

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 487**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2010 PCT/EP2010/004313**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.02.2011 WO11020529**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2010 E 10749593 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2467401**

54 Título: **Anticuerpos para la detección de complejos de integrina en material FFPE**

30 Prioridad:

19.08.2009 EP 09010666

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

06.07.2017

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**GOODMAN, SIMON;
WILM, CLAUDIA y
MITJANS, FRANCESC**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 622 487 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

Anticuerpos para la detección de complejos de integrina en material FFPE

La invención se refiere al uso de anticuerpos descritos en el presente documento para detectar integrinas en tejido incrustado en parafina fijado con formalina (FFPE) de archivo. La invención también se refiere a anticuerpos de conejo monoclonales preparados con un inmunógeno que es un dominio de integrina extracelular recombinante derivado de cultivo de expresión de insecto, como se expone además en las reivindicaciones adjuntas.

Las integrinas son una familia de moléculas de adhesión celular compuestas de dos cadenas no covalentemente asociadas. La estructura compleja multidominio de las integrinas es sensible a modulación sutil. Las integrinas se regulan en muchos niveles, incluyendo traducción y transcripción, glicosilación post-transduccional, distribución en superficie celular, activación en superficie celular por indicadores intracelulares y activación en superficie celular por indicadores extracelulares. Las cadenas tanto alfa como beta son proteínas transmembrana clase I, que atraviesan la membrana e integran la matriz extracelular con el compartimento intracelular, proporcionando de esta manera una ruta para las señales lo que finalmente conduce al control de adhesión, proliferación, supervivencia, migración e invasión.

Las integrinas son objetivos terapéuticos en la mayoría de las patologías humanas. Por ejemplo en cáncer, las integrinas de la serie alfa-v ($\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ y $\alpha v\beta 8$) están implicadas de modo distinto en la angiogénesis, en la protección de células tumorales de la quimio- y radio-terapia, en la supervivencia tumoral y expresión inmunitaria local. También, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ están implicadas en la angiogénesis, en tanto que $\alpha 2\beta 1$, y $\alpha 6\beta 4$, se han implicado en la proliferación tumoral. La sobre-expresión de $\alpha v\beta 3$ correlaciona con la fase invasora de melanoma humano, y tanto $\alpha v\beta 3$ como $\alpha v\beta 5$ se favorecen específicamente en la expresión en el endotelio invasivo de tumor, donde parecen regular las funciones de factores de crecimiento angiogénicos en la superficie endotelial. El patrón preciso de expresión de las integrinas es altamente variable tanto entre como dentro de una clase dada de tumores y refleja la biología funcional. Por lo tanto, también son biomarcadores del estado tumoral, y el patrón de expresión es pronóstico del resultado y puede definir oportunidades terapéuticas.

El anticuerpo monoclonal DI-17E6 dirigido contra la cadena de αv -integrina, y cilengtida, un pentapéptido que contiene RGD ciclizado, que inhibe las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ están en desarrollo clínico. Sin embargo, el potencial terapéutico completo de las terapias que tienen como objetivo las integrinas aún tiene que ser logrado, en parte debido a que hay una imagen notablemente incompleta de los patrones de expresión de integrinas en condiciones patológicas. La caracterización patológica de la distribución de las integrinas ha dependido de los estudios en tejidos recién congelados. Está bien establecida la relación de las células vivas a la tinción, y los tejidos congelados son excelentes sustratos para la tinción de integrinas, pero su nivel de conservación y la fidelidad ultra-estructural son mucho menores que aquella de rutina en el material FFPE. Esto puede afectar de forma crítica las interpretaciones de la tinción en tejido complejo. Además, la práctica clínica de rutina, y en general los bancos de tejido comercialmente disponibles, proporcionan material FFPE; la obtención de material clínico congelado es cuestión de logística y frecuentemente un reto clínico-cultural, o simplemente una imposibilidad cuando se trata con ciertos tumores y con muestras clínicas raras y preciadas.

Es debido a las necesidades conflictivas de la histología clásica y de la estructura de las integrinas que en la técnica anterior se ha impedido la detección inequívoca de las integrinas en material FFPE. La histología necesita una conservación morfológica excelente y fuerte de estructuras de tejido, que comprende una reticulación extensa, infiltración y estabilización de tejidos blandos hidrófilos por reactivos insolubilizantes hidrófobos, tal como solución de formaldehído, alcoholes graduados y cera de parafina, opcionalmente junto con impacto térmico. Se conoce que la fijación e incrustación, especialmente como se practica en los laboratorios de histología clínica pueden encubrir o aún destrozar los epítomos. Las condiciones no nativas dan por resultado integrinas que ya sea no se extraen o no se degradan, pero principalmente se opacan. Los heterodímeros obligados de integrina, conformacionalmente activos, son sensibles a este cambio conformacional, y no se pueden recuperar fácilmente de la oclusión como se presenta durante los procedimientos FFPE.

Puesto que la química comprendida en la fijación e incrustación de tejido afecta seriamente la estructura de las integrinas, los anticuerpos monoclonales disponibles definitivos usados por los expertos en la técnica no reconocen de forma confiable las integrinas después del procesamiento FFPE. Los anticuerpos que reconocen los dominios citoplásmicos de las integrinas están restringidos necesariamente a cadenas individuales de integrina, que conduce a patrones ambiguos de tinción en el material FFPE puesto que no indican la distribución de heterodímeros intactos de integrinas. Adicionalmente, estos anticuerpos, que están dirigidos contra epítomos peptídicos cortos, tienden a ser independientes de la conformación, lo que conduce a la detección de cadenas individuales o a productos de degradación, y una menor especificidad y afinidad que los anticuerpos que detectarían complejos intactos de integrinas.

Varios anticuerpos monoclonales de ratón, tal como el anticuerpo LM609 anti-integrina $\alpha v\beta 3$, monoclonal de ratón, detecta las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ usando tejido congelado o FACS, sin embargo, no muestran marcación significativa o reproducible de sus epítomos en el material FFPE. Las deficiencias de los anticuerpos monoclonales murinos en su reconocimiento restringido de epítomos y la baja afinidad son ampliamente reconocidas. Los patrones

de distribución vistos cuando se usan estos anticuerpos en el material FFPE divergen de los patrones observados en material crio-seccionado, recién congelado; en tanto que estos últimos perfiles de expresión corresponden más cercanamente a aquellos de células viables obtenidos de estos tejidos. La tinción FFPE con estos anticuerpos se debe ver como origen incierto, y tiene que desarrollarse una tecnología en la recuperación de antígenos para recuperar estos determinantes de material FFPE.

En la actualidad, no está disponible un anticuerpo monoclonal que reconozca de forma fuerte los epítomos extracelulares de $\alpha v\beta 3$ o $\alpha v\beta 5$ en tejido FFPE, permitiendo la caracterización de integrinas en el tejido tumoral FFPE de pacientes. El resultado final de esta situación es que no se pueden analizar decenas de especímenes patológicos para los perfiles de expresión de integrinas que pueden revelar poblaciones de pacientes quienes pueden beneficiarse de terapias que tienen como objetivo las integrinas. En la vista terapéutica emergente, este déficit puede significar que los productos terapéuticos efectivos nunca puedan alcanzar trágicamente lo necesario.

Por lo tanto, el problema técnico que forma la base de la presente invención es proporcionar anticuerpos, que permitan una detección confiable e inequívoca de complejos de integrinas en material FFPE, especialmente en biopsias de rutina de tumor FFPE.

La presente invención soluciona el primer problema al proporcionar un anticuerpo como se establece en las reivindicaciones adjuntas. El anticuerpo obtenido comprende al menos una región variable de cadena ligera (V_L) y/o al menos una región variable de cadena pesada (V_H), comprendiendo cada una de las regiones al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de origen de conejo y opcionalmente una o más regiones marco (FRs), donde el anticuerpo tiene la capacidad de unirse a un dominio extracelular de integrina.

En más detalle, se proporciona un anticuerpo monoclonal de conejo, mismo, obtenido como se establece en las reivindicaciones adjuntas, tanto contra la integrina con patrón de glicosilación derivado de insecto como contra integrina con cualquier otro patrón de glicosilación eucariótico, en donde el anticuerpo comprende al menos una región variable de cadena ligera (V_L) y una región variable de cadena pesada (V_H), en donde el anticuerpo tiene especificidad de unión a antígeno para un epítopo no ocluido de un dominio extracelular de integrina o dominio extracelular de cadena de integrina, y en donde el anticuerpo es capaz de unirse a heterodímeros intactos de integrina en material incrustado en parafina fijado con formalina (FFPE) y en una forma aislada en ELISA y en un estado nativo en células viables con sustancialmente la misma especificidad.

De manera sorprendente, se ha demostrado por los inventores que los anticuerpos capaces de FFPE se pueden generar fácilmente al usar el dominio extracelular o intracelular de integrinas o cadenas de integrinas como inmunógeno en conejos. Se obtienen mejores resultados con el dominio intacto, que se puede expresar de manera favorablemente recombinante. En particular, se ha probado que los dominios heterodiméricos extracelulares de integrina son inmunógenos efectivos si se preparan en células de insecto. La provisión de inmunógenos truncados de integrina de acuerdo a la invención mejora de forma significativa la accesibilidad de los epítomos y da por resultado anticuerpos de sensibilidad delicada y especificidad al antígeno. Los anticuerpos monoclonales de conejo se unen de forma selectiva al antígeno, pero independientemente del patrón de glicosilación. Aunque los anticuerpos activos de la invención se formulan contra proteínas recombinantes derivadas de insectos, son multifuncionales en términos del patrón de glicosilación antigénica y por lo tanto, se consideran como adecuados para el reconocimiento de un antígeno recombinante derivado de insecto, pero sin que se limite a este patrón. Los anticuerpos de la invención son bien adecuados para reconocer el dominio extracelular de una integrina específica o partes de la misma de cualquier patrón de glicosilación eucariótica. Se debe entender que los patrones de glicosilación no están mezclados, sino que se derivan de un organismo o célula eucariótica distinta, respectivamente. Al hacerlo así, los anticuerpos generados son especialmente capaces de reconocer la estructura objetivo dentro de una matriz FFPE compleja. Los inventores han mostrado adecuación inesperada de estos anticuerpos para la detección de integrinas en tejido FFPE. La adecuación se demuestra en cuanto que los anticuerpos resultantes son intensivamente específicos y activos en el material FFPE. Es un efecto abrumador que los complejos de integrina en el material FFPE se puedan detectar fácilmente por el anticuerpo de la invención. En tanto que los anticuerpos monoclonales clásicos no trabajan en material FFPE, los anticuerpos de la invención se unen de manera sustancial a sus antígenos en el material FFPE y en células viables con la misma especificidad; esto último se prueba sin limitaciones en citometría de flujo de células vivas (por ejemplo, clasificación celular activada por fluorescencia, de forma breve FACS). Los anticuerpos de la invención también se pueden unir de forma sustancial a sus antígenos en el material FFPE y en una forma aislada en ELISA con la misma especificidad; esto último se prueba sin limitaciones en ELISA normales como se describe en el transcurso de la presente especificación y se detalla en el ejemplo 3.3. El patrón de tinción en tejido FFPE logrado con esto es de clara ventaja con respecto a los resultados ambiguos obtenidos necesariamente de anticuerpos de la técnica anterior.

A la fecha, se han descrito las composiciones de al menos 24 complejos de integrina. Las integrinas son una familia de moléculas de adhesión celular compuestas de dos cadenas no covalentemente asociadas. Ambas subunidades alfa(α) y beta(β), atraviesan la membrana e integran la matriz extracelular con compartimiento intracelular, para distribuir estas señales extracelulares que controlan la adhesión, proliferación, migración e invasión celular. En base a la composición respectiva, los dominios extracelulares e intracelulares de integrina se asignan y conocen y se pueden preparar por procesos convencionales. Se aísla ya sea un dominio de origen natural de una muestra biológica o el dominio se expresa de forma recombinante y se purifica posteriormente. De manera particular, la

muestra se toma in vivo de un mamífero que se va a analizar para el patrón de distribución de integrina. El retiro de la muestra debe seguir la buena práctica médica.

Se pueden tomar muestras biológicas de cualquier clase de especie biológica que tenga una integrina de interés, pero la muestra se toma especialmente de un animal de laboratorio o un humano, de manera más preferente una rata, ratón, conejo o humano. El procesamiento de la integrina de etapa posterior se lleva a cabo por cualquier proceso conocido en la técnica y se sigue por división de dominio y separando el dominio extracelular o intracelular. Se puede realizar la lisis celular en amortiguadores de lisis, adecuados, bien conocidos, que pueden provocar un choque osmótico y perforar la membrana celular. También se puede destruir la estabilidad de la estructura celular por fuerzas mecánicas, tal como molino de bolas, prensa francesa, ultrasonido, etc., por degradación enzimática de la pared celular y la membrana celular, respectivamente, y/o por la acción de tensioactivos. Las integrinas se pueden purificar adicionalmente para remover las sustancias perturbadoras, o las integrinas se pueden concentrar en la muestra. El procesamiento de etapa posterior y/o la concentración se realizan de manera preferente por el método de precipitación, diálisis, filtración en gel, elución en gel o cromatografía, tal como HPLC o cromatografía de intercambio iónico. Se recomienda combinar varios métodos para mejores rendimientos.

El dominio extracelular de integrina se expresa de forma recombinante y se purifica. Se puede obtener el ADN que codifica para la secuencia de proteína, se amplifica, opcionalmente se altera o se sintetiza con técnicas conocidas por el experto en la técnica. El ADN se puede introducir en un vector y transcribir y traducir en células. El dominio se puede fusionar con una marca por cromatografía de afinidad, tal como la Strep-marca, His-marca, GST-marca, Arg-marca o la proteína de unión de calmodulina, o se purifica usando técnicas establecidas de purificación por afinidad de anticuerpos. Una columna se carga con la suspensión de proteína y todos los componentes que carecen de la marca se diluyen de forma inmediata. Después de la remoción de los aglutinantes no específicos por pasos de lavado, la construcción fusionada de la marca se remueve de la columna. Si la marca afecta la inducción de los anticuerpos, se escinde antes de la inmunización.

