto más plana es la curva en esta parte del gráfico, más lenta es la disociación del anticuerpo del antígeno.

**[00136]** Los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 dirigidos contra ED-A mostraron todos una curva de disociación más plana que el anticuerpo parental dirigido contra ED-A del que derivan, lo que indica que se unen a ED-A, y por tanto, también a la A-FN, con una mayor afinidad que el anticuerpo parental dirigido contra ED-A. Los gráficos para los anticuerpos E5, F1, F8 y H1 mostraron las curvas de disociación más planas de todos los anticuerpos dirigidos contra ED-A ensayados. Las curvas de asociación de los anticuerpos H1, C5, D5, E5, C8, F8 y F1 fueron más planas que las observadas para el anticuerpo parental dirigido contra ED-A, mientras que la curva de asociación observada para los anticuerpos B2, B7, E8 y G9 fue tan empinada como la curva de asociación observada para el anticuerpo parental dirigido contra ED-A. Sin embargo, dado que para el análisis BIAcore de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 se usaron sobrenadantes bacterianos de células TG-1 de *E. coli* inducidas por IPTG, la concentración de las muestras de anticuerpo ensayadas era desconocida, aunque probablemente inferior a la concentración de la muestra del anticuerpo parental dirigido contra ED-A usada como comparación. En consecuencia, las curvas de asociación de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 pueden ser artificialmente bajas, debido a la baja concentración de anticuerpo en las muestras usadas para el análisis BIAcore. Sin embargo, dado que la concentración no afecta significativamente a la disociación de un anticuerpo de su antígeno diana en el análisis BIAcore, las curvas de disociación planas observadas para los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 muestran que estos anticuerpos se unen a ED-A con una afinidad al menos igual, y probablemente mayor, que el anticuerpo parental dirigido contra ED-A. Por consiguiente, es más que probable que los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 dirigidos contra ED-A produzcan los mismos o mejores resultados al usarlos en los mismos estudios *in vivo* e inmunohistoquímicos llevados a cabo con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A según se describen en otra parte de este documento. Por lo tanto, los datos *in vivo* e inmunohistoquímicos obtenidos con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A proporcionan evidencia de que los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 dirigidos contra ED-A pueden usarse para el tratamiento de metástasis tumorales.

Análisis BIAcore 2

**[00137]** Los valores de  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  y  $K_D$  para cada anticuerpo dirigido contra ED-A se evaluaron mediante el software BIAevaluation. Los valores de  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  y  $K_D$  del anticuerpo parental dirigido contra ED-A y de los anticuerpos B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 dirigidos contra ED-A para el antígeno 11A12 se detallan en la tabla 3. Los anticuerpos B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 dirigidos contra ED-A tiene todos mejores valores de  $K_D$  para el antígeno 11A12 que el anticuerpo parental dirigido contra ED-A del que derivan, lo que indica que se unen a ED-A, y por tanto a la A-FN con una mayor afinidad que el anticuerpo parental dirigido contra ED-A. Por consiguiente, es más que probable que los anticuerpos B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 dirigidos contra ED-A produzcan los mismos o mejores resultados al usarlos en los mismos estudios *in vivo* e inmunohistoquímicos llevados a cabo con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A según se describen en otra parte de este documento. Por lo tanto, los datos *in vivo* e inmunohistoquímicos obtenidos con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A proporcionan evidencia de que los anticuerpos B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 dirigidos contra ED-A pueden usarse para el tratamiento de metástasis tumorales.

*Biodistribución del diacuerpo F8*

**[00138]** El porcentaje (%) de la dosis inyectada (DI) del diacuerpo F8 marcado con  $^{125}I$  (yodado) detectado por gramo (g) de tejido de ratón fue muy similar para el hígado, pulmón, bazo, corazón, riñón, intestino, cola y sangre y todos, con excepción del riñón, mostraron menos del 2% DI/g (figura 8). Por el contrario, los tumores de células F9 contenían como media aproximadamente cuatro veces más de la DI que cualquiera de los otros tejidos de ratón analizados (figura 8). Esto demuestra que el diacuerpo F8 reconoce específica y selectivamente los tumores de células F9 de ratón. El porcentaje de la DI detectado en los otros tejidos representa muy probablemente una carga de fondo del diacuerpo F8 presente en los ratones o el marcado inespecífico de los otros tejidos de ratón. Según se describe en otra parte de este documento, el experimento de biodistribución se llevó a cabo con cuatro ratones y aunque el porcentaje de la DI detectado por tejido de ratón fue variable (véanse las barras de error en la figura 8), el porcentaje del diacuerpo F8 detectado en los tumores de células F9 fue consistentemente mayor que en cualquiera de los otros tejidos de ratón ensayados.

**[00139]** El estudio de biodistribución se realizó sobre tumores primarios F9 y los resultados indican que los anticuerpos dirigidos contra ED-A reconocen selectivamente el tejido tumoral *in vivo*. Los resultados ofrecen una indicación adicional de que los anticuerpos dirigidos contra ED-A pueden usarse para alcanzar los mismos o mejores resultados al usarlos en los mismos estudios *in vivo* e inmunohistoquímicos llevados a cabo con el anticuerpo parental dirigido contra ED-A según se describen en otra parte de este documento.

*Secuenciación*

- 5 **[00140]** Los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 dirigidos contra ED-A son todos anticuerpos scFv y se secuenciaron mediante procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A se muestra en la figura 6. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A se muestra en la figura 7.
- 10 **[00141]** Las secuencias de nucleótidos preferidas que codifican los dominios VH y/o VL de los anticuerpos B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 dirigidos contra ED-A son idénticas a las secuencias de nucleótidos codificantes de VH y/o VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque las secuencias de nucleótidos que codifican las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) de H1 están sustituidas por las secuencias de nucleótidos que codifican las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) indicadas en la tabla 2, para el anticuerpo respectivo.
- 15 **[00142]** Algunas secuencias de nucleótidos preferidas que codifican los dominios VH y/o VL del diacuerpo F8 dirigido contra ED-A son idénticas a las secuencias de nucleótidos que codifican los dominios VH y/o VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque las secuencias de nucleótidos que codifican las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) de H1 están sustituidas por las secuencias de nucleótidos que codifican las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) indicadas en la tabla 2 para el diacuerpo F8 dirigido contra ED-A.
- 20 Una secuencia de nucleótidos preferida que codifica el enlazante que enlaza los dominios VH y VL del diacuerpo F8 dirigido contra ED-A es ggtccagtgccgt (SEQ ID NO: 29).
- [00143]** Los anticuerpos B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 tienen secuencias de aminoácidos idénticas a la del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) de H1 están sustituidas por las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) indicadas en la tabla 2, para el anticuerpo respectivo. Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL del diacuerpo F8 dirigido contra ED-A son idénticas a las secuencias de aminoácidos del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) de H1 están sustituidas por las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) indicadas en la tabla 2 para el diacuerpo F8 dirigido contra ED-A y la secuencia de aminoácidos del enlazante en H1 está sustituida por la secuencia de aminoácidos enlazante GSSGG (SEQ ID NO: 28).
- 25 La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo B2 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 21) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 23.
- 30 **[00144]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo C5 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 41) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 43.
- 40 **[00145]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo D5 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 51) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 53.
- 45 **[00146]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo E5 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 61) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 63.
- [00147]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo C8 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 71) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 73.
- 50 **[00148]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo F8 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 81) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 83. Los dominios VH del diacuerpo F8 dirigido contra ED-A tienen la misma secuencia de aminoácidos que el dominio VH del anticuerpo scFv F8 dirigido contra ED-A (es decir, SEQ ID NO: 81).
- 55 **[00149]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo F1 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 91) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 93.
- 60 **[00150]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo B7 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 101) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 103.
- 65