Varios sistemas de expresión son estado de la técnica. De manera interesante, el título contra los elementos de la proteína del inmunógeno se puede incrementar de forma benéfica si se aplican dominios de integrina, recombinantes derivados de insecto. Las glicoproteínas mamíferas, recombinantes, derivadas de insecto están incompletamente glicosiladas, y carecen de procesamiento de azúcares terminales y de extensión, lo que significa que los epítopos de la proteína están altamente expuestos en comparación a proteínas no recombinantes o proteínas recombinantes de expresión eucariótica convencional. Por lo tanto, se prefiere que el dominio de integrina inmunógeno tenga un patrón de glicosilación derivado de insecto, de manera preferente el dominio extracelular. Además, las propiedades antigénicas para producir o más bien para incrementar una respuesta inmunitaria se pueden afectar cuando se une el antígeno a un portador grande, tal como una proteína o polisacárido; el portador puede ser uno que no produce una respuesta inmunitaria por sí mismo.

En la invención, el dominio de integrina tiene una estructura primaria humana, es decir, la secuencia de aminoácidos se alinea con una entrada humana al hacer corresponder las bases de datos, tal como el número de acceso de la base de datos de secuencias, Swiss-Prot. El experto en la técnica conoce estas bases de datos de biología molecular a fin de extraer secuencias que se van a aplicar en la presente. En la presente invención, el dominio extracelular de integrina tiene una estructura primaria humana y un patrón de glicosilación insectil.

El anticuerpo descrito aquí denota un polipéptido codificado por un gen de inmunoglobulina, o fragmentos del mismo. El anticuerpo comprende al menos una cadena ligera y/o al menos una cadena pesada, de manera preferente al menos una cadena ligera y al menos una cadena pesada, de manera más preferente dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, cada una de ellas como se define más adelante en la presente. Esto significa que, la cadena ligera comprende al menos una CDR individual, de manera particular de origen de conejo, en la región variable de esta cadena ligera (V_L) y opcionalmente al menos una FR individual en la región variable de esta cadena ligera (V_L), de manera preferente al menos la CDR y al menos la FR. La cadena pesada comprende al menos una CDR individual, particularmente de origen de conejo, en la región variable de la cadena pesada (V_H) y al menos una FR individual en la región variable de la cadena pesada (V_H), de manera preferente al menos la CDR y al menos la FR. Dentro de la porción de unión a antígeno de un anticuerpo, las CDR interactúan directamente con el epítipo del antígeno en tanto que las FR mantienen la estructura terciaria del paratopo. Tanto en la cadena ligera como en la cadena pesada de las inmunoglobulinas, hay de tres a cuatro regiones marco (FR-1 hasta FR-4) separadas respectivamente por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR-1 hasta CDR-3). Las CDR o regiones hipervariables, en particular las regiones CDR-3, más particularmente las CDR-3 de cadena pesada, son bastante responsables de la especificidad y afinidad del anticuerpo.

La región variable de cadena ligera (V_L) comprende preferiblemente dos CDR, de manera más preferente tres CDR, de manera más preferente conjuntamente con el mismo número de FR o aún una FR más. La región variable de cadena pesada (V_H) comprende preferiblemente dos CDR, de manera más preferente tres CDR, de manera más preferente conjuntamente con el mismo número de FR o aún una FR más. El anticuerpo de la invención comprende preferiblemente la región variable de cadena ligera (V_L) y la región variable de cadena pesada (V_H), cada una de las regiones comprende dos CDR, de manera más preferente tres CDR, de manera altamente preferente conjuntamente con el mismo número de FR o aún una FR más.

En otras palabras, el anticuerpo de la invención debe comprender al menos esa estructura mínima de una región variable de una cadena individual, que confiere capacidad de unión a cualquier dominio de integrina o el dominio extracelular en particular. El anticuerpo también puede estar presente como un número de otros fragmentos bien caracterizados de una inmunoglobulina o aún como una inmunoglobulina intacta con la condición que se de la estructura mínima mencionada anteriormente. Los fragmentos se seleccionan de manera preferente del grupo que comprende cadena pesada (H), cadena ligera (L), regiones variables (V), fragmento variable de cadena individual (scFv), fragmentos F_{ab} que consisten de una cadena ligera de anticuerpo covalentemente unida y una porción de la cadena pesada (F_d) de anticuerpo, y similares.

La cadena ligera del anticuerpo puede comprender adicionalmente una región constante de la cadena ligera (C_L). De manera similar, la cadena pesada del anticuerpo puede comprender adicionalmente una región constante de la cadena pesada (C_H), o una porción de la misma, en donde la porción se refiere especialmente a la región constante dentro de la región F_d . El fragmento F_d es el determinante principal de la especificidad del anticuerpo y retiene la capacidad de unión al epítipo en el aislamiento. El anticuerpo de la invención también se puede completar por el fragmento F_c como efector de la cascada de complemento, que no está comprendido en la unión al antígeno. Los fragmentos, tal como los fragmentos F_{ab} y F_c , se pueden producir por escisión usando varias peptidasas. Adicionalmente, los fragmentos se pueden manejar y expresar de forma recombinante, de manera preferente scFv.

En el alcance de la invención, el anticuerpo es de origen monoclonal. Usualmente se producen anticuerpos policlonales en organismos mamíferos cuando se provoca una respuesta inmunitaria por antígenos que son extraños al organismo y que tienen un peso molecular que excede 3.000 g/mol. Los anticuerpos de la invención son monoclonales. Las grandes ventajas de los anticuerpos monoclonales incluyen una fuente inmortal de reactivos, propiedades estables de anticuerpos y especificidad precisa. El experto en la técnica conoce bien las técnicas populares para producir anticuerpos monoclonales, tal como la tecnología de hibridoma.

Las especies hospedadoras favorables para la producción de anticuerpos policlonales y/o monoclonales comprenden conejo. Los anticuerpos de conejo, de manera más preferente anticuerpos monoclonales de conejo (RabMab), exhiben mayor afinidad junto con un intervalo más amplio de reconocimiento de epítipos que los monoclonales de ratón, en tanto que debido a la divergencia en los sistemas inmunitarios, y las CDR extendidas, se pueden producir respuestas más fuertes a los epítipos, de manera preferente a los epítipos humanos, en comparación a las respuestas murinas. Se debe entender que se pueden manejar genéticamente anticuerpos quiméricos, que las CDR, las FR, y/o las regiones constantes se derivan de fuentes mamíferas diferentes con la condición que una o más CDR tengan una fuente de conejo. Por consiguiente, se pueden obtener anticuerpos quiméricos al reemplazar no solo la CDR sino las regiones variables completas de las cadenas ligera y pesada de origen no de conejo. La afinidad de los sitios de unión al antígeno se puede influenciar de forma alternativa por intercambio selectivo de algunos aminoácidos dentro de las regiones variables.

El principio básico para producir anticuerpos monoclonales de conejo fue como para los monoclonales de ratón. Después de la inmunización de los conejos, se toma el bazo de estos conejos produciendo suero policlonal. Las células B aisladas de conejo de los conejos inmunizados se fusionaron con una línea de células de plasmocitoma de conejo para producir hibridomas estables. Las células de hibridoma se prueban para secreción de anticuerpos, que son específicos para el inmunógeno, y se pueden clonar de forma subsiguiente. El establecimiento original de la línea de células compañeras de fusión de hibridomas de conejo se describe por Spieker-Polet et al., PNAS USA 1995, 92(20): 9348-9352. Se describen desarrollos adicionales de la línea de células compañeras de fusión en US 7,429,487 B2. Se publican aún métodos adicionales en las solicitudes de patente de los Estados Unidos números 10/705,109; 10/266,387; 10/313,881; 10/350,841 y 11/476,277. El ADNc de inserciones que codifican para el anticuerpo se clona de forma preferente, se secuencian y se inserta en un vector de expresión para permitir la producción de anticuerpos completamente definidos. El experto en la técnica conoce técnicas adecuadas para la producción recombinante de anticuerpos, tal como en el sistema de expresión de células EBNA de acuerdo a Pham et al., Biotech Bioeng 2003, 84(3): 332-342.

El anticuerpo se dirige de forma particular contra el dominio extracelular de integrinas $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 6$ o $\alpha v \beta 8$.

En una realización especial preferida de la presente invención, el anticuerpo se dirige contra el dominio extracelular de la integrina $\alpha v \beta 3$. Las CDR adecuadas en la V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 81 (CDR-1- V_L - $\alpha v \beta 3$), SEQ ID NO: 82 (CDR-2- V_L - $\alpha v \beta 3$) y/o SEQ ID NO: 83 (CDR-3- V_L - $\alpha v \beta 3$), y/o las CDR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 (CDR-1- V_H - $\alpha v \beta 3$), SEQ ID NO: 85 (CDR-2- V_H - $\alpha v \beta 3$) y/o SEQ ID NO: 86 (CDR-3- V_H - $\alpha v \beta 3$). De manera preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 81 (CDR-1- V_L - $\alpha v \beta 3$), SEQ ID NO: 82 (CDR-2- V_L - $\alpha v \beta 3$) y/o SEQ ID NO: 83 (CDR-3- V_L - $\alpha v \beta 3$), y/o las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 (CDR-1- V_H - $\alpha v \beta 3$), SEQ ID NO: 85 (CDR-2- V_H - $\alpha v \beta 3$) y/o SEQ ID NO: 86 (CDR-3- V_H - $\alpha v \beta 3$). De manera más preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 81 (CDR-1- V_L - $\alpha v \beta 3$), SEQ ID NO: 82 (CDR-2- V_L - $\alpha v \beta 3$) y/o SEQ ID NO: 83 (CDR-3- V_L - $\alpha v \beta 3$), y las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 (CDR-1- V_H - $\alpha v \beta 3$), SEQ ID NO: 85 (CDR-2- V_H - $\alpha v \beta 3$) y/o SEQ ID NO: 86 (CDR-3- V_H - $\alpha v \beta 3$).

Con referencia aún al contexto del anticuerpo anti- $\alpha v \beta 3$, las FR adecuadas en V_L comprenden secuencias de

aminoácidos de SEQ ID NO: 87 (FR-1-V_L-αβ3), SEQ ID NO: 88 (FR-2-V_L-αβ3) y/o SEQ ID NO: 89 (FR-3-V_L-αβ3), y/o las FR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 (FR-1-V_H-αβ3), SEQ ID NO: 92 (FR-2-V_H-αβ3), SEQ ID NO: 93 (FR-3-V_H-αβ3) y/o SEQ ID NO: 94 (FR-4-V_H-αβ3). De manera preferente, las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 (FR-1-V_L-αβ3), SEQ ID NO: 88 (FR-2-V_L-αβ3) y SEQ ID NO: 89 (FR-3-V_L-αβ3), y/o las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 (FR-1-V_H-αβ3), SEQ ID NO: 92 (FR-2-V_H-αβ3), SEQ ID NO: 93 (FR-3-V_H-αβ3) y SEQ ID NO: 94 (FR-4-V_H-αβ3). De manera más preferente, las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 (FR-1-V_L-αβ3), SEQ ID NO: 88 (FR-2-V_L-αβ3) y SEQ ID NO: 89 (FR-3-V_L-αβ3), y las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 (FR-1-V_H-αβ3), SEQ ID NO: 92 (FR-2-V_H-αβ3), SEQ ID NO: 93 (FR-3-V_H-αβ3) y SEQ ID NO: 94 (FR-4-V_H-αβ3).

Es en el contexto del anticuerpo anti-αβ3, en la cual las CDR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 81 (CDR-1-V_L-αβ3), SEQ ID NO: 82 (CDR-2-V_L-αβ3) y/o SEQ ID NO: 83 (CDR-3-V_L-αβ3), y las FR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 (FR-1-V_L-αβ3), SEQ ID NO: 88 (FR-2-V_L-αβ3) y/o SEQ ID NO: 89 (FR-3-V_L-αβ3). De manera preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 81 (CDR-1-V_L-αβ3), SEQ ID NO: 82 (CDR-2-V_L-αβ3) y SEQ ID NO: 83 (CDR-3-V_L-αβ3), y las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 (FR-1-V_L-αβ3), SEQ ID NO: 88 (FR-2-V_L-αβ3) y SEQ ID NO: 89 (FR-3-V_L-αβ3).

Es todavía en el contexto del anticuerpo anti-αβ3, en la cual las CDR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 (CDR-1-V_H-αβ3), SEQ ID NO: 85 (CDR-2-V_H-αβ3) y/o SEQ ID NO: 86 (CDR-3-V_H-αβ3), y las FR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 (FR-1-V_H-αβ3), SEQ ID NO: 92 (FR-2-V_H-αβ3), SEQ ID NO: 93 (FR-3-V_H-αβ3) y/o SEQ ID NO: 94 (FR-4-V_H-αβ3). De manera preferente, las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 (CDR-1-V_H-αβ3), SEQ ID NO: 85 (CDR-2-V_H-αβ3) y SEQ ID NO: 86 (CDR-3-V_H-αβ3), y las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 (FR-1-V_H-αβ3), SEQ ID NO: 92 (FR-2-V_H-αβ3), SEQ ID NO: 93 (FR-3-V_H-αβ3) y SEQ ID NO: 94 (FR-4-V_H-αβ3).

En otra realización preferida en el contexto del anticuerpo anti-αβ3, V_L comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95 (V_L-αβ3) y/o V_H comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96 (V_H-αβ3), de manera más preferente, V_L consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95 (V_L-αβ3) y/o V_H consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96 (V_H-αβ3).

El anticuerpo anti-αβ3 se puede completar por regiones constantes de cadena ligera (C_L) y/o pesada (C_H). De manera preferente, C_L comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 (C_L-αβ3) y/o C_H comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98 (C_H-αβ3).

Por consiguiente, el anticuerpo anti-αβ3 comprende de manera más preferente cadenas ligeras y/o pesadas, en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99 (L-αβ3) y/o la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100 (L-αβ3). De manera más preferente, la cadena ligera consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99 (L-αβ3) y/o la cadena pesada consiste una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100 (L-αβ3). En una realización altamente preferida de la presente invención, la cadena ligera consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99 (L-αβ3) y/o la cadena pesada consiste una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100 (L-αβ3).

En otra realización preferida, especial de la presente invención, el anticuerpo se dirige contra el dominio extracelular de la integrina αβ5. Las CDR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (CDR-1-V_L-αβ5), SEQ ID NO: 2 (CDR-2-V_L-αβ5) y/o SEQ ID NO: 3 (CDR-3-V_L-αβ5), y/o las CDR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (CDR-1-V_H-αβ5), SEQ ID NO: 5 (CDR-2-V_H-αβ5) y/o SEQ ID NO: 6 (CDR-3-V_H-αβ5). De manera preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (CDR-1-V_L-αβ5), SEQ ID NO: 2 (CDR-2-V_L-αβ5) y SEQ ID NO: 3 (CDR-3-V_L-αβ5), y/o las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (CDR-1-V_H-αβ5), SEQ ID NO: 5 (CDR-2-V_H-αβ5) y SEQ ID NO: 6 (CDR-3-V_H-αβ5). De manera más preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (CDR-1-V_L-αβ5), SEQ ID NO: 2 (CDR-2-V_L-αβ5) y SEQ ID NO: 3 (CDR-3-V_L-αβ5), y las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (CDR-1-V_H-αβ5), SEQ ID NO: 5 (CDR-2-V_H-αβ5) y SEQ ID NO: 6 (CDR-3-V_H-αβ5).

Con referencia aún al contexto del anticuerpo anti-αβ5, las FR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (FR-1-V_L-αβ5), SEQ ID NO: 8 (FR-2-V_L-αβ5) y/o SEQ ID NO: 9 (FR-3-V_L-αβ5), y/o las FR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 (FR-1-V_H-αβ5), SEQ ID NO: 12 (FR-2-V_H-αβ5), SEQ ID NO: 13 (FR-3-V_H-αβ5) y/o SEQ ID NO: 14 (FR-4-V_H-αβ5). De manera preferente, las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (FR-1-V_L-αβ5), SEQ ID NO: 8 (FR-2-V_L-αβ5) y SEQ ID NO: 9 (FR-3-V_L-αβ5), y/o las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 (FR-1-V_H-αβ5), SEQ ID NO: 12 (FR-2-V_H-αβ5), SEQ ID NO: 13 (FR-3-V_H-αβ5) y SEQ ID NO: 14 (FR-4-V_H-αβ5). De

manera más preferente, las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (FR-1- V_L - $\alpha\beta 5$), SEQ ID NO: 8 (FR-2- V_L - $\alpha\beta 5$) y SEQ ID NO: 9 (FR-3- V_L - $\alpha\beta 5$), y las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 (FR-1- V_H - $\alpha\beta 5$), SEQ ID NO: 12 (FR-2- V_H - $\alpha\beta 5$), SEQ ID NO: 13 (FR-3- V_H - $\alpha\beta 5$) y SEQ ID NO: 14 (FR-4- V_H - $\alpha\beta 5$).

5 Es en el contexto del anticuerpo anti- $\alpha\beta 5$, en el cual las CDR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (CDR-1- V_L - $\alpha\beta 5$), SEQ ID NO: 2 (CDR-2- V_L - $\alpha\beta 5$) y/o SEQ ID NO: 3 (CDR-3- V_L - $\alpha\beta 5$), y las FR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (FR-1- V_L - $\alpha\beta 5$), SEQ ID NO: 8 (FR-2- V_L - $\alpha\beta 5$) y/o SEQ ID NO: 9 (FR-3- V_L - $\alpha\beta 5$). De manera preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (CDR-1- V_L - $\alpha\beta 5$), SEQ ID NO: 2 (CDR-2- V_L - $\alpha\beta 5$) y SEQ ID NO: 3 (CDR-3- V_L - $\alpha\beta 5$), y las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (FR-1- V_L - $\alpha\beta 5$), SEQ ID NO: 8 (FR-2- V_L - $\alpha\beta 5$) y SEQ ID NO: 9 (FR-3- V_L - $\alpha\beta 5$).

10 Es todavía en el contexto del anticuerpo anti- $\alpha\beta 5$, en el cual las CDR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (CDR-1- V_H - $\alpha\beta 5$), SEQ ID NO: 5 (CDR-2- V_H - $\alpha\beta 5$) y/o SEQ ID NO: 6 (CDR-3- V_H - $\alpha\beta 5$), y las FR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 (FR-1- V_H - $\alpha\beta 5$), SEQ ID NO: 12 (FR-2- V_H - $\alpha\beta 5$), SEQ ID NO: 13 (FR-3- V_H - $\alpha\beta 5$) y/o SEQ ID NO: 14 (FR-4- V_H - $\alpha\beta 5$). De manera preferente, las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (CDR-1- V_H - $\alpha\beta 5$), SEQ ID NO: 5 (CDR-2- V_H - $\alpha\beta 5$) y SEQ ID NO: 6 (CDR-3- V_H - $\alpha\beta 5$), y las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 (FR-1- V_H - $\alpha\beta 5$), SEQ ID NO: 12 (FR-2- V_H - $\alpha\beta 5$), SEQ ID NO: 13 (FR-3- V_H - $\alpha\beta 5$) y SEQ ID NO: 14 (FR-4- V_H - $\alpha\beta 5$).

15 En una realización preferida en el contexto del anticuerpo anti- $\alpha\beta 5$, V_L comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (V_L - $\alpha\beta 5$) y/o V_H comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (V_H - $\alpha\beta 5$), de manera más preferente V_L consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (V_L - $\alpha\beta 5$) y/o V_H consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (V_H - $\alpha\beta 5$).

20 El anticuerpo anti- $\alpha\beta 5$ se puede completar por regiones constantes de la cadena ligera (C_L) y/o cadena pesada (C_H). De manera preferente, C_L comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (C_L - $\alpha\beta 5$) y/o C_H comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 (C_H - $\alpha\beta 5$).

25 Por consiguiente, el anticuerpo anti- $\alpha\beta 5$ comprende de manera más preferente cadenas ligeras y/o pesadas, en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (L- $\alpha\beta 5$) y/o la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (H- $\alpha\beta 5$). De manera más preferente, la cadena ligera consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (L- $\alpha\beta 5$) y/o la cadena pesada consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (H- $\alpha\beta 5$). En una realización altamente preferida de la presente invención, la cadena ligera consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (L- $\alpha\beta 5$) y la cadena pesada consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (H- $\alpha\beta 5$).

30 En todavía otra realización preferida especial de la presente invención, el anticuerpo se dirige contra el dominio extracelular de la integrina $\alpha\beta 6$. Las CDR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 121 (CDR-1- V_L - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 122 (CDR-2- V_L - $\alpha\beta 6$) y/o SEQ ID NO: 123 (CDR-3- V_L - $\alpha\beta 6$), y/o las CDR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 (CDR-1- V_H - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 125 (CDR-2- V_H - $\alpha\beta 6$) y/o SEQ ID NO: 126 (CDR-3- V_H - $\alpha\beta 6$). De manera preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 121 (CDR-1- V_L - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 122 (CDR-2- V_L - $\alpha\beta 6$) y SEQ ID NO: 123 (CDR-3- V_L - $\alpha\beta 6$), y/o las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 (CDR-1- V_H - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 125 (CDR-2- V_H - $\alpha\beta 6$) y SEQ ID NO: 126 (CDR-3- V_H - $\alpha\beta 6$). De manera más preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 121 (CDR-1- V_L - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 122 (CDR-2- V_L - $\alpha\beta 6$) y SEQ ID NO: 123 (CDR-3- V_L - $\alpha\beta 6$), y las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 (CDR-1- V_H - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 125 (CDR-2- V_H - $\alpha\beta 6$) y SEQ ID NO: 126 (CDR-3- V_H - $\alpha\beta 6$).

35 Con referencia aún al contexto del anticuerpo anti- $\alpha\beta 6$, las FR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 127 (FR-1- V_L - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 128 (FR-2- V_L - $\alpha\beta 6$) y/o SEQ ID NO: 129 (FR-3- V_L - $\alpha\beta 6$), y/o las FR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 (FR-1- V_H - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 132 (FR-2- V_H - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 133 (FR-3- V_H - $\alpha\beta 6$) y/o SEQ ID NO: 134 (FR-4- V_H - $\alpha\beta 6$). De manera preferente, las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 127 (FR-1- V_L - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 128 (FR-2- V_L - $\alpha\beta 6$) y/o SEQ ID NO: 129 (FR-3- V_L - $\alpha\beta 6$), y/o las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 (FR-1- V_H - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 132 (FR-2- V_H - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 133 (FR-3- V_H - $\alpha\beta 6$) y SEQ ID NO: 134 (FR-4- V_H - $\alpha\beta 6$). De manera más preferente, las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 127 (FR-1- V_L - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 128 (FR-2- V_L - $\alpha\beta 6$) y SEQ ID NO: 129 (FR-3- V_L - $\alpha\beta 6$), y las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 (FR-1- V_H - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 132 (FR-2- V_H - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 133 (FR-3- V_H - $\alpha\beta 6$) y SEQ ID NO: 134 (FR-4- V_H - $\alpha\beta 6$).

40 Es en el contexto del anticuerpo anti- $\alpha\beta 6$, en el cual las CDR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 121 (CDR-1- V_L - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 122 (CDR-2- V_L - $\alpha\beta 6$) y/o SEQ ID NO: 123 (CDR-3- V_L - $\alpha\beta 6$), y las FR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 127 (FR-1- V_L - $\alpha\beta 6$), SEQ ID NO: 128 (FR-2- V_L - $\alpha\beta 6$) y/o SEQ ID NO: 129 (FR-3- V_L - $\alpha\beta 6$). De manera preferente, las CDR en V_L

comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 121 (CDR-1-V_L-αβ6), SEQ ID NO: 122 (CDR-2-V_L-αβ6) y SEQ ID NO: 123 (CDR-3-V_L-αβ6), y las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 127 (FR-1-V_L-αβ6), SEQ ID NO: 128 (FR-2-V_L-αβ6) y SEQ ID NO: 129 (FR-3-V_L-αβ6).

5 Es todavía en el contexto del anticuerpo anti-αβ6, en el cual las CDR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 (CDR-1-V_H-αβ6), SEQ ID NO: 125 (CDR-2-V_H-αβ6) y/o SEQ ID NO: 126 (CDR-3-V_H-αβ6), y las FR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 (FR-1-V_H-αβ6), SEQ ID NO: 132 (FR-2-V_H-αβ6), SEQ ID NO: 133 (FR-3-V_H-αβ6) y/o SEQ ID NO: 134 (FR-4-V_H-αβ6). De manera preferente, las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 (CDR-1-V_H-αβ6), SEQ ID NO: 125 (CDR-2-V_H-αβ6) y SEQ ID NO: 126 (CDR-3-V_H-αβ6), y las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 (FR-1-V_H-αβ6), SEQ ID NO: 132 (FR-2-V_H-αβ6), SEQ ID NO: 133 (FR-3-V_H-αβ6) y SEQ ID NO: 134 (FR-4-V_H-αβ6).

10 En una realización preferida en el contexto del anticuerpo anti-αβ6, V_L comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 (V_L-αβ6) y/o V_H comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 (V_H-αβ6), de manera más preferente V_L consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 (V_L-αβ6) y/o V_H consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 (V_H-αβ6).

15 El anticuerpo anti-αβ6 se puede completar por regiones constantes de la cadena ligera (C_L) y/o pesada (C_H). De manera preferente, C_L comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137 (C_L-αβ6) y/o C_H comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138 (C_H-αβ6).

20 Por consiguiente, el anticuerpo anti-αβ6 comprende de manera más preferente cadenas ligeras y/o pesadas, en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 (L-αβ6) y/o la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 (H-αβ6). De manera más preferente, la cadena ligera consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 (L-αβ6) y/o la cadena pesada consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 (H-αβ6). En una realización altamente preferida de la presente invención, la cadena ligera consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 (L-αβ6) y la cadena pesada consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 (H-αβ6).

25 En todavía otra realización preferida especial de la presente invención, el anticuerpo se dirige contra el dominio extracelular de la integrina αβ8. Las CDR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 161 (CDR-1-V_L-αβ8), SEQ ID NO: 162 (CDR-2-V_L-αβ8) y/o SEQ ID NO: 163 (CDR-3-V_L-αβ8), y/o las CDR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 164 (CDR-1-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 165 (CDR-2-V_H-αβ8) y/o SEQ ID NO: 166 (CDR-3-V_H-αβ8). De manera preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 161 (CDR-1-V_L-αβ8), SEQ ID NO: 162 (CDR-2-V_L-αβ8) y SEQ ID NO: 163 (CDR-3-V_L-αβ8), y/o las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 164 (CDR-1-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 165 (CDR-2-V_H-αβ8) y SEQ ID NO: 166 (CDR-3-V_H-αβ8). De manera más preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 161 (CDR-1-V_L-αβ8), SEQ ID NO: 162 (CDR-2-V_L-αβ8) y SEQ ID NO: 163 (CDR-3-V_L-αβ8), y las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 164 (CDR-1-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 165 (CDR-2-V_H-αβ8) y SEQ ID NO: 166 (CDR-3-V_H-αβ8).

30 Con referencia aún al contexto del anticuerpo anti-αβ8, las FR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 167 (FR-1-V_L-αβ8), SEQ ID NO: 168 (FR-2-V_L-αβ8) y/o SEQ ID NO: 169 (FR-3-V_L-αβ8), y/o las FR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 171 (FR-1-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 172 (FR-2-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 173 (FR-3-V_H-αβ8) y/o SEQ ID NO: 174 (FR-4-V_H-αβ8). De manera preferente, las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 167 (FR-1-V_L-αβ8), SEQ ID NO: 168 (FR-2-V_L-αβ8) y SEQ ID NO: 169 (FR-3-V_L-αβ8), y/o las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 171 (FR-1-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 172 (FR-2-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 173 (FR-3-V_H-αβ8) y SEQ ID NO: 174 (FR-4-V_H-αβ8). De manera más preferente, las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 167 (FR-1-V_L-αβ8), SEQ ID NO: 168 (FR-2-V_L-αβ8) y SEQ ID NO: 169 (FR-3-V_L-αβ8), y las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 171 (FR-1-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 172 (FR-2-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 173 (FR-3-V_H-αβ8) y SEQ ID NO: 174 (FR-4-V_H-αβ8).