- [00151]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo E8 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 111) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 113.
- 5 **[00152]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo G9 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 31) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VH de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 33.
- [00153]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo B2 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 22)  
10 es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 26.
- [00154]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo C5 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 42)  
15 es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 46.
- [00155]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo D5 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 52)  
20 es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 56.
- [00156]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo E5 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 62)  
es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 66.
- 25 **[00157]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo C8 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 72) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 76.
- [00158]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo F8 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 82)  
30 es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 86. Los dominios VL del diacuerpo F8 dirigido contra ED-A tienen la misma secuencia de aminoácidos que el dominio VL del anticuerpo F8 dirigido contra ED-A (es decir, SEQ ID NO: 82).
- 35 **[00159]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo F1 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 92) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 96.
- [00160]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo B7 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 102)  
40 es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 106.
- [00161]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo E8 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 112)  
45 es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 116.
- [00162]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo G9 dirigido contra ED-A (SEQ ID NO: 32)  
50 es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A, excepto porque la CDR1 del VL de H1 está sustituida por SEQ ID NO: 36.
- [00163]** Opcionalmente, el aminoácido en la posición 5 del dominio VH de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 dirigidos contra ED-A puede ser un resto de leucina (L), más bien que un resto de valina (V), según se muestra en la figura 7A. Además o alternativamente, el aminoácido en la posición 18 del dominio VL de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 puede ser un resto de arginina (R), más bien que un resto  
55 de lisina (K), según se muestra en la figura 7C.

## **REFERENCIAS**

- [00164]**  
60 Amit y col. (1986), Science, 233: 747-753.  
Andersen y col. (2002) Current Opinion in Biotechnology, 13: 117.  
Ausubel y col. (1999) 4ª edición, Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons.
- 65 Bagshawe K. D. y col. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals, 4: 915-922.  
Balza y col. (1988), FEBS Lett., 228: 42-44.

- Birchler y col. (1999), *J. Immunol. Methods*, 231: 239-248.  
 Bird y col. (1988) *Science*, 242: 423-426.  
 Borsi y col. (1987), *J. Cell. Biol.*, 104, 595-600.  
 Borsi y col. (1990), *FEBS Lett.*, 261: 175-178.  
 5 Borsi y col. (1995), *J. Biol.Chem.*, 270: 6243-6245.  
 Borsi y col. (1998), *Exp. Cell Res.*, 240: 244-251.  
 Brack y col. (2006), *Clin. Cancer Res.*, 12: 3200-3208.  
 Carnemolla y col. (1989), *J. Cell. Biol.*, 108: 1139-1148.  
 Caton y col. (1990), *J. Immunol.*, 144: 1965-1968.  
 10 Chadd y col. (2001), *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 188-194.  
 Chothia y col. (1987), *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917.  
 Chothia y col. (1989), *Nature*, 342: 877- 883.  
 Devos y col. (1983), *Nucl. Acids Res.*, 11: 4307-4323.  
 ffrench-Constant (1995), *Exp. Cell Res.*, 221: 261-271.  
 15 Giovannoni (2001), *Nucleic Acids Research*, 29(5): E27.  
 Glennie M. J. y col., (1987), *J. Immunol.*, 139: 2367-2375  
 Haan y col. (2004), *BioCentury*, 12(5): A1-A6.  
 Hanahan y col. (2000), *Cell*, 100: 57-70.  
 Harlow y Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.,  
 20 pág. 726.  
 Kornblihtt y col. (1984), *Nucleic Acids Res.*, 12: 5853-5868.  
 Heikinheimo y col. (1991), *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, 61: 101-109.  
 Holliger y Bohlen (1999), *Cancer and metastasis rev.*, 18: 411-419.  
 Holliger y col. (1993a), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448.  
 25 Holliger y col. (1993b), *Current Opinion Biotechnol.*, 4: 446-449.  
 Holt y col. (2003), *Trends in Biotechnology*, 21: 484-490.  
 Hoogenboom y col. (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19(15): 4133-7.  
 Hu y col. (1996), *Cancer Res.*, 56, 3055-3061.  
 Huston y col. (1988), *PNAS USA*, 85: 5879-5883.  
 30 Hynes, R. O. (1990), *Fibronectins* (Nueva York: Springer-Verlag).  
 Jacobs y col. (2002), *Hum. Pathol.*, 33: 29-38.  
 Kabat y col. (1987), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4ª edición. US Department of Health and  
 Human Services.  
 Kabat y col. (1991a), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición. US Department of Health and  
 35 Human Services, Public Service, NIH, Washington. (a)  
 Kabat y col. (1991b), *J. Immunol.*, 147: 1709-1719.  
 Kaspar y col. (2006), *Int. J. Cancer*, 118: 1331-1339.  
 Knappik y col. (2000), *J. Mol. Biol.*, 296: 57-86.  
 Kohler y Milstein, (1975), *Nature*, 256: 495-497.  
 40 Koide y col. (1998), *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151.  
 Kontermann y col. (2001), *S, Antibody Engineering*, Springer-Verlag Nueva York, LLC; ISBN: 3540413545.  
 Koukoulis y col. (1993), *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 25: 285-295.  
 Koukoulis y col. (1995), *Ultrastruct. Pathol.*, 19: 37-43.  
 Krebs y col. (2001), *Journal of Immunological Methods*, 254: 67-84.  
 45 Larrick J. W. y Thomas D. W. (2001), *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 411-418.  
 Ledermann J. A. y col. (1991), *Int. J. Cancer*, 47: 659-664  
 Lohi y col. (1995), *Int. J. Cancer*, 63: 442-449.  
 Maeda y col. (1983), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 115: 1040-1047.  
 Matsumoto y col. (1999), *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 320-325.  
 50 McCafferty y col., (1990), *Nature*, 348: 552-554.  
 Mendez, M. y col., (1997), *Nature Genet*, 15(2): 146-156.  
 Merchand y col. (1998), *Nature Biotech.*, 16: 677-681.  
 Neri D. y Bicknell R. (2005), *Nat. Rev. Cancer*, 5: 436-446.  
 Nygren y col. (1997), *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463-469.  
 55 Oyama y col. (1989), *J. Biol. Chem.*, 264: 10331-10334.  
 Paoletta y col. (1988), *Nucleic Acids Res.* 16: 3545-3557.  
 Pini y col. (1998), *J. Biol. Chem.*, 273 : 21769-21776.  
 Pluckthun (1991), *Bio/Technology* 9: 545-551.  
 Reiter y col. (1996), *Nature Biotech*, 14: 1239-1245.  
 60 Repp y col. (1995), *J. Hemat.*, 377-382.  
 Ridgeway y col. (1996), *Protein Eng.*, 9: 616-621.  
 Robinson ed., (1978), *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York.  
 Roesli y col. (2006), *Nature Protocols*, 1: 192-199.  
 Ruf y col. (1991), *J. Biol. Chem.*, 226: 15719-15725.  
 65 Rybak y col. (2005), *Nat. Methods*, 2: 291-298.  
 Rybak y col. (2006), *ChemMedChem.*, 2: 22-40.

- Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scarpati y col. (1987), Biochemistry 26: 5234-5238.
- Scarpino y col. (1999), J. Pathol., 188: 163-167.
- 5 Scheurer y col. (2005), Proteomics, 5: 3035-3039.
- Segal y col. (1974), PNAS, 71: 4298-4302.
- Sharon y col. (1990a), PNAS, 87: 4814-4817.
- Sharon y col. (1990b), J. Immunol., 144: 4863-4869.
- Silacci y col. (2003), Proteomics, 5: 2340-2350.
- 10 Staerz U. D. y Bevan M. J. (1986), PNAS, 83.
- Suresh y col. (1986), Methods Enzymol. 121: 210-228
- Taniguchi y col. (1983), Nature, 302: 305-310;
- Tavian y col. (1994), Int. J. Cancer, 56: 820-825.
- Terrana y col. (1987), Cancer Res., 47: 3791-3797.
- 15 Thorpe (2004), Clin. Cancer Res., 10: 415-427.
- Trachsel y col. (2006), Adv. Drug Deliv. Rev., 58: 735-754.
- Viti y col. (2000), Methods Enzymol., 326: 480-505.
- Ward y col. (1989), Nature, 341: 544-546.
- Wess (2004), en: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42): A1-A7.
- 20

**Tabla 1**

Péptidos de la fibronectina identificados en hígado normal y/o en metástasis				
Secuencia peptídica	Posición de la secuencia		<sup>1</sup> Hígado (total = 6)	<sup>1</sup> Metástasis (total = 8)
	Inicio	Final		
HYQINQQWER	59	68		6
VGDTYERPK	109	117		4
HALQSASAGSGSFTDVR	274	290		7
IGDQWDK	480	486		1
TFYQIGDSWEK	568	578	1	
WKEATIPGHLNSYTIK	654	669		2
EATIPGHLNSYTIK	656	669		1
GLTPGVIYEGQLISIQQYGHR	670	690		7
WSRPQAPITGYR	830	841	2	3
SDNVPPPTDLQFVELTDVK	903	921		3
VTIMWTPPDSVVSQYR	922	937		8
VEVLPVSLPGEHGQR	938	952		8
NTFAEITGLSPGVTYLTK	958	975		7
VFAVHQGR	976	983		7
TVLVTWTPPR	1011	1020	2	8
QYNVGPLASK	1040	1049		4
NLQPGSEYTVTLVAVK	1054	1069		6
ATGVFTTLQPLR	1077	1088	1	8
LGVRPSQGGAPR	1116	1128		7
VVTPLSPPTNLHLEANPDTGVLTVSWER	1169	1196		3
STTPDITGYR	1197	1206		7
VTNAPPPSIELTNLLVR	1375	1391	2	7
TGLDSPTGFDSSDITANSFTVHWWAPR	1446	1472		4
APITGYIIR	1473	1481	1	8
HHAHESVGRPR	1482	1492		1
EESPPLIGQQATVSDIPR	1525	1542		8
ITYGETGGNSPVQEFTVPGSK	1570	1590	2	8
SPVQEFTVPGSK	1579	1590		6
STATINNIKPGADYTITLYAVTGR	1591	1614		5
GDSPASSKPVSYNYK	1615	1629		4
TEIDKPSQMQVTDVQDNSISVR	1630	1651		8
WLPSTSPVTGYR	1652	1663		7
TASPDQTEMTIEGLQPTVEYVVSVAQNR	1679	1707		7
<sup>2</sup> NGESQPLVQTAVTIIPAPTNLK	1708	1819		3
<sup>3</sup> NGESQPLVQTAVTNIDRPK	1708	1726		1
<sup>3</sup> IAWESPPGQVSR	1740	1751		8
<sup>3</sup> VTYSSPEDGIR	1754	1764		1
FSQVTPTSFTAQWIAPSVQLTGYR	1820	1843	1	5
YEVSVYALK	1878	1886		2
TKTETITGFQVDAIPANGQTPVQR	1926	1949	1	2
TETITGFQVDAIPANGQTPVQR	1928	1949		3

SYTITGLQPGTDYK	1957	1970		7
IHLYTLNDNAR	1971	1981		7
SSPVIDASTAIDAPSNLR	1982	2000	3	8
FLTTTPNSLLVSWQAPR	2001	2017	4	5
ITGYIIK	2020	2026		5
YEKPGSPPR	2027	2035		6
<sup>4</sup> PYLPNVDEEVQIGHVPR	2165	2181		7
GVTYNIIVEALQNQR	2255	2269	4	7
RPGAAEPSPDGTTGHTYNQYTQR	2425	2447		2

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

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

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

<sup>4</sup>Este péptido corresponde a la secuencia del segmento IIICS (posiciones en la secuencia 2082-2201).