40 Es en el contexto del anticuerpo anti-αβ8, en el cual las CDR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 161 (CDR-1-V_L-αβ8), SEQ ID NO: 162 (CDR-2-V_L-αβ8) y/o SEQ ID NO: 163 (CDR-3-V_L-αβ8), y las FR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 167 (FR-1-V_L-αβ8), SEQ ID NO: 168 (FR-2-V_L-αβ8) y/o SEQ ID NO: 169 (FR-3-V_L-αβ8). De manera preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 161 (CDR-1-V_L-αβ8), SEQ ID NO: 162 (CDR-2-V_L-αβ8) y SEQ ID NO: 163 (CDR-3-V_L-αβ8), y las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 167 (FR-1-V_L-αβ8), SEQ ID NO: 168 (FR-2-V_L-αβ8) y SEQ ID NO: 169 (FR-3-V_L-αβ8).

55 Es todavía en el contexto del anticuerpo anti-αβ8, en el cual las CDR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 164 (CDR-1-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 165 (CDR-2-V_H-αβ8) y/o SEQ ID NO: 166 (CDR-3-V_H-αβ8), y las FR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 171 (FR-1-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 172 (FR-2-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 173 (FR-3-V_H-αβ8) y/o SEQ ID NO: 174 (FR-4-V_H-αβ8). De manera preferente, las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 164 (CDR-1-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 165 (CDR-2-V_H-αβ8) y/o SEQ ID NO: 166 (CDR-3-V_H-αβ8).

NO: 165 (CDR-2-V_H-αβ8) y SEQ ID NO: 166 (CDR-3-V_H-αβ8), y las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 171 (FR-1-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 172 (FR-2-V_H-αβ8), SEQ ID NO: 173 (FR-3-V_H-αβ8) y SEQ ID NO: 174 (FR-4-V_H-αβ8).

5 En otra realización preferida en el contexto del anticuerpo anti-αβ8, V_L comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 175 (V_L-αβ8) y/o V_H comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 176 (V_H-αβ8), de manera más preferente V_L consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 175 (V_L-αβ8) y/o V_H consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 176 (V_H-αβ8), de manera más preferente el anticuerpo se forma como scFv anti-αβ8.

10 El anticuerpo anti-αβ8 se puede completar por regiones constantes de la cadena ligera (C_L) y/o pesada (C_H). De manera preferente, C_L comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 177 (C_L-αβ8) y/o C_H comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 178 (C_H-αβ8).

15 Por consiguiente, el anticuerpo anti-αβ8 comprende de manera más preferente cadenas ligeras y/o pesadas, en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 179 (L-αβ8) y/o la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 180 (H-αβ8). De manera más preferente, la cadena ligera consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 179 (L-αβ8) y/o la cadena pesada consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 180 (H-αβ8). En una realización altamente preferida de la presente invención, la cadena ligera consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 179 (L-αβ8) y la cadena pesada consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 180 (H-αβ8).

20 En todavía otra realización especial preferida de la presente invención, el anticuerpo se dirige contra el dominio extracelular de la integrina αv. Las CDR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 (CDR-1-V_L-αv), SEQ ID NO: 202 (CDR-2-V_L-αv) y/o SEQ ID NO: 203 (CDR-3-V_L-αv), y/o las CDR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 204 (CDR-1-V_H-αv), SEQ ID NO: 205 (CDR-2-V_H-αv) y/o SEQ ID NO: 206 (CDR-3-V_H-αv). De manera preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 (CDR-1-V_L-αv), SEQ ID NO: 202 (CDR-2-V_L-αv) y SEQ ID NO: 203 (CDR-3-V_L-αv), y/o las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 204 (CDR-1-V_H-αv), SEQ ID NO: 205 (CDR-2-V_H-αv) y SEQ ID NO: 206 (CDR-3-V_H-αv). De manera más preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 (CDR-1-V_L-αv), SEQ ID NO: 202 (CDR-2-V_L-αv) y SEQ ID NO: 203 (CDR-3-V_L-αv), y las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 204 (CDR-1-V_H-αv), SEQ ID NO: 205 (CDR-2-V_H-αv) y SEQ ID NO: 206 (CDR-3-V_H-αv).

30 Con referencia aún al contexto del anticuerpo anti-αv, las FR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 207 (FR-1-V_L-αv), SEQ ID NO: 208 (FR-2-V_L-αv) y/o SEQ ID NO: 209 (FR-3-V_L-αv), y/o las FR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 211 (FR-1-V_H-αv), SEQ ID NO: 212 (FR-2-V_H-αv), SEQ ID NO: 213 (FR-3-V_H-αv) y/o SEQ ID NO: 214 (FR-4-V_H-αv). De manera preferente, las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 207 (FR-1-V_L-αv), SEQ ID NO: 208 (FR-2-V_L-αv) y SEQ ID NO: 209 (FR-3-V_L-αv), y/o las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 211 (FR-1-V_H-αv), SEQ ID NO: 212 (FR-2-V_H-αv), SEQ ID NO: 213 (FR-3-V_H-αv) y SEQ ID NO: 214 (FR-4-V_H-αv). De manera más preferente, las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 207 (FR-1-V_L-αv), SEQ ID NO: 208 (FR-2-V_L-αv) y SEQ ID NO: 209 (FR-3-V_L-αv), y las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 211 (FR-1-V_H-αv), SEQ ID NO: 212 (FR-2-V_H-αv), SEQ ID NO: 213 (FR-3-V_H-αv) y SEQ ID NO: 214 (FR-4-V_H-αv).

45 Es en el contexto del anticuerpo anti-αv, en el cual las CDR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 (CDR-1-V_L-αv), SEQ ID NO: 202 (CDR-2-V_L-αv) y/o SEQ ID NO: 203 (CDR-3-V_L-αv), y las FR adecuadas en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 207 (FR-1-V_L-αv), SEQ ID NO: 208 (FR-2-V_L-αv) y/o SEQ ID NO: 209 (FR-3-V_L-αv). De manera preferente, las CDR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 201 (CDR-1-V_L-αv), SEQ ID NO: 202 (CDR-2-V_L-αv) y SEQ ID NO: 203 (CDR-3-V_L-αv), y las FR en V_L comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 207 (FR-1-V_L-αv), SEQ ID NO: 208 (FR-2-V_L-αv) y SEQ ID NO: 209 (FR-3-V_L-αv).

50 Es todavía en el contexto del anticuerpo anti-αv, en el cual las CDR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 204 (CDR-1-V_H-αv), SEQ ID NO: 205 (CDR-2-V_H-αv) y/o SEQ ID NO: 206 (CDR-3-V_H-αv), y las FR adecuadas en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 211 (FR-1-V_H-αv), SEQ ID NO: 212 (FR-2-V_H-αv), SEQ ID NO: 213 (FR-3-V_H-αv) y/o SEQ ID NO: 214 (FR-4-V_H-αv). De manera preferente, las CDR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 204 (CDR-1-V_H-αv), SEQ ID NO: 205 (CDR-2-V_H-αv) y SEQ ID NO: 206 (CDR-3-V_H-αv), y las FR en V_H comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 211 (FR-1-V_H-αv), SEQ ID NO: 212 (FR-2-V_H-αv), SEQ ID NO: 213 (FR-3-V_H-αv) y SEQ ID NO: 214 (FR-4-V_H-αv).

55 En una realización preferida en el contexto anticuerpo anti-αv, V_L comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 215 (V_L-αv) y/o V_H comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 216 (V_H-αv), de manera más preferente V_L consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 215 (V_L-αv) y/o V_H consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 216 (V_H-αv).

El anticuerpo anti- α v se puede completar por regiones constantes de la cadena ligera (C_L) y/o pesada (C_H). De manera preferente, C_L comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 217 (C_L - α v) y/o C_H comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 218 (C_H - α v).

5 Por consiguiente, el anticuerpo anti- α v comprende de manera más preferente cadenas ligeras y/o pesadas, en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 219 (L- α v) y/o la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 220 (H- α v). De manera más preferente, la cadena ligera consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 219 (L- α v) y/o la cadena pesada consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 220 (H- α v). En una realización altamente preferida de la presente invención, la cadena ligera consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 219 (L- α v) y la cadena pesada consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 220 (H- α v).

Se debe entender que las combinaciones de CDR, FR, V_L , V_H , C, L y/o H no son exhaustivas como se detalla en la presente, sino que estos componentes se pueden combinar de cualquier otra manera. Cada combinación se debe considerar para leer el alcance de la presente invención con la condición que el anticuerpo resultante reconozca un dominio extracelular de integrina.

15 El grado de alteración entre la secuencia original y sus derivados se limita inevitablemente por el requisito de reconocimiento de antígeno dentro del contexto estructural, particularmente en material FFPE. Se conocen un par de métodos por el experto en la técnica para generar péptidos y proteínas equivalentes, es decir, secuencias de aminoácidos que son de función análoga a aquella de la enseñanza inventiva al lograr los beneficios de la invención a un gran grado. Pueden surgir variaciones de las secuencias de aminoácidos que fundamentan el anticuerpo de la invención a partir de modificaciones (por ejemplo, alquilación, arilación o acetilación de al menos un aminoácido individual), de la incorporación de enantiómeros de la adición de al menos un aminoácido individual y/o fusión con otro péptido o una proteína. Las posibles mutaciones comprenden su supresión, inserción, sustitución, translocación y/o inversión. Las partes de las secuencias de aminoácidos y anticuerpos, respectivamente, se refieren a una restricción a aquellas regiones que son suficientes para la expresión de una función específica. Las partes del anticuerpo pueden ser muy pequeñas debido a la caracterización del paratopo, por ejemplo, que también se une a un antígeno con respecto al dominio extracelular de integrina. se distingue claramente entre partes de cualquier tamaño y secuencias homólogas; la homología de estas últimas se refiere a la secuencia completa. De manera preferente, la homología entre una secuencia original y sus derivados que tienen las mismas cantidades características de al menos 80 %, de manera más preferente al menos 95 %, de manera más preferente al menos 98 %. De manera similar, la homología se va a considerar si la parte mencionada anteriormente de cualquier tamaño se altera a una variante o mutante.

El objeto de la invención también es un polinucleótido que codifica para el anticuerpo de acuerdo a la invención. El término "polinucleótido" se refiere a un polímero natural o sintético de ADN o ARN de hebra individual o doble, que incluye de manera alternativa nucleótidos sintéticos, no naturales o modificados, que se pueden incorporar en polímeros de ADN o ARN. Cada nucleótido consiste de una porción de azúcar, una porción de fosfato, y ya sea un residuo de purina o pirimidina. Los ácidos nucleicos se pueden modificar opcionalmente como ADN de fosforotioato, ácido nucleico asegurado (LNA), ácido nucleico peptídico (PNA) o spiegelmer. El término "polinucleótido que codifica para" se refiere a aquella parte de un gen que encipta una proteína, un polipéptido o una parte del mismo. Se excluyen las secuencias y/o elementos reguladores que controlan el inicio o terminación de transcripción. La secuencia codificadora y/o el elemento regulador se pueden encontrar normalmente en las células, caso en el cual se refieren como autólogo o endogénico, o no se pueden localizar en las células, caso en el cual se refieren como heterólogo. El término "gen" denota una secuencia de ADN que codifica para proteína específica y elementos reguladores que controlan la expresión de esta secuencia de ADN. También un gen heterólogo se puede componer de elementos autólogos arreglados en un orden y/o en una orientación, que normalmente no se encuentra en esa célula, a la que se transfiere el gen. Un gen heterólogo se puede derivar completamente o de forma parcial de cualquier fuente conocida en la técnica, incluyendo un genoma o episoma bacteriano o viral, ADN plásmico o nuclear eucariótico, ADNc o ADN químicamente sintetizado. El gen estructural puede formar una región codificadora continua, o puede comprender uno o más intrones limitados por uniones de empalme adecuadas. El gen estructural puede consistir de elementos derivados de varias fuentes que se presentan de forma natural o sintética.

50 En una realización preferida de la presente invención, el polinucleótido que codifica para los anticuerpos de la invención comprende una o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo de SEQ ID NOs: 21 a 29 y 31 a 40, SEQ ID NOs: 61 a 69 y 71 a 80, SEQ ID NOs: 101 a 109 y 111 a 120, SEQ ID NOs: 141 a 149 y 151 a 160, SEQ ID NOs: 181 a 189 y 191 a 200 y SEQ ID NOs: 221 a 229 y 231 a 240. La enseñanza anterior de la presente especificación con respecto al anticuerpo y las secuencias específicas de aminoácidos del mismo se considera como válida y es aplicable sin restricción al polinucleótido y secuencias específicas de ácido nucleico si es conveniente.

Se puede proporcionar un vector que comprende el polinucleótido que codifica para el anticuerpo de acuerdo a la invención como se describe anteriormente. El término "vector" denota una construcción de ADN recombinante, que puede ser un plásmido, un virus, una secuencia autónomamente replicante, un fago, o una secuencia de nucleótidos, que es lineal o circular, que consiste de ADN o ARN de hebra individual o de doble hebra, en donde 60 varias secuencias de nucleótidos se enlazan o recombinan para formar una construcción única, y que es capaz de introducir un fragmento promotor y una secuencia de ADN de un producto genético seleccionado orientación

homosentido o antisentido en una célula, junto con secuencias no traducidas 3', adecuadas.

Se prefiere que un plásmido comprenda el polinucleótido que codifica para el anticuerpo de la invención, de manera particular para clonar y expresar genes recombinantes del anticuerpo descrito aquí. Los plásmidos son elementos genéticos que se heredan de forma estable sin que sean parte del cromosoma de su célula hospedadora. Pueden comprender ADN o ARN, y pueden ser tanto lineales como circulares. Los plásmidos codifican para moléculas que aseguran su replicación y herencia estable durante la replicación celular. Los plásmidos de inicio descritos en la presente especificación están ya sea comercialmente disponibles, son accesibles al público, o se puede construir de plásmidos disponibles por uso rutinario de métodos publicados, bien conocidos. Muchos plásmidos y otros vectores de expresión de clonación, que se pueden usar de acuerdo a la invención, son bien conocidos y están fácilmente disponibles al experto en la técnica. Adicionalmente, un experto en la técnica puede construir fácilmente cualquier número de otros plásmidos adecuados para el uso en esta invención.

El vector debe ser adecuado para la introducción de células hospedadoras. Por consiguiente, se puede proporcionar una célula hospedadora que comprende el vector con el polinucleótido que codifica para el anticuerpo de manera preferente a las células procarióticas o eucarióticas aisladas, pero también debe cubrir cultivos celulares, tejidos, órganos, y similares, y aún organismos, que comprenden la célula hospedadora, incluyendo un vector descrito anteriormente. El término "célula hospedadora" denota una célula que ha modificado genéticamente por la transferencia de una secuencia de ácido nucleico quimérica, heteróloga o autóloga o derivados de la misma que incluyen dicha secuencia. Estas células también se refieren como células transgénicas. Donde se transfiere una secuencia de ácido nucleico autóloga, el número de copias de esta secuencia en la célula hospedadora es mayor que aquel de las secuencias que se presentan de manera natural.

En la invención, un inmunógeno recombinante que consiste de un dominio extracelular de integrina con patrón de glicosilación derivado de insecto, en donde el dominio extracelular se acopla como forma de delta-trans-membrana (DTM) es capaz de provocar una respuesta inmunitaria adaptable si se inyecta en sí mismo en un conejo. El inmunógeno de la invención tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 10, 90, 130, 170 o 210. Un polinucleótido que codifica para dichos inmunógenos de la invención tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NOs: 30, 110, 150, 190 o 230. Se puede proporcionar un vector que comprende el polinucleótido que codifica para el inmunógeno descrito aquí. También se puede proporcionar una célula hospedadora que comprende el vector con el polinucleótido que codifica para el inmunógeno descrito aquí. La enseñanza anterior de la presente especificación que se refiere a los anticuerpos, polinucleótidos que codifican para el anticuerpo, o vectores, células hospedadoras o similares, es válida y aplicable sin restricción al inmunógeno para elevar dichos u otros anticuerpos, si es apropiado. Es válida y aplicable sin restricciones al inmunógeno para elevar dichos u otros anticuerpos, si es apropiado.

Un método para preparar anticuerpos monoclonales comprende los siguientes pasos: (a) expresar de manera recombinante un dominio extracelular de integrina en células de insecto; (b) purificar el dominio extracelular expresado, (c) inmunizar un conejo con el dominio extracelular de integrina purificado; (d) tomar antisuero policlonal que comprende anticuerpos policlonales del conejo; y (e) preparar anticuerpos monoclonales. De manera más preferente, el método se refiere a la preparación de anticuerpos monoclonales de la invención como se describe en detalle anteriormente.

La expresión de proteína del paso (a) es una materia de rutina para el experto en la técnica quien tiene acceso a varias células insectíles apropiadas, líneas de células insectíles y maneras para transfectarlas. Por ejemplo, la línea de células insectíles BT1-Tn5B1-4 (High Five) infectada con un baculovirus recombinante ha ganado uso extendido dentro del sistema de expresión de baculovirus/célula insectil debido a que se producen muchas proteínas recombinantes segregadas a velocidades considerablemente mayores que en líneas celulares derivadas de *Spodoptera frugiperda*, tal como Sf9. Para optimizar el rendimiento del dominio extracelular de integrina el sistema de expresión de baculovirus/células de insecto se pueden realizar fácilmente experimentos con cultivos adaptados en suspensión de células High Five para investigar los efectos del estado de la célula hospedadora, multiplicidad de infección, densidad celular en el momento de la infección y complementación del medio con nutrientes y oxígeno. Estos procedimientos son el estado de la técnica y se publican, por ejemplo, por Vallazza & Petri, *Cytotechnology* 1999, 29: 85-92, o Mehta et al., *Biochem J* 1998, 330: 861-869.

Si se expresa en células insectíles de acuerdo al paso (e), los dominios extracelulares de integrina tienen un patrón de glicosilación aberrante defectuoso que difiere del patrón de glicosilación en células mamíferas maduras. Puesto que las integrinas se glicosilan de forma extensiva, es decir, más de 10 % en masa, esto significa que la proteína insectil es más divergente de las integrinas nativas de conejo producidas en sistemas mamíferos. El inmunógeno derivado de insecto conduce a una inmunogenicidad mayormente mejorada y más fuerte respuesta de anticuerpos a los elementos de proteína de dicho inmunógeno.

La purificación de proteína, la inmunización de mamífero y extracción de suero de los pasos (b) a (d) sigue técnicas bien conocidas y una buena práctica de laboratorio, tal como se describe en el transcurso de la especificación y en los ejemplos. Los sueros del paso (d) se prueban de manera subsiguiente para la presencia de policlonales, y los anticuerpos detectados se examinan para el reconocimiento del antígeno. Las pruebas y exámenes adecuados están disponibles para los expertos en la técnica.

La preparación de anticuerpos se continúa a las especies de anticuerpos idénticos, mono-específicos, es decir, monoclonales del paso (e). Típicamente los anticuerpos monoclonales se producen al fusionar células del mieloma con las células de bazo del mamífero que se ha inmunizado de acuerdo al paso (c). Un medio de HAT selectivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina se usa de manera particular en el cual sólo pueden crecer células fusionadas. Los llamados hibridomas entonces se diluyen y se cultivan clones de células progenitoras individuales en concavidades de microtítulo. Los anticuerpos segregados por los diferentes clones se prueban para su capacidad para unirse al antígeno del dominio extracelular de integrina. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención se preparan especialmente por el método posterior.

El objeto de la invención también son los anticuerpos obtenidos por inmunización de un conejo con un dominio extracelular o citoplásmico de integrina recombinante expresado en células insectiles. Puesto que el inmunógeno de la invención se puede usar para formular anticuerpos, la invención se refiere de manera particular a anticuerpos monoclonales obtenidos al inmunizar un conejo con el inmunógeno y/o polinucleótido, cada uno de acuerdo a la invención, tomando antisuero policlonal con anticuerpos policlonales y preparando los anticuerpos monoclonales. La enseñanza anterior de la presente especificación con respecto al inmunógeno y el método para preparar anticuerpos de conejo, se debe considerar como válida y aplicable sin restricciones al producto de anticuerpo como se produce por este proceso, como sea apropiado.

Es todavía otro objeto usar el anticuerpo de la invención para la detección de integrinas en material incrustado en parafina fijado con formalina (FFPE). A la fecha, no hay anticuerpos monoclonales clásicos dirigidos a integrinas y que reaccionen de forma específica y en forma confiable con los complejos en material FFPE. Sólo los anticuerpos de la invención, particularmente monoclonales de conejo, tienen una alta afinidad y especificidad, lo que permite la detección de epítomos no ocluidos de integrinas. Los términos "no ocluido" y "expuesto", que se usan de manera indistinta en la presente, se toman como que significan la confirmación molecular de un antígeno en el cual se pueden reconocer los epítomos por un anticuerpo. Por lo tanto, se observa el mismo patrón de tinción si se comparan los anticuerpos de la invención en material FFPE con monoclonales murinos en material congelado. Además, se observa sustancialmente el mismo patrón de tinción si se comparan los anticuerpos de la invención en material FFPE, formas aisladas de integrina en ELISA y/o el estado nativo de integrina en células viables.

En una realización preferida de la invención, el material FFPE es un tejido. El tejido FFPE es una pieza de tejido que se separa primero de un espécimen de animal por disección o biopsia. Entonces, este tejido se fija a fin de impedir que se descomponga o de impedir la degeneración y de examinar claramente bajo un microscopio para estudios histológicos, patológicos o citológicos. La fijación es el proceso por el cual se inmoviliza el tejido, se aniquila o se conserva para el propósito de tinción y se ve bajo un microscopio. El procesamiento post-fijación hace permeable al tejido a los reactivos de tinción y retícula sus macromoléculas de modo que se establezca y asegure en su posición. Se usan muchos fijadores para este propósito, por ejemplo, solución de Bouine, formalina o nitrógeno líquido. Este tejido fijado entonces se incrusta en la cera para permitirle que se corte en secciones delgadas y se tiña con hematoxilina y tinción con eosina. Después de eso, se hace proceso en micrótomos al cortar secciones finas para estudiar la tinción con anticuerpos bajo el microscopio.

En una realización más preferida de la invención, el tejido FFPE es un tejido tumoral, de manera más preferente tejido tumoral humano. El tumor se selecciona de manera particular del grupo de tumores de epitelio escamoso, vejiga, estómago, riñones, cabeza, cuello, esófago, cérvix, tiroides, intestino, hígado, cerebro, próstata, tracto urogenital, sistema linfático, estómago, laringe y/o pulmón. El tumor se selecciona además de forma particular del grupo de adenocarcinoma de pulmón, carcinomas pulmonares de células pequeñas, cáncer pancreático, glioblastomas, carcinoma de colon y carcinoma de mama. Además, se da preferencia a un tumor de la sangre y sistema inmunitario, de manera más particular a un tumor seleccionado del grupo de leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfática aguda y/o leucemia linfática crónica. Estos tumores también se pueden diseñar como cánceres, en el significado de la invención.

El anticuerpo de la invención se incuba con el material FFPE para detección de integrinas. El término "incubación" denota la puesta en contacto del material FFPE con el anticuerpo de la invención durante un periodo distinto, que depende de la clase de material, anticuerpo y/o antígeno. El proceso de incubación también depende de varios parámetros diferentes, por ejemplo, la sensibilidad de detección, optimización que sigue procedimientos de rutina conocidos por el experto en la técnica. La adición de soluciones químicas y/o la aplicación de procedimientos físicos, por ejemplo, impacto de calor, puede mejorar la accesibilidad de las estructuras objetivo o diana en la muestra. Se forman productos de incubación específicos como resultado de la incubación.

Las pruebas adecuadas para la detección de complejos de anticuerpo/antígeno, formados, se conocen por los expertos en la técnica o se pueden diseñar fácilmente como materia de rutina. Se conocen muchos tipos diferentes de ensayos, los ejemplos de los cuales se exponen más adelante. Aunque el ensayo de acuerdo a la invención puede ser cualquier ensayo adecuado para detectar y/o cuantificar la expresión de integrinas, este último se determina de manera preferente por medio de sustancias que interactúan de manera específica con el anticuerpo primario de la invención.

El término "sustancias específicas" como se usa en la presente comprende moléculas con alta afinidad al anticuerpo anti-integrina de la invención a fin de asegurar una unión confiable. Las sustancias son preferentemente específicas

a partes del anticuerpo, por ejemplo regiones constantes, particularmente regiones constantes de conejo, de manera más particular un fragmento F_c, si lo hay. Hay un número distinto de anticuerpos específicos contra anticuerpos de conejo existentes. Las partes representan una restricción a aquellas regiones que son suficientes para la expresión de una función específica, es decir, la provisión de un determinante estructural para el reconocimiento. El término "reconocimiento" - sin que se limite a esto, - se refiere a cualquier tipo de interacción entre las sustancias específicas y el anticuerpo objetivo o diana, particularmente unión o asociación covalente o no covalente, tal como un enlace covalente, interacciones hidrófobas/hidrófilas, fuerzas de van der Waals, pares iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones ligando-receptor, interacciones entre epítipo y sitio de unión a anticuerpo, apareamiento de bases de nucleótidos y similares. Esta asociación también puede abarcar la presencia de otras moléculas tal como péptidos, proteínas u otras secuencias de nucleótidos.

Las sustancias específicas se componen de estructuras biológicas y/o químicas capaces de interactuar con la molécula objetivo de una manera tal que se haga un reconocimiento, unión o interacción posible. En particular, las sustancias se seleccionan del grupo de proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, polímeros y moléculas pequeñas que tienen un peso molecular entre 50 y 1.000 Da, de manera preferente proteínas y ácidos nucleicos. Las sustancias específicas expresan sensibilidad y especificidad suficiente a fin de asegurar la detección confiable. Una sustancia específica tiene al menos una afinidad de 10⁻⁷ M para el anticuerpo anti-integrina. La sustancia específica tiene de manera preferente una afinidad de 10⁻⁸ M o aún más preferido de 10⁻⁹ M para su molécula objetivo. Como lo apreciará el experto en la técnica, el término específico se usa para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen de forma específica a la sustancia específica para el anticuerpo anti-integrina. De manera preferente, el nivel de unión a una biomolécula diferente de la molécula objetivo da por resultado una afinidad de unión de sólo 10 % de la afinidad de la molécula objetivo, de manera más preferente sólo 5 % o menos. De manera más preferente, las sustancias son mono-específicas a fin de garantizar una interacción exclusiva y dirigida con el anticuerpo anti-integrina, primario, elegido de la invención. Una sustancia específica altamente preferida cumplirá tanto los criterios mínimos anteriores para afinidad, así como para especificidad.

Las proteínas o péptidos se seleccionan de manera preferente del grupo que consiste de anticuerpos, citocinas, lipocalinas, receptores, lectinas, avidinas, lipoproteínas, glicoproteínas, oligopéptidos, ligandos peptídicos y hormonas peptídicas. De manera más preferente, se usan anticuerpos como la sustancia específica. Los ácidos nucleicos son de manera preferente ARN o ADN de hebra individual o de doble hebra, cebadores, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, enzimas de ADN, aptámeros y/o ARNs, o partes de estos. Las sondas de ácido nucleico más preferidas son aptámeros, de manera más preferente aptámeros de ARN puesto que el grupo 2'-hidroxilo disponible en el ARN promueve un par de contactos intra- e inter-moleculares. Se pueden sintetizar aptámeros usando química normal de fosforamidita. Además, los aptámeros de ARN que tienen más de aproximadamente 30 nucleótidos se pueden sintetizar de forma favorable en grandes cantidades por transcripción *in vitro*. La selección, síntesis y purificación de aptámeros es bien conocida por los expertos en la técnica.