**Tabla 2**

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

5

**Tabla 3**

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

**LISTADO DE SECUENCIAS**

10 [00165]

# ES 2 609 813 T3

<110> Philogen S.p.A.;

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

5 <130> TEK/FP6830202

<140> EP

<141> 31-03-2008

10 <150> EP08737486.4

<151> 31-03-2008

<150> PCT/IB2008/000965

<151> 31-03-2008

15

<150> US 60/909.580

<151> 02-04-2007

<150> US 60/948.564

20 <151> 09-04-2007

<160> 193

<170> PatentIn, versión 3.3

25

<210> 1

<211> 118

<212> Proteína

<213> Secuencia artificial

30

<220>

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

35 <400> 1

ES 2 609 813 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Arg  
                   20                    25                    30  
  
 Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45  
  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                    55                    60  
  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65                    70                    75                    80  
  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
  
 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                    105                    110  
  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115

<210> 2

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 2



# ES 2 609 813 T3

<212> Proteína  
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

<400> 4

Ser Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

10

<210> 5

<211> 6

<212> Proteína

15 <213> Secuencia artificial

<220>

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

20

<400> 5

Ser Thr His Leu Tyr Leu

1 5

25 <210> 6

<211> 3

<212> Proteína

<213> Secuencia artificial

30 <220>

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

<400> 6

35

Ser Ala Trp

1

<210> 7

<211> 7

40 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

<400> 7

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

50

<210> 8

<211> 6

<212> Proteína

ES 2 609 813 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 8

Met Arg Gly Arg Pro Pro  
1 5

10

<210> 9

<400> 9  
000

15

<210> 10

<400> 10  
000

20

<210>11  
<211> 20  
<212> Proteína  
<213> Secuencia artificial

25

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

30 <400> 11

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

Gly Gly Gly Ser  
20

<210> 12

35 <211> 354

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia sintética: secuencia de nucleótidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

<400> 12

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttage ccgaggagga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

45

ES 2 609 813 T3

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagtact 300  
 catttgtatc tttttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc gagt 354

- <210> 13
- <211> 387
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética: secuencia de nucleótidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A
- 10 <400> 13

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aaaagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc tctgcgtggt tagcctggta ccagcagaaa 120  
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180  
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240  
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagatgcgtg gtcggccgcc gacgttcggc 300  
 caagggacca aggtggaaat caaagcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat 360  
 ctgaaatgggg ccgcatagac tgtgaaa 387

- 15 <210> 14
- <211> 60
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Secuencia sintética: secuencia de nucleótidos de la secuencia enlazante del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A
- <400> 14
- 25 gccggtggag gttctggcgg cggggcagc ggcggtggag gttccggggg tggaggatct 60
- <210> 15
- <211> 17
- <212> Proteína
- 30 <213> *Mus musculus*
- <400> 15

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

ES 2 609 813 T3

<210> 16  
 <211> 12  
 <212> Proteína  
 5 <213> *Mus musculus*

<400> 16

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

10  
 <210> 17  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 <223> Secuencia sintética: cebador parcialmente degenerado

<220>  
 20 <221> elemento mixto  
 <222> 27, 28, 30, 31, 33, 34  
 <223> n e s a o g o c o t

<400> 17  
 25 ctggagcctg gcggaccag ctcatmnmnm nmngctaaa ggtgaatcca ga 52

<210> 18  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial

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

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

<400> 18  
 40 ccaggtttct gctgttacca ggctaamnm nmngctaa cactctgact ggccctgc 58

<210> 19  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia sintética: cebador LMB3long

50 <400> 19  
 caggaaacag ctatgacat gattac 26

<210> 20  
 <211> 30  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia sintética: cebador fdseqlong

60  
 <400> 20  
 gacgttagta aatgaattt ctgtatgagg 30





Ala Ala Lys

1

<210> 24

5 <400> 24  
000

<210> 25

10 <400> 25  
000

<210> 26

<211> 3

15 <212> Proteína  
<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 26

Val Ala Phe

1

25

<210> 27

<400> 27  
000

30

<210> 28

<211> 5

<212> Proteína

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia enlazante del diacuerpo F8

<400> 28

40

Gly Ser Ser Gly Gly

1

5

<210> 29

<211> 15

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia enlazante del diacuerpo F8

50

<400> 29

gggtccagtg gcggt 15

<210> 30

55

<400> 30

000





**His Met Gln**

**1**

<210> 34

5 <400> 34  
000

<210> 35

10 <400> 35  
000

<210> 36

<211> 3

15 <212> Proteína  
<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo G9 dirigido  
contra ED-A

<400> 36

**Thr Ala Phe**

**1**

25

<210> 37

<400> 37  
000

30

<210> 38

<400> 38  
000

35

<210> 39

<400> 39  
000

40

<210> 40

<400> 40  
000

45

<210> 41

<211> 118

<212> Proteína

<213> Secuencia artificial

50

<220>

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

<400> 41

55



ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 43

<211> 3

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 43

Pro Ile Thr

1

15

<210> 44

# ES 2 609 813 T3

<400> 44  
000

<210> 45

5

<400> 45  
000

<210> 46

10

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

<220>

15 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo C5 dirigido contra ED-A

<400> 46

**Leu His Phe**

**1**

20

<210> 47

<400> 47

25

000

<210> 48

<400> 48

30

000

<210> 49

<400> 49

35

000

<210> 50

<400> 50

40

000

<210> 51

<211> 118

<212> Proteína

45

<213> Secuencia artificial

<220>

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

50

<400> 51





# ES 2 609 813 T3

<400> 54  
000

5 <210> 55

<400> 55  
000

10 <210> 56  
<211> 3  
<212> Proteína  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo D5 dirigido  
contra ED-A

<400> 56  
20

**Asn Ala Phe**

**1**

<210> 57

25 <400> 57  
000

<210> 58

30 <400> 58  
000

<210> 59

35 <400> 59  
000

<210> 60

40 <400> 60  
000

<210> 61  
<211> 118

45 <212> Proteína  
<213> Secuencia artificial

<220>

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

50  
<400> 61



ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 63

<211> 3

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 63

Thr Gly Ser

1

15

<210> 64

# ES 2 609 813 T3

<400> 64  
000

<210> 65

5

<400> 65  
000

<210> 66

10

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

<220>

15 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo E5 dirigido contra ED-A