Las sustancias específicas se pueden marcar; al hacerlo así, la marcación depende de las características inherentes de sustancias específicas y de los productos de incubación específicos que se van a monitorizar, así como el método de detección que se va a aplicar, es decir, de la sensibilidad requerida, facilidad de conjugación, requisitos de estabilidad e instrumentación disponible y provisiones de disposición. Un método de marcación no se limita de manera particular, en tanto que sea detectable fácilmente una marca. Una "sustancia específica marcada" es una que está unida, ya sea de forma covalente a través de un ligador o un enlace químico, o de manera no covalente a través de enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos, interacciones hidrófobas o enlaces de hidrógeno, a una marca tal que la presencia del anticuerpo anti-integrina de la invención se puede detectar al detectar la presencia de la marca.

La unión inmunológica específica de un anticuerpo a una proteína se puede detectar directamente o de forma indirecta. Más adelante en la presente, el par anticuerpo-a-proteína se debe entender que incluye ya sea el anticuerpo primario de la invención dirigido a la integrina o un anticuerpo secundario dirigido al anticuerpo anti-integrina primario. Los ejemplos preferidos de métodos adecuados de detección de acuerdo a la presente invención son luminiscencia, particularmente fluorescencia, adicionalmente coloración VIS y/o emisión radioactiva.

La luminiscencia se refiere a la emisión de luz como resultado de quimioluminiscencia, bioluminiscencia o fotoluminiscencia. La quimioluminiscencia comprende la emisión de luz visible como resultado de una reacción química, en tanto que la bioluminiscencia requiere la actividad de luciferasa. La fotoluminiscencia actualmente preferida, que también se conoce como estimulación de fluorescencia, se provoca por la absorción de fotones, preferentemente provistos por radiación, que se liberan nuevamente como fotón con un cambio en la longitud de onda de 30 a 50 nm y dentro de un período de aproximadamente 10⁻⁸ segundo. Los instrumentos para la detección de fluorescencia incluyen, pero no se limitan a fluorómetros típicos de banco, lectores de placa de múltiples cavidades de fluorescencia, fluorómetros de fibra óptica, microscopios de fluorescencia y sistemas de microchip/microfluidos acoplados con detección de fluorescencia.

La coloración VIS denota la visualización de cualquier sustancia acromática a fin de que sea visible a simple vista. De manera preferente, la intensidad de la coloración se mide por un fotómetro.

La radiación radioactiva de isótopos se mide por escintilación. El proceso de escintilación líquida comprende la

detección de descomposición beta dentro de una muestra mediante la captura de emisiones beta en un sistema de solventes orgánicos y solutos referidos como el cóctel de escintilación. El electrón de descomposición beta emitido por isótopos radioactivos tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P y ^{35}S en la muestra excita la molécula de solvente que a su vez transfieren la energía al soluto. La emisión de energía del soluto (el fotón de luz) se convierte en una señal eléctrica por un tubo fotomultiplicador dentro de un contador de escintilación. El cóctel también debe actuar como un agente solubilizante que mantiene una suspensión uniforme de la muestra. Los fotones de rayos gamma surgen frecuentemente como resultado de otros procesos de descomposición (descomposición en serie) para librar el núcleo recién formado de energía en exceso. No tienen masa y producen poca ionización directa si es que la hay por colisión a lo largo de su ruta. Los fotones gamma se absorben para detección y cuantificación por uno o más de tres mecanismos: el efecto Compton, el efecto fotoeléctrico y producción de pares. Un efecto de descomposición gamma favorable de la presente invención es ^{125}I .

Los marcadores directos incluyen etiquetas fluorescentes o luminiscentes, metales, tintes, radio nucleidos, y similares, unidos al anticuerpo. Se puede usar un anticuerpo marcado con yodo-125 (^{125}I). Un ensayo de quimioluminiscencia que usa un anticuerpo quimioluminiscente específico para la proteína es adecuado para detección sensible no radioactiva de niveles de proteína. También es adecuado un anticuerpo marcado con fluorocromo. Los ejemplos de fluorocromo se incluyen, sin limitación, de DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficoeritrina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas, y lisamina.

Los marcadores indirectos incluyen diversas enzimas bien conocidas en la técnica, tal como peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β -galactosidasa, ureasa y similares. El enlace covalente de un anticuerpo anti-integrina a una enzima se debe realizar por diferentes métodos, tal como el acoplamiento con glutaraldehído. Ambos, la enzima y el anticuerpo se entrelaza con glutaraldehído mediante grupos amino libres, y los subproductos de las enzimas y anticuerpos en red se remueven. En otro método, la enzima se acopla al anticuerpo mediante residuos de azúcar si es una glicoproteína, tal como peroxidasa. La enzima se oxida por periodato de sodio y se entrelaza directamente con grupos amino del anticuerpo. Otra enzima que contiene carbohidratos también se puede acoplar al anticuerpo de esta manera. Se puede realizar el acoplamiento enzimático al entrelazar los grupos amino del anticuerpo con grupos tiol libre de una enzima, tal como β -galactosidasa, usando un ligador heterobifuncional, tal como hexanoato de succinimidil-6-(N-maleimido). El sistema de detección de peroxidasa de rábano se puede usar, por ejemplo, con el substrato cromogénico tetrametilbenzidina (TMB), que produce un producto soluble en la presencia de peróxido hidrógeno que es detectable a 450 nm. El sistema de detección de fosfatasa alcalina se puede usar con el substrato cromogénico fosfato de p-nitrofenilo, por ejemplo, que produce un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. De manera similar, se puede usar en el sistema de detección de β -galactosidasa con el substrato cromogénico y o-nitrofenil- β -D-galactopiranoxido (ONPG), que produce un producto soluble detectable a 410 nm. Se puede usar un sistema de detección de ureasa con un substrato, tal como urea-bromocresol púrpura.

En una realización preferida de la presente invención, los anticuerpos se marcan con porciones detectables, que incluyen, pero no se limitan a, radionucleidos, tintes fluorescentes, por ejemplo, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Verde Oregon^{MR}, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetraodimina (TRITC), Cy3, Cy5, etc., marcadores fluorescentes, por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), ficoeritrina, etc., compuestos fluorescentes auto-extinguidos que se activan por proteasas asociadas a tumor, enzimas, por ejemplo, luciferasa, HRP, AP, etc., nanopartículas, biotina, digoxigenina, y similares.

En otra realización preferida de la presente invención, los ácidos nucleicos se marcan con digoxigenina, biotina, sustancias de quimioluminiscencia, tintes de fluorescencia, cuentas magnéticas, cuentas metálicas, partículas coloidales, reactivos electrodensos, enzimas: todos ellos son bien conocidos en la técnica, o isótopos radioactivos. Los isótopos preferidos para marcar ácidos nucleicos en el alcance de la invención son ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S o ^{125}I , más preferido ^{32}P , ^{33}P o ^{125}I .

Se puede usar una variedad de técnicas de inmunoensayo, que incluyen inmunoensayos competitivos y no competitivos. El término "inmunoensayo" abarca técnicas que incluyen sin limitación, citometría de flujo, FACS, inmunoensayos enzimáticos (EIA), tal como técnica de inmunoensayo multiplicado por enzima (EMIT), ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima (ELISA), ELISA de captura de anticuerpo tipo IgM (MAC ELISA) e inmunoensayo enzimático de micropartículas (MEIA), inmunoensayos de electroforesis capilar adicional (CEIA), radio-inmunoensayos (RIA), ensayos inmunoradiométricos (IRMA), inmunoensayos de polimerización de fluorescencia (FPIA) y ensayos de quimioluminiscencia (CL). Si se desea, estos inmunoensayos se pueden automatizar. También se pueden usar inmunoensayos en unión con fluorescencia inducida por láser. Los inmunoensayos de liposoma, tal como inmunoensayos de liposomas de inyección de flujo e inmunosensores de liposomas, también son adecuados para el uso en la presente invención. Además, los ensayos de nefelometría, en los cuales la formación de complejos de proteína/anticuerpo dan por resultado dispersión incrementada de luz que se convierte a una señal de velocidad pico como una función de la concentración del marcador, son adecuados para el uso en los métodos de la presente invención. En una realización preferida de la presente invención, los productos de incubación se detectan por ELISA, RIA, fluoro-inmunoensayo (FIA) o inmunoensayo de partículas solubles (SPIA).

El componente de los ELISA son enzimas que están unidas a un compañero de la reacción inmunológica. El

antígeno trazador (derivado de analito) de integrina se marca preferentemente en el ELISA competitivo usando un anticuerpo de captura individual (más adelante en la presente referido como primario), en vista de que el anticuerpo se marca de manera preferente en el ELISA no competitivo, que comprende preferentemente la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo por un segundo anticuerpo (referido más adelante en la presente como secundario).

5 Los complejos que consisten de antígeno y dos anticuerpos también se llaman complejos de intercalación. La detección comprende la conversión enzimática subsiguiente de un sustrato a un producto, de manera preferente, un producto coloreado, que se reconoce por coloración visual, bioluminiscencia, o fluorescencia o la medición de señales eléctricas (electrodo enzimático). Las enzimas favorables para marcación en la presente invención se conocen por el experto en la técnica, tal como peroxidasa (por ejemplo, HRP), cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT), proteína fluorescente verde (GFP), glutationa-S-transferasa (GST), luciferasa, β -galactosidasa y AP.

10 Adicionalmente preferidos son los inmunoensayos radioactivos que utilizan isótopos radioactivos que ya sea se incorporan en un reactivo inmunitario durante la síntesis o se acoplan de forma subsiguiente a un reactivo inmunitario del ensayo, preferentemente a un anticuerpo.

Los anticuerpos, que se marcan de forma favorable con fluoróforos, se usan en FIA.

15 SPIA utiliza el cambio de color de la partícula de plata como resultado de la aglutinación. No se requieren ningún anticuerpo secundario ni una reacción indicadora para hacerlo particularmente útil en el alcance de la presente invención. De manera similarmente favorable es la prueba de aglutinación de látex que usa anticuerpos que se unen a partículas coloreadas de látex. Sin embargo, requiere una fuerte inmovilización de integrina para remover antígeno no unidos y/o no específicamente unidos en pasos previos de lavado.

20 En general, todos los métodos de detección incluyen pasos de lavado intensivo para separar anticuerpos no unidos del complejo de integrina/anticuerpo. Adicionalmente, el procedimiento experimental de cualquier método de detección es bien conocido por los expertos en la técnica.

Una señal de la marca directa o indirecta se puede analizar, por ejemplo, usando un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromogénico, usando un contador de radiación para detectar la radiación, tal como un contador gama para la detección de ^{125}I , o usar un fluorómetro para detectar la fluorescencia en la presencia de luz de una cierta longitud de onda. Para la detección de anticuerpos enlazados a enzimas, se puede hacer un análisis cuantitativo usando un espectrofotómetro, tal como un Lector de Microplaca EMAX Reader (Molecular Devices; Menlo Park, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si se desea, los ensayos de la presente invención se pueden automatizar o realizar de forma robótica, y se puede detectar de forma simultánea la señal de múltiples muestras.

25 Opcionalmente se procesan de forma adicional imágenes ópticas vistas y registradas ópticamente por una cámara u otro dispositivo de grabación (por ejemplo un fotodiodo y dispositivo de almacenamiento de datos) en cualquiera de las realizaciones de la presente, por ejemplo, al digitalizar la imagen y al almacenar y analizar la imagen en un ordenador. Una variedad de equipo periférico comercialmente disponible y software está disponible para digitalizar, almacenar y analizar un video digitalizado o una imagen óptica digitalizadas. Un sistema convencional lleva luz desde el campo del espécimen a una cámara de un dispositivo acoplado a carga (CCD) coloreado, en uso común en la técnica. Una cámara CCD incluye un arreglo de elementos de imagen (píxeles). La luz del espécimen se forma en imagen en el CCD. Los píxeles particulares que corresponden a las regiones del espécimen se muestrean para obtener lecturas de intensidad de luz para cada posición. Se procesan múltiples píxeles en paralelo para incrementar la velocidad. El aparato y los métodos de la invención se usan fácilmente para ver cualquier muestra, por ejemplo, por técnicas microscópicas de campo oscuro o fluorescente.

30 En una realización preferida de la invención, los clones de hibridoma de conejo que consisten de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 99 (L- $\alpha\text{v}\beta 3$) y SEQ ID NO: 100 (H- $\alpha\text{v}\beta 3$), que se generan contra DTM- $\alpha\text{v}\beta 3$ de SEQ ID NO: 90, para producir anticuerpos adecuados para tejido FFPE. Se unen selectivamente a $\alpha\text{v}\beta 3$. En otra realización preferida de la presente invención, los clones de hibridoma de conejo que consisten de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (L- $\alpha\text{v}\beta 5$) y SEQ ID NO: 20 (H- $\alpha\text{v}\beta 5$), que se generan contra DTM- $\alpha\text{v}\beta 5$ de SEQ ID NO: 10, producen anticuerpos adecuados para tejido FFPE. Se unen selectivamente a $\alpha\text{v}\beta 5$. En aún otra realización preferida de la presente invención, los clones de hibridoma de conejo que consisten de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 (L- $\alpha\text{v}\beta 6$) y SEQ ID NO: 140 (H- $\alpha\text{v}\beta 6$), que se generan contra DTM- $\alpha\text{v}\beta 6$ de SEQ ID NO: 130, producen anticuerpos adecuados para tejido FFPE. Se unen selectivamente a $\alpha\text{v}\beta 6$. En aún otra realización preferida de la presente invención, los clones de hibridoma de conejo que consisten de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 179 (L- $\alpha\text{v}\beta 8$) y SEQ ID NO: 180 (H- $\alpha\text{v}\beta 8$), que se generan contra DTM- $\alpha\text{v}\beta 8$ de SEQ ID NO: 170, producen anticuerpos adecuados para tejido FFPE. Se unen de forma selectiva $\alpha\text{v}\beta 8$. En aún otra realización preferida de la presente invención, los clones de hibridoma de conejo que consisten de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 219 (L- αv) y SEQ ID NO: 220 (H- αv), que se generan contra DTM- αv de SEQ ID NO: 210, producen anticuerpos adecuados para tejido FFPE. Se unen de forma selectiva αv . En aún otra realización preferida de la invención, los clones de hibridoma de conejo que consisten de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 (L- $\beta 3$) y SEQ ID NO: 60 (H- $\beta 3$), que se generan contra el inmunógeno $\beta 3$ de SEQ ID NO: 50, producen anticuerpos adecuados para tejido FFPE. Se unen de forma selectiva $\beta 3$. Sin embargo, se deben entender que se puede aplicar para el uso inventivo cualquier secuencia alternativa o combinaciones de esta como se

60

describe en la presente especificación. La enseñanza anterior de la presente especificación con respecto a los anticuerpos y secuencias de aminoácidos de los mismos se considera como válida y aplicable sin restricción al uso si es conveniente.