<400> 66

Leu Ala His

1

20

<210> 67

<400> 67

25

000

<210> 68

<400> 68

30

000

<210> 69

<400> 69

35

000

<210> 70

<400> 70

40

000

<210> 71

<211> 118

<212> Proteína

45

<213> Secuencia artificial

<220>

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

50

<400> 71

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 72

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 72

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 73

<211> 3

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 73

Leu Gln Thr

1

15

<210> 74

<400> 74

000

20

<210> 75

# ES 2 609 813 T3

<400> 75  
000

5 <210> 76  
<211> 3  
<212> Proteína  
<213> Secuencia artificial

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

15 <400> 76

**Leu Pro Phe**

**1**

<210> 77

20 <400> 77  
000

<210> 78

25 <400> 78  
000

<210> 79

30 <400> 79  
000

<210> 80

35 <400> 80  
000

<210> 81  
<211> 118

40 <212> Proteína  
<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo F8 dirigido contra ED-A

<400> 81





# ES 2 609 813 T3

<400> 84  
000

5 <210> 85

<400> 85  
000

10 <210> 86  
<211> 3  
<212> Proteína  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo F8 dirigido  
contra ED-A

<400> 86  
20

**Met Pro Phe**

**1**

<210> 87

25 <400> 87  
000

<210> 88

30 <400> 88  
000

<210> 89

35 <400> 89  
000

<210> 90

40 <400> 90  
000

<210> 91  
<211> 118

45 <212> Proteína  
<213> Secuencia artificial

<220>

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

50 <400> 91

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 92

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 92



# ES 2 609 813 T3

<400> 94  
000

5 <210> 95

<400> 95  
000

10 <210> 96  
<211> 3  
<212> Proteína  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo F1 dirigido  
contra ED-A

<400> 96  
20

**Ala Pro Phe**

**1**

<210> 97

25 <400> 97  
000

<210> 98

30 <400> 98  
000

<210> 99

35 <400> 99  
000

<210> 100

40 <400> 100  
000

<210> 101  
<211> 118

45 <212> Proteína  
<213> Secuencia artificial

<220>

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

50 <400> 101





ES 2 609 813 T3

<400> 104  
000

<210> 105

5

<400> 105  
000

<210> 106

10

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

<220>

15 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo B7 dirigido contra ED-A

<400> 106

**Leu Ala Phe**

20

**1**

<210> 107

<400> 107

25

000

<210> 108

<400> 108

30

000

<210> 109

<400> 109

35

000

<210> 110

<400> 110

40

000

<210> 111

<211> 118

<212> Proteína

45

<213> Secuencia artificial

<220>

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

50

<400> 111







ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 118

<211> 90

5 <212> Proteína

<213> *Homo sapiens*

<400> 118

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

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

10

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

<210> 119

<211> 90

5 <212> Proteína

<213> *Mus musculus*

<400> 119





ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 609 813 T3

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

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

<210> 121

<211> 867

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 121

```

atgagatcct accgaacaga aattgacaaa ccattcccaga tgcaagtgac cgatgttcag      60
gacaacagca ttagtgtaaa gtggctgcct tcaagttccc ctgttactgg ttacagagta      120
accaccactc ccaaaaatgg accaggacca acaaaaacta aaactgcagg tccagatcaa      180
acagaaatga ctattgaagg cttgcagccc acagtggagt atgtggttag tgtctatgct      240
cagaatccaa ggggagagag tcagcctctg gttcagactg cagtaaccaa cattgatcgc      300
cctaaaggac tggcattcac tgatgtggat gtcgattcca tcaaaattgc ttgggaaagc      360
ccacaggggc aagtttccag gtacagggtg acctactcga gccctgagga tggaatccat      420
gagctattcc ctgcacctga tggtaagaa gacactgcag agctgcaagg cctcagaccg      480
ggttctgagt acacagtcag tgtggttgcc ttgcacgatg atatggagag ccagccccctg      540
attggaaccc agtccacagc tattcctgca ccaactgacc tgaagttcac tcaggtcaca      600
cccacaagcc tgagcgccca gtggacacca cccaatgttc agctcactgg atategagtg      660
cgggtgacct ccaaggagaa gaccggacca atgaaagaaa tcaaccttgc tcctgacagc      720
    
```

ES 2 609 813 T3

tcatecgtgg ttgtatcagg acttatgggtg gacaccaa atgaagtgag tgtctatgct 780

cttaaggaca ctttgacaag cagaccagct cagggagttg tcaccactct ggagaatgtc 840

agatctcatt accatcacca tcaactaa 867

<210> 122

<211> 10

5 <212> Proteína

<213> *Mus musculus*

<400> 122

His Tyr Gln Ile Asn Gln Gln Trp Glu Arg

1 5 10

10

<210> 123

<211> 9

<212> Proteína

15 <213> *Mus musculus*

<400> 123

Val Gly Asp Thr Tyr Glu Arg Pro Lys

1 5

20

<210> 124

<211> 17

<212> Proteína

<213> *Mus musculus*

25

<400> 124

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

1 5 10 15

Arg

30 <210> 125

<211> 7

<212> Proteína

<213> *Mus musculus*

35 <400> 125

Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys

1 5

<210> 126

40 <211> 11

<212> Proteína

<213> *Mus musculus*

ES 2 609 813 T3

<400> 126

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

5 <210> 127  
 <211> 16  
 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 127

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

<210> 128  
 15 <211> 14  
 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*

<400> 128  
 20

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

<210> 129  
 <211> 21  
 25 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*

<400> 129

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

Gln Tyr Gly His Arg  
 20

30  
 <210> 130  
 <211> 12  
 <212> Proteína  
 35 <213> *Mus musculus*

<400> 130

Trp Ser Arg Pro Gln Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Arg  
 1 5 10

40  
 <210> 131  
 <211> 19  
 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*  
 45  
 <400> 131

Ser Asp Asn Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Gln Phe Val Glu Leu Thr  
 1 5 10 15

Asp Val Lys

<210> 132  
 <211> 16  
 5 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 132

Val Thr Ile Met Trp Thr Pro Pro Asp Ser Val Val Ser Gly Tyr Arg  
 10 1 5 10 15

<210> 133  
 <211> 15  
 <212> Proteína  
 15 <213> *Mus musculus*  
 <400> 133

Val Glu Val Leu Pro Val Ser Leu Pro Gly Glu His Gly Gln Arg  
 20 1 5 10 15

<210> 134  
 <211> 18  
 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*  
 25 <400> 134

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

Phe Lys

30 <210> 135  
 <211> 8  
 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*  
 35 <400> 135

Val Phe Ala Val His Gln Gly Arg  
 1 5

<210> 136  
 40 <211> 10  
 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*



ES 2 609 813 T3

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

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

<210> 142  
 <211> 10  
 5 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 142

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

<210> 143  
 <211> 17  
 <212> Proteína  
 15 <213> *Mus musculus*  
 <400> 143

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

Arg  
 20  
 <210> 144  
 <211> 27  
 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*  
 25  
 <400> 144

Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Phe Asp Ser Ser Asp Ile Thr Ala  
 1 5 10 15

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

30 <210> 145  
 <211> 9  
 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*  
 35 <400> 145

ES 2 609 813 T3

Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Arg

1 5

<210> 146

<211> 11

5 <212> Proteína

<213> *Mus musculus*

<400> 146

His His Ala Glu His Ser Val Gly Arg Pro Arg

1 5 10

10

<210> 147

<211> 18

<212> Proteína

15 <213> *Mus musculus*

<400> 147

Glu Glu Ser Pro Pro Leu Ile Gly Gln Gln Ala Thr Val Ser Asp Ile

1 5 10 15

Pro Arg

20

<210> 148

<211> 21

<212> Proteína

<213> *Mus musculus*

25

<400> 148

Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr

1 5 10 15

Val Pro Gly Ser Lys

20

30 <210> 149

<211> 12

<212> Proteína

<213> *Mus musculus*

35 <400> 149

Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys

1 5 10

<210> 150

40 <211> 24

ES 2 609 813 T3

<212> Proteína  
<213> *Mus musculus*

<400> 150

5

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

Thr Leu Tyr Ala Val Thr Gly Arg  
20

<210> 151

<211> 15

10 <212> Proteína  
<213> *Mus musculus*

<400> 151

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

15

<210> 152

<211> 22

<212> Proteína

20 <213> *Mus musculus*

<400> 152

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

Asn Ser Ile Ser Val Arg  
20

25

<210> 153

<211> 12

<212> Proteína

<213> *Mus musculus*

30

<400> 153

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

35 <210> 154

<211> 29

<212> Proteína

<213> *Mus musculus*

40 <400> 154

ES 2 609 813 T3

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

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

<210> 155  
<211> 22  
5 <212> Proteína  
<213> *Mus musculus*

<400> 155

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

Ala Pro Thr Asn Leu Lys

20

10

<210> 156  
<211> 19  
<212> Proteína  
15 <213> *Mus musculus*

<400> 156

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

Arg Pro Lys

20

<210> 157  
<211> 12  
<212> Proteína  
<213> *Mus musculus*

25

<400> 157

Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg

1

5

10

30 <210> 158  
<211> 11  
<212> Proteína  
<213> *Mus musculus*

35 <400> 158

ES 2 609 813 T3

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

<210> 159  
 <211> 24  
 5 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 159

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

Ser Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg  
 20

10  
 <210> 160  
 <211> 9  
 <212> Proteína  
 15 <213> *Mus musculus*  
 <400> 160

Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys  
 1 5

20  
 <210> 161  
 <211> 24  
 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*  
 25  
 <400> 161

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

Asn Gly Gln Thr Pro Val Gln Arg  
 20

30 <210> 162  
 <211> 22  
 <212> Proteína  
 <213> *Mus musculus*  
 35 <400> 162

ES 2 609 813 T3

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

Gln Thr Pro Val Gln Arg  
20

<210> 163  
<211> 14  
5 <212> Proteína  
<213> *Mus musculus*  
  
<400> 163

Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys  
10 1 5 10

<210> 164  
<211> 11  
<212> Proteína  
15 <213> *Mus musculus*  
  
<400> 164

Ile His Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg  
20 1 5 10

<210> 165  
<211> 19  
<212> Proteína  
<213> *Mus musculus*  
25  
<400> 165

Ser Ser Pro Val Ile Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser  
1 5 10 15

Asn Leu Arg

30 <210> 166  
<211> 17  
<212> Proteína  
<213> *Mus musculus*  
35 <400> 166

ES 2 609 813 T3

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

Arg

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

Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys  
1 5

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

Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg  
1 5

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

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

Arg

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

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

40 <210> 171  
<211> 23  
<212> Proteína  
<213> *Mus musculus*

ES 2 609 813 T3

<400> 171

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

Tyr Asn Gln Tyr Thr Gln Arg  
20

- 5 <210> 172
- <211> 118
- <212> Proteína
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo H1 dirigido contra ED-A

<400> 172

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 173

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 173

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 174

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 174

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 175

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 175

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 176

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 176

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 177

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 177

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 178

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 178

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 179

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 179

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 180

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 180

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 181

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 181

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 182

<211> 118

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 182

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 183

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 183

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 184

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 184

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 185

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 185

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 186

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 186

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 187

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 187

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 188

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 188

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 189

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 189

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 190

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 190

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 191

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 191

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 192

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 192

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 193

<211> 125

5 <212> Proteína

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 193

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

ES 2 609 813 T3

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

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

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

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

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

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

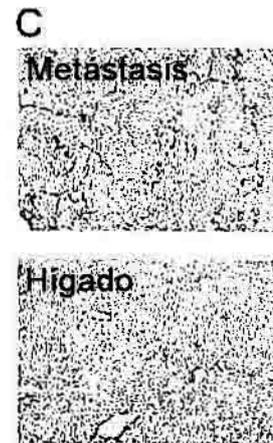
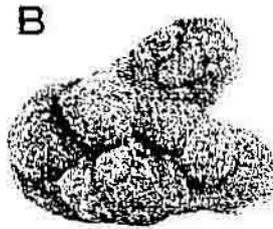
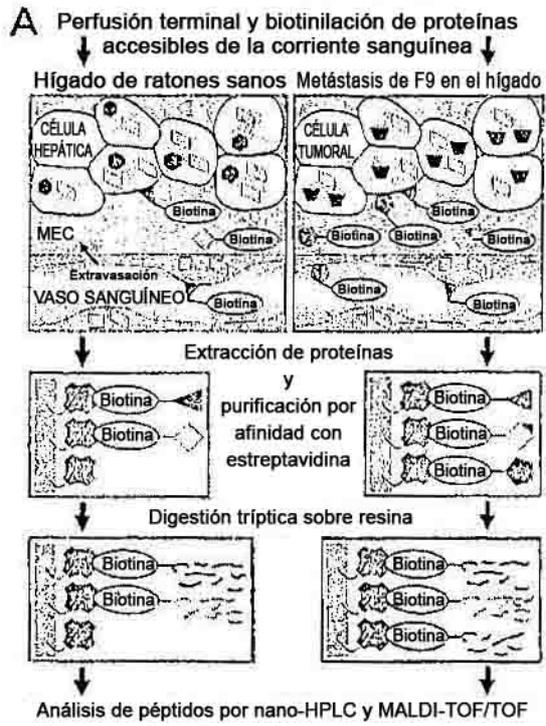
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