Adicionalmente, la invención se puede practicar como un kit que comprende el anticuerpo, polinucleótido, vector o célula hospedadora, cada uno de ellos de acuerdo a la presente aquí, a fin de realizar el uso inventivo de detectar integrinas en material FFPE. De manera particular, los anticuerpos se pueden incorporar en un kit de detección de diagnóstico para caracterizar el perfil de integrina, por ejemplo la integrina αv u otros perfiles de expresión a integrina de tumores u otras patologías humanas, y especialmente en material FFPE de archivo. El kit puede incluir un artículo que comprende instrucciones escritas o dirige al usuario a instrucciones escritas de como practicar el uso de la invención. El kit puede comprender además una porción indicadora o un aparato indicador. La enseñanza anterior de la presente especificación con respecto a los ingredientes del kit y los usos de los mismos se considera como válida y aplicable sin restricciones al kit si es conveniente.

En el alcance de la presente invención, se han proporcionado anticuerpos por primera vez, que permiten la detección validada de integrinas en material FFPE de pacientes de archivo, tal como biopsias de tumor, y también por citometría de flujo de células vivas (FACS). Los patrones de tinción en FACS corresponden a los patrones obtenidos con los anticuerpos monoclonales pertinentes conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo LM609 para $\alpha v\beta 3$; P1F6 para $\alpha v\beta 5$). Se muestra que los anticuerpos de la invención detectan las integrinas respectivas no solo en el material FFPE, sino también en su estado nativo en células viables. Las integrinas, particularmente $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ o $\alpha v\beta 8$ son objetivos terapéuticos primarios que no se pueden visualizar de forma confiable en material de biopsia FFPE de rutina antes de la presentación de esta solicitud. Los anticuerpos fuertes de la invención tienen el potencial de reconocer sus objetivos de integrinas en material FFPE de archivo en patrón de tinción idéntico a la distribución vista por anticuerpos monoclonales específicos de $\alpha v\beta 3$ -, $\alpha v\beta 5$ - o $\alpha v\beta 6$ conocidos en material crio-conservado, pero con la resolución espacial mucho mayor bien conocida y la calidad de conservación morfológica típica de FFPE versus material de crio-histología. Los monoclonales de conejo no se originan simplemente de otras especies, sino que estos RabMabs se proporcionan favorablemente por poseer especificidad, reproducibilidad y eternidad (es decir, el mismo reactivo y la misma especificidad por siempre). Los RabMabs, que se generan al usar los clones $\alpha vLJ3$ o $\alpha v\beta 5$, reconocen $\alpha v\beta 3$ o $\alpha v\beta 5$ de archivo en tumores humanos en patrones de tinción idénticos a material crio-fijado teñido con el anticuerpo anti- $\alpha v\beta 3$ clásico LM609 o el anticuerpo anti- $\alpha v\beta 5$ PIF6. Aunque los anticuerpos producidos a continuación, funcionan principalmente en integrinas FFPE, también se pueden usar en ELISA en integrinas aisladas, para citometría de flujo en poblaciones de células vivas, o incluso tienen otras aplicaciones bioquímicas estándar. Los anticuerpos proporcionan un puente de validación inusual y valioso entre las patologías humanas observadas y la bioquímica de los receptores.

La invención enseña la generación de anticuerpos anti-integrina al usar dominios purificados de integrina, de origen humano. El inmunógeno de la invención provoca altos títulos de anticuerpos en periodos cortos de inmunización. Los altos títulos de anticuerpo se reflejan por una alta dilución de suero que se obtiene después de la inmunización y se usa en ensayos. De manera simultánea, los efectos adversos que se pueden provocar por otros componentes de sueros se reducen en su mayor parte debido a su presencia diluida. El título se puede incrementar de forma ventajosa adicionalmente por producción de inmunógenos recombinantes de insectos que generan una divergencia en la glicosilación de las integrinas de conejo endógenas y altamente homólogas. Los anticuerpos y derivados de los mismos se caracterizan por una alta estabilidad de especificidad y expresión en sistemas de expresión de mamífero a una escala de producción industrial, bajos costos de producción y conveniente manejo. Estas características forman la base de una acción reproducible, en donde se incluyen la carencia de reactividad cruzada y de efectos adversos y para una interacción confiable y segura con sus estructuras de integrina de correspondencia. Puesto que los anticuerpos se pueden clonar en vectores de expresión, proporcionan una fuente absolutamente estable y reproducible de material para investigación y diagnóstico básico. Además, el kit apropiado se produce de forma eficiente en el coste.

Se va a entender que esta invención no se limita a los anticuerpos específicos, métodos particulares, usos y kits descritos en la presente, puesto que esta materia por su puesto puede variar. También se va a entender que la terminología usada en la presente es para el propósito de describir sólo realizaciones particulares y no se propone para que limiten el alcance de la presente invención, que sólo se define por las reivindicaciones anexas. Como se usa en la presente, incluyendo las reivindicaciones anexas, las formas singulares de las palabras tal como un "un", "una", y "el", "la" incluyen sus correspondientes referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye uno o varios anticuerpos diferentes, en tanto que la referencia a "anticuerpo" debe ser aplicable mutatis mutandis, y la referencia a "un método" incluye la referencia a pasos equivalentes y métodos conocidos por el experto en la técnica, y así sucesivamente. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por una persona experta en la técnica a la cual corresponde esta invención.

Las técnicas que son esenciales de acuerdo a la invención se describen en detalle en la especificación. Otras técnicas que no se describen en detalle corresponden a métodos normales conocidos que son bien conocidos por la persona experta en la técnica, o las técnicas se describen en más detalle en referencias citadas, solicitudes de

- patente o literatura normal. Otros microorganismos, líneas celulares, plásmidos, promotores, marcadores de resistencia, orígenes de replicación, y similares, que no se mencionan en la solicitud, están comercialmente disponibles. Puesto que no se dan otras sugerencias en la solicitud, se usan como sólo ejemplos, no se consideran que son esenciales de acuerdo a la invención, pero se pueden reemplazar por otras herramientas adecuadas y materiales biológicos. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente se pueden usar en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen ejemplos adecuados. Los siguientes ejemplos se proporcionan a manera de ilustración y no a manera de limitación. Dentro de los ejemplos, se usan reactivos y amortiguadores normales que están libres de actividades contaminantes (cuando quiera que sean prácticos). Los ejemplos son particularmente considerados tal que no se limitan a las combinaciones explícitamente demostradas de características, pero las características ejemplificadas se pueden combinar sin restricción nuevamente si se soluciona el problema técnico de la invención.
- 5 La Figura 1 muestran la tinción inmunohistoquímica de líneas de células de cáncer de FFPE (izquierda) y xenoinjertos (derecha) con sobrenadantes del subclón E3528-2-12 generado contra el dominio externo de $\alpha\beta 3$.
- 10 La Figura 2 muestra la tinción de membrana en plasma de células M21 en xenoinjertos con el clon E3528-2-7 del anticuerpo anti-integrina $\alpha\beta 3$ purificado.
- La Figura 3 muestra la tinción inmunohistoquímica de la línea de células de cáncer M21 (izquierda) y el xenoinjerto M21 (derecha) con los anticuerpos E3528-2-7, E3528-2-11 y E3528-2-12 anti- $\alpha\beta 3$ integrina purificados.
- La Figura 4 muestra el análisis de la tinción inmunohistoquímica con los anticuerpos E3528-2-7, E3528-2-11 y E3528-2-12 anti- $\alpha\beta 3$ con la ayuda de análisis de imagen (Ariol SL-50) y representación gráfica con Spotfire.
- 20 La Figura 5 muestra el análisis de la tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo $\alpha\beta 3$ _E3528-2-7 y el anticuerpo monoclonal 20H9 de ratón con la ayuda de análisis de imagen (Ariol SL-50). El clon 20H9 se dirige contra la cadena de $\beta 3$ -integrina. La "Expresión (%max)" se normaliza a la expresión de M21.
- La Figura 6 muestra la tinción de membrana en plasma de células M21 en xenoinjertos con los anticuerpos E3531-227-3 y E3531-229-3 anti- $\alpha\beta 3$ integrina purificados.
- 25 La Figura 7 muestra la tinción inmunohistoquímica de la línea de células de cáncer M21 (izquierda) y el xenoinjerto M21 (derecha) con los anticuerpos anti- $\alpha\beta 3$ integrina purificados del multiclón 227 (E3531-227-3, E3531-227-3 y E3531-227-6).
- La Figura 8 muestra el análisis de la tinción inmunohistoquímica con los anticuerpos anti- $\alpha\beta 3$ de los clones E3531-227 (por arriba) y en comparación al anticuerpo anti- $\beta 3$ monoclonal 20H9 de ratón (por abajo), calculado como % de la expresión en células M21. La expresión se analizó con la ayuda de análisis de imagen (Ariol SL-50).
- 30 La Figura 9 muestra la tinción inmunohistoquímica de línea de células de cáncer FFPE (izquierda) y xenoinjertos (derecha) con los sobrenadantes del subclón E3536-99-3 generados contra el dominio externo de $\alpha\beta 5$.
- La Figura 10 muestra el perfil de ELISA de anticuerpos E3531-227-3, E3531-229-3 y E3536-99-2 de hibridoma, monoclonales purificados contra dominios extracelulares humanos recombinantes de integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ y la plaqueta GPIIb/IIIa purificada de longitud completa.
- 35 La Figura 11 muestra la tensión de membrana en plasma de células A431 y HCT116 en xenoinjertos con el clon E3536-99-3 del anticuerpo anti-integrina $\alpha\beta 5$ purificado.
- La Figura 12 muestra la tinción inmunohistoquímica de la línea de células de cáncer U87MG (izquierda) y los xenoinjertos U87MG y A431 con los anticuerpos E3536-99-1, E3536-99-2 y E3536-99-3 anti-integrina $\alpha\beta 5$ purificados.
- 40 La Figura 13 muestra el análisis de la tinción inmunohistoquímica con los anticuerpos anti- $\alpha\beta 5$ E3536-99-1, E3536-99-2 y E3536-99-3 con la ayuda de análisis de imagen (Ariol SL-50) y representación gráfica con Spotfire.
- La Figura 14 muestra la tinción inmunohistoquímica de líneas de células de cáncer FFPE (izquierda) y xenoinjertos (derecha) con sobrenadantes del subclón E3866-52-1.
- 45 La Figura 15 muestra la tinción inmunohistoquímica de líneas de células de cáncer FFPE con el anticuerpo purificado del subclón E3866-52-1.
- La Figura 16 muestra la tinción inmunohistoquímica de línea de células de cáncer y xenoinjertos con el anticuerpo anti-integrina $\alpha\beta 6$, recombinantes.
- La Figura 17 muestra la tinción de membrana en plasma de células de carcinoma de próstata (por arriba) y células de carcinoma de colon HT29 en xenoinjertos con el anticuerpo anti-integrina $\alpha\beta 6$ recombinante.
- 50 La Figura 18 muestra el análisis de la tinción inmunohistoquímica (ejecución 3421) del anticuerpo anti- $\alpha\beta 6$ con la

ayuda de análisis de imagen (Ariol SL-50).

La Figura 19 muestra la reproducibilidad de portaobjetos a portaobjetos y de ejecución a ejecución con el anticuerpo recombinante anti- $\alpha\text{v}\beta 6$.

5 La Figura 20 muestra la tinción inmunohistoquímica de líneas de células de cáncer FFPE y xenoinjertos con sobrenadantes del subclón 133-9 anti- $\alpha\text{v}\beta 6$.

La Figura 21 muestra la tinción inmunohistoquímica de líneas de células de cáncer FFPE con el anticuerpo purificado del subclón E3875-133-9 anti- $\alpha\text{v}\beta 8$.

La Figura 22 muestra la tinción inmunohistoquímica de líneas de células de cáncer y xenoinjertos con el anticuerpo EM 13309 anti-integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ recombinante.

10 La Figura 23 muestra la tinción inmunohistoquímica de tejido humano con el anticuerpo EM 13309 anti-integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ recombinante.

La Figura 24 muestra la tinción de membrana en plasma de células de carcinoma de próstata (por arriba) y células de carcinoma de pulmón H1975 en xenoinjertos con el anticuerpo anti-integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ recombinante.

15 La Figura 25 muestra el análisis de la tinción inmunohistoquímica (ejecución 3422) del anticuerpo EM 13309 anti- $\alpha\text{v}\beta 8$ con la ayuda de análisis de imagen (Ariol SL-50).

La Figura 26 muestra la reproducibilidad de portaobjetos a portaobjetos y de ejecución a ejecución con el anticuerpo recombinante anti- $\alpha\text{v}\beta 8$ EM 13309.

La Figura 27 muestra la tinción inmunohistoquímica de líneas de células de cáncer FFPE y xenoinjertos con sobrenadantes del subclón E3875-13-9 anti- αv .