## REIVINDICACIONES

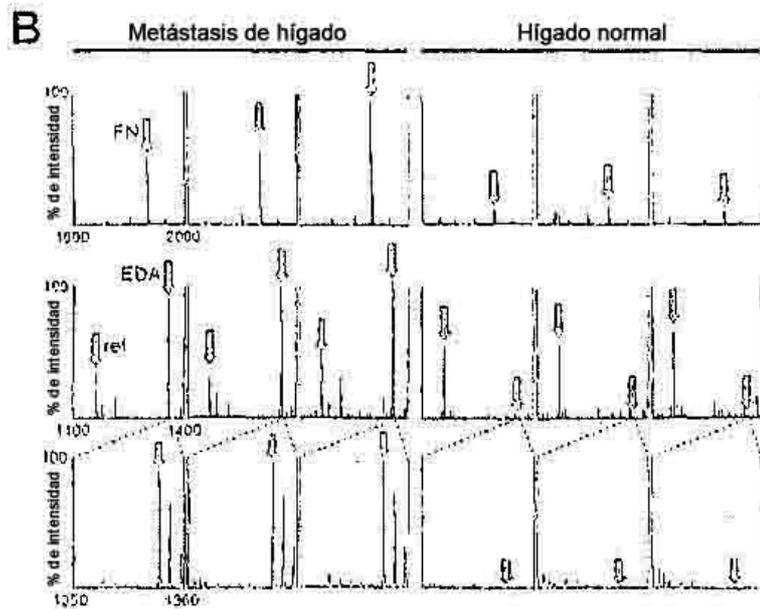
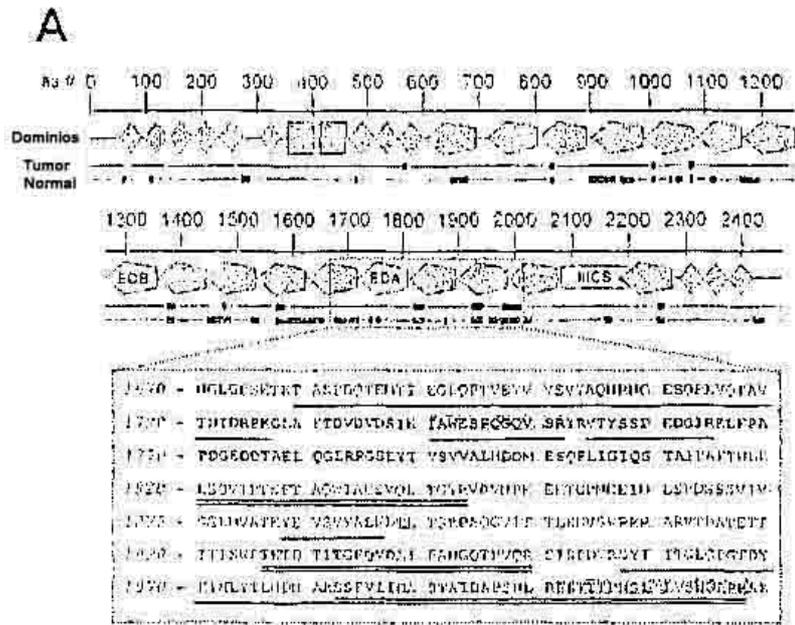
1. Molécula de anticuerpo que se une al Dominio Extra A (ED-A) de la fibronectina, que comprende un dominio VH y un dominio VL, en el que el dominio VH comprende una región estructural y un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 83, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y en el que el dominio VL comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región estructural, en el que LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 86, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8, en el que la molécula de anticuerpo se une al ED-A de la fibronectina con una  $K_D$  inferior a  $1,4 \times 10^{-8}$  M.
2. Molécula de anticuerpo, según la reivindicación 1, en la que la región estructural del dominio VH y la región estructural del dominio VL son regiones estructurales de la línea germinal humana.
3. Molécula de anticuerpo, según la reivindicación 2, en la que la región estructural de la línea germinal humana de dicho dominio VH es DP47 y la región estructural de la línea germinal humana de dicho dominio VL es DPK22.
4. Molécula de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la molécula de anticuerpo comprende el dominio VH mostrado en la SEQ ID NO: 81; o comprende el dominio VH mostrado en la SEQ ID NO: 81, a excepción de que el aminoácido en la posición 5 del dominio VH de la SEQ ID NO: 81, según el sistema Kabat, es un resto de leucina (L) en lugar de un resto de valina (V).
5. Molécula de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la molécula de anticuerpo comprende el dominio VL mostrado en la SEQ ID NO: 82; o comprende el dominio VL mostrado en la SEQ ID NO: 82, a excepción de que el aminoácido en la posición 18 del dominio VL de la SEQ ID NO: 82 es un resto de arginina (R) en lugar de un resto de lisina (K).
6. Molécula de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la molécula de anticuerpo comprende el dominio VH mostrado en la SEQ ID NO: 81, a excepción de que el aminoácido en la posición 5 del dominio VH de la SEQ ID NO: 81 es un resto de leucina (L) en lugar de un resto de valina (V), y comprende, además, el dominio VL mostrado en la SEQ ID NO: 82, a excepción de que el aminoácido en la posición 18 del dominio VL de la SEQ ID NO: 82, según el sistema Kabat, es un resto de arginina (R) en lugar de un resto de lisina (K).
7. Molécula de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la molécula de anticuerpo es un Fv de cadena sencilla o un diacuerpo.
8. Molécula de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el dominio VH y el dominio VL están unidos a través de un enlazante peptídico, y en el que el enlazante tiene 5 o menos aminoácidos de longitud.
9. Molécula de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la molécula de anticuerpo está conjugada con un marcador detectable.
10. Molécula de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la molécula de anticuerpo está conjugada con una molécula que tiene actividad biocida o citotóxica, o con un radioisótopo.
11. Molécula de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 ó 10, en la que la molécula de anticuerpo está conjugada con una citocina.
12. Molécula de anticuerpo, según la reivindicación 11, en la que la molécula de anticuerpo está conjugada con una citocina a través de un enlace peptídico.
13. Molécula de anticuerpo, según la reivindicación 11 ó 12, en la que la molécula de anticuerpo está en forma de una proteína de fusión que comprende la citocina y la molécula de anticuerpo.
14. Molécula de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la molécula de anticuerpo está conjugada con una toxina, una fracción de reconocimiento o una enzima.
15. Molécula de anticuerpo, según la reivindicación 14, en la que la toxina, fracción de reconocimiento o enzima están conjugadas con la molécula de anticuerpo a través de un enlace o enlazante peptídico.
16. Molécula de anticuerpo, según la reivindicación 10, en la que la molécula de anticuerpo está conjugada con la molécula biocida o citotóxica mediante un enlace peptídico.

17. Molécula de anticuerpo, según la reivindicación 10 ó 16, en la que la molécula de anticuerpo está en forma de una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y la molécula de anticuerpo.
- 5 18. Ácido nucleico aislado que codifica una molécula de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
19. Célula huésped que comprende el ácido nucleico, según la reivindicación 18.
20. Procedimiento de producción de una molécula de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17,  
10 comprendiendo el procedimiento el cultivo de una célula huésped, según la reivindicación 19, en las condiciones para la producción, en el que el procedimiento comprende, además, opcionalmente, el aislamiento de dicha molécula de anticuerpo.

Figura 1



# Figura 2



**Figura 3**

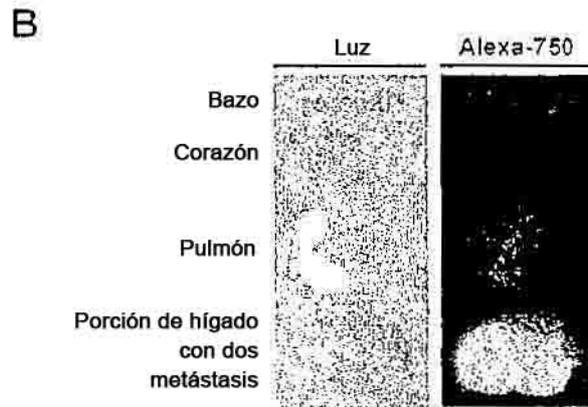
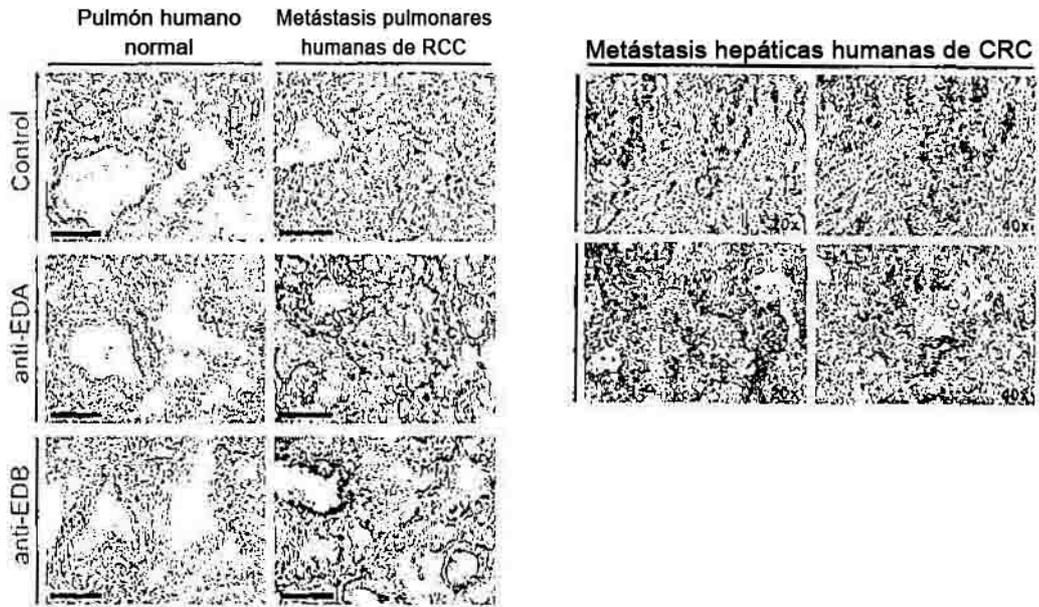


Figura 4



```
humano 1 NIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPOGQVSRVRYTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELO
*****
ratón 1 NIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPOGQVSRVRYTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELO

humano 61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQST
*****
ratón 61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGIQST
```

Figura 5

**A**

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG  
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTT  
TAGCCCGCGGAGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG  
GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCA  
CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG  
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG  
AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA CTGTGCGAAAAGTACTC  
ATTTGTATCTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC  
CGTCTCGAGT

**B**

GGCGGTGGAGGTTCTGGCGGCGGTGGCAGTGGCGGTGGAGGTT  
CCGGGGGTGGAGGATCT

Figura 6

c

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC  
CAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT  
TAGCTCTGCGTGGTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG  
GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG  
GCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT  
CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG  
TATTACTGTCAGCAGATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCC  
AAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGCGGCCGCAGAACAAAACT  
CATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTGAAA

continuación Figura 6

**A**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPRRMSWVRQ  
APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNT  
LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVS  
S

**B**

GGGSGGGGSGGGGSGGGGS

**C**

EIVLTQSPGTL<sup>SL</sup>SPGKATLS<sup>CRASQSVSS</sup>AWLAWYQQ  
KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR  
LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKAAAEQKLIS  
EEDLNGAA

Figura 7

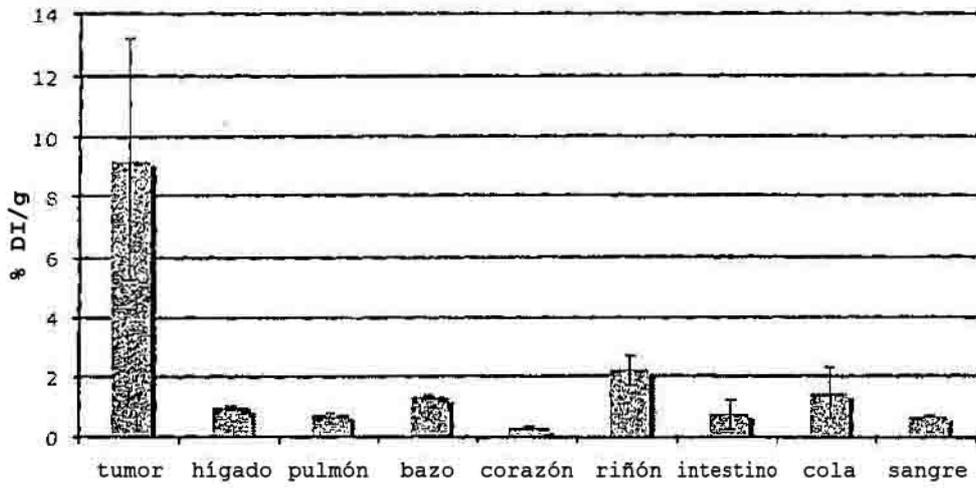


Figura 8