20 La Figura 28 muestra la tinción inmunohistoquímica de líneas de células de cáncer FFPE con el anticuerpo anti- αv purificado del subclón E3875-13-9.

La Figura 29 muestra la tinción inmunohistoquímica de líneas de células de cáncer y xenoinjertos con el anticuerpo recombinante anti- αv EM01309.

25 La Figura 30 muestra la tinción de membrana en plasma de células DU-145 (por arriba) y HT29 en xenoinjertos con el anticuerpo recombinante anti- αv EM01309.

La Figura 31 muestra el análisis de la tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo EM01309 anti- αv recombinante con la ayuda de análisis de imagen (Ariol SL-50).

La Figura 32 muestra la reproducibilidad de portaobjetos a portaobjetos y de ejecución a ejecución con el anticuerpo recombinante anti- αv EM01309.

30 La Figura 33 muestra la tinción de membrana en plasma de células M21 en xenoinjertos con el anticuerpo anti-integrina $\beta 3$ purificado, clon E3592-2-12.

La Figura 34 muestra la tinción inmunohistoquímica de la línea de células de cáncer M21 (izquierda) y el xenoinjerto M21 (derecha) con los anticuerpos anti-integrina $\beta 3$ purificados E3592-2-4, E3592-2-10 y E3592-2-12.

35 La Figura 35 muestra el análisis de la tinción inmunohistoquímica con los anticuerpos anti- $\beta 3$ E3592-2-4, E3592-2-10 y E3592-2-12 con la ayuda de análisis de imagen (Ariol SL-50) de la representación gráfica con Spotfire.

La Figura 36 muestra el análisis de la tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo $\beta 3$ _E3592-2-12 y el anticuerpo monoclonal de ratón 20H9 con la ayuda de análisis de imagen (Ariol SL-50). El clon 20H9 se dirige contra la cadena de $\beta 3$ -integrina. La "Expresión (%max)" se normaliza a la expresión de M21.

40 La Figura 37 muestra el perfil de ELISA de anticuerpos de hibridoma, monoclonales, purificados E3875-133-9, E3866-052-1 y E3875-013-9 de anti-integrina de conejo contra dominios extracelulares de αv -integrina humanos recombinantes y plaqueta gpiibiiia purificada de longitud completa.

La Figura 38 muestra el perfil de ELISA de anticuerpos monoclonales anti-integrina de conejo EBNA recombinantes EM22703, EM09902, EM00212, EM05201, EM13309 y EM01309 contra dominios extracelulares de αv -integrina humanos recombinantes y plaqueta gpiibiiia purificada de longitud completa.

45 La Figura 39 muestra el ensayo de inhibición de receptor para los anticuerpos RabMab EM22703, EM09902, EM00212 usando la biotina vitronectina como ligando.

La Figura 40 muestra la titulación de FACS EM022703 en M21.

La Figura 41 muestra la titulación de FACS EM009902 en A549.

La Figura 42 muestra la titulación de FACS de EM05202 en HT29.

La Figura 43 muestra la titulación de FACS de EM 13309 en células M24-met.

Ejemplo 1.- Generación de Inmunógenos

5 Ejemplo 1.1: Generación de dominios extracelulares $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ y $\alpha\beta 8$

10 Los dominios extracelulares de integrina, humanos, recombinantes, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ y $\alpha\beta 8$, se formularon en líneas de células de insecto (Hive Five) usando infección de baculovirus. El uso de la línea insectil como control negativo fue muy apropiado. Después de la fermentación, el procesamiento de etapa posterior comprendió los siguientes elementos: cromatografía en columna de afinidad <Mab 14D9> Toyopearl, diálisis con tubería de dializar Spectra/POR (6-8 kDa para DTM- $\alpha\beta 3$ y DTM- $\alpha\beta 5$; 25 kDa para DTM- $\alpha\beta 8$), concentración con Millipore TFF Labscale que tiene corte de 30 kDa (DTM- $\alpha\beta 5$ y DTM- $\alpha\beta 8$ únicamente), concentración con unidades de filtro centrífugo Amicon Ultra-15 que tienen corte de 30 kDa y filtración de 0.2 μm con Millex GV (DTM- $\alpha\beta 3$, DTM- $\alpha\beta 6$, DTM- $\alpha\beta 8$ únicamente).

15 Se disolvieron 22 mg de DTM- $\alpha\beta 3$ en amortiguador de $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})$ 50 mM, MnCl_2 0.2 mM, pH 7.4, para dar una concentración de proteína de 2.0 mg/ml. La solución concentrada se tomó en alícuotas subsiguientemente en 22 frascos de 500 μl . Se disolvieron 10.6 mg de DTM- $\alpha\beta 5$ en amortiguador de $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})$ 50 mM, MnCl_2 0.2 mM, pH 7.4, para dar una concentración de proteína de 2.36 mg/ml. La solución concentrada se tomó en alícuota subsiguientemente en 9 frascos de 500 μl . Se disolvieron 15 mg de DTM- $\alpha\beta 6$ en amortiguador de $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})$ 50 mM, MnCl_2 0.2 mM, pH 7.4, para dar una concentración de proteína de 2.36 mg/ml. Se disolvieron 16.6 mg de DTM- $\alpha\beta 8$ en amortiguador de $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})$ 50 mM, MnCl_2 0.2 mM, pH 7.4, para dar una concentración de proteína de 2.78 mg/ml.

25 Las alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . Se realizó el análisis por ensayo de BCA y SDS-page con tinción de Coomassie o Western Blot de acuerdo a la práctica experimental de rutina. Se usaron los siguientes anticuerpos para la detección de DTM- $\alpha\beta 3$ por Western Blot: Mab primario AP3 EMD 330515/CH000, 5 $\mu\text{g/ml}$, 2 h temperatura ambiente, e IgG anti-ratón de cabra secundario (H+L) x AP, Dianova, 115-055-062, 1:1000, 1 h temperatura ambiente, seguido por Precision Step Tractin x AP, BioRad, 161-0382, 1:5000. Se usaron los siguientes anticuerpos para la detección de DTM- $\alpha\beta 5$ por Western Blot: Mab primario <11D1> -CH004, 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 h temperatura ambiente, e IgG anti-ratón de cabra secundario (H+L) x AP, Dianova, 115-055-062, 1:1000, 1 h temperatura ambiente, seguido por Precision Step Tractin x AP, BioRad, 161-0382, 1:5000. Se usaron los siguientes anticuerpos para la detección de DTM- $\alpha\beta 6$ por Western Blot: Mab primario 442-5C4 x Biotina <hu-Integrina $\beta 6$ > 330510/CH001, 2 $\mu\text{g/ml}$, 2 h temperatura ambiente, y x AP anti-biotina secundario Sigma A-7064, 1:2500, 2 h temperatura ambiente, seguido por Precision Step Tractin x AP, BioRad, 161-0380, 1:5000. Se usaron los siguientes anticuerpos para la detección de DTM- $\alpha\beta 8$ por Western Blot: Mab primario LM 142 x Biotin Pool A 269A07H1.G01, 5 $\mu\text{g/ml}$, 2 h temperatura ambiente, e IgG anti-ratón de cabra secundario (H+L) x AP, Dianova, 115-055-062, 1:1000, 1 h temperatura ambiente, seguido por Precision Step Tractin x AP, BioRad, 161-0382, 1:5000, 1 h temperatura ambiente.

40 Los inmunógenos se caracterizaron como biológicamente activos y específicos por su capacidad para unirse a sus sustratos cognados, por ejemplo, vitronectina ($\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$) y fibronectina ($\alpha\beta 3$). Estas preparaciones se reconocen como una norma de oro para fidelidad estructural de integrina (Mehta et al., Biochem J 1998, 330: 861-869; Xiong et al., Science 2001, 294: 339-345). Los dominios extracelulares de integrina humana recombinante DTM- $\alpha\beta 3$, DTM- $\alpha\beta 5$, DTM- $\alpha\beta 6$ y DTM- $\alpha\beta 8$ se usaron como inmunógenos.

Ejemplo comparativo 1.2: Generación de Dominio Citoplásmico $\beta 3$

45 El dominio citoplásmico de $\beta 3$ -integrina humana, fusionado a GST se produjo en *E. coli* BL21 y se purificó como una proteína de fusión recombinante como inmunógeno. Después de la fermentación, el procesamiento de etapa posterior comprendió los siguientes elementos: lisis celular, prensa Francesa, preparación de cuerpo de inclusión, replegado por diálisis y concentración. Se disolvieron 55 mg de proteína en amortiguador de carbonato de sodio 0.1 M, DTT 5 mM, pH 9.5, para dar una concentración de proteína de 1.27 mg/ml. La solución concentrada se tomó subsiguientemente en alícuotas en 2 frascos de 10 ml, 4 frascos de 5 ml y 4 frascos de 1 ml. Las alícuotas se filtraron (0.2 μm), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . Se realizó el análisis por ensayo Bradford y SDS-page con tinción de Coomassie o Western Blot de acuerdo a la práctica experimental de rutina. Se usaron los siguientes anticuerpos para la detección de $\beta 3$ por Western Blot: Anti-GST de Cabra primario, Amersham, No. 27-4577-01, 1:5000, 1h temperatura ambiente, e IgG Anti-Cabra de Conejo de Fragmento F(ab')₂ secundario (H+L) x AP, Dianova, 305-056-045, 1:1000, 1 h temperatura ambiente, seguido por Precision Step Tactin-AP Conjugate, BioRad, Nr. 161-0382, 1:5000.

55 Ejemplo 1.3: Generación de gpiiiiia

Se extrajo gpiibiiia humana de longitud completa de plaquetas humanas caducas usando el octilglucósido como se detalló anteriormente (Mitjans et al., J Cell Sci 1995, 108(Pt 8): 2825-38).

Ejemplo 2: Generación de Anticuerpos

5 La generación de anticuerpos monoclonales de conejo siguió un procedimiento de cuatro pasos: (A) inmunización de conejos y examen de sueros policlonales, (B) fusión para generar células de hibridoma y examen de sobrenadantes de múltiples clones, (C) subclonación y examen de sobrenadantes de subclones, y (D) clonación de ADNc de las inserciones codificadoras de anticuerpo, secuenciación e inserción en vectores de expresión de EBNA para permitir la producción de anticuerpos completamente definidos. Se analizaron sangres de conejo, sobrenadantes de hibridoma y anticuerpos purificados en ELISA contra inmunógenos purificados, inmovilizados, siguiendo protocolos normales. Los clones positivos se volvieron a probar por examen diferencial contra dominios extracelulares recombinantes de $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ y $\alpha\beta 8$ en la distribución, para confirmar la especificidad y actividad.

10 En el paso (A), se inmunizaron varios conejos por inmunógeno y se monitorizaron los títulos de antisueros. Las pre-sangres de todos los conejos no dan señal aún a baja dilución (1:50) en los materiales FFPE, en tanto que las sangres primarias (sueros policlonales) antes de la fusión dan ya señales claras e inequívocas, con fuertes indicaciones de especificidad para proteínas de superficie celular. Se distribuyeron tres sangres de cada conejo, y se seleccionó por inmunógeno un conejo positivo individual para la fusión después de 8 a 12 semanas.

15 En el paso (B), se aislaron las células B de los conejos positivos a suero, y la línea de células 240E-W compañeras de fusión de conejo se fusionaron a las células B de conejo aisladas para crear células de hibridoma de conejo. Se examinaron placas de 96 concavidades para fusión por ELISA. El sobrenadante para 10 a 100 clones positivos se administró, y se seleccionaron 3 multiclonos por inmunógeno después de 5 a 6 semanas.

20 En el paso (C), los hibridomas se clonaron y examinaron para seleccionar clones que segreguen anticuerpos con reconocimiento específico apropiado del antígeno, y los anticuerpos se caracterizan usando una variedad de métodos (Western Blot, IHC, ICC, citometría de flujo, etc.). Los sobrenadantes de los subclones se examinaron particularmente con ELISA para reconocimiento específico de antígeno. Los sobrenadantes de los subclones probados positivos se congelaron y almacenaron a -80°C hasta el uso. De manera subsiguiente, los sobrenadantes de subclones se examinaron en el proceso de dos pasos del ejemplo 3, primero en el arreglo de línea de células de cáncer y en el segundo paso en el tejido de xenoinjerto con un arreglo de línea de células de cáncer en paralelo para verificar el primer examen.

25 En el paso (D), se escindieron las secuencias de ADN de los clones seleccionados de anticuerpo, se clonaron en vectores de expresión de EBNA, y se secuenciaron por secuenciación con tinte Sanger de ADNc automatizada. Los anticuerpos recombinantes se produjeron en el sistema de expresión de células EBNA de acuerdo a Pham et al., Biotech Bioeng 2003, 84(3): 332-342, pero con la modificación menor de usar células HEK293-6E con el vector pTT5 para el sistema de transfección momentánea. Se verificó la producción de anticuerpos por ELISA e IHC. Se aisló el ARNm de células de hibridoma usando el Kit TuboCapture (Qiagen) siguiendo la sugerencia del fabricante y luego se transcribió de forma inversa en ADNc usando el cebador oligo-dT. La región variable de cadena pesada (V_H) se amplificó por PCR usando cebadores patentados OYZ64-2 y OYZvh3. La cadena ligera (L) completa se amplificó por PCR usando cebadores patentados OYZ62 y OYZ71. La región de V_H de los fragmentos de PCR se digirió usando las enzimas de restricción HindIII y KpnI. Los fragmentos de PCR de L se digirieron usando HindIII y NotI. Todo el producto digerido se purificó usando el kit de limpieza de PCR Qiagen. Después de la purificación, el fragmento de V_H o L se ligó en el vector de expresión, patentado, de cadena pesada o ligera, correspondiente y se transformó en células competentes DH5 α (MC Lab). Las colonias transformadas se recolectaron y se confirmaron las inserciones usando las enzimas de restricción correspondientes (por tamaño esperado: aproximadamente 440 pb para V_H y 740 pb para L). Los plásmidos con inserciones del tamaño esperado se secuenciaron usando TT5 para el cebador. El fragmento de cadena ligera o cadena pesada, completo, se escindió del vector correspondiente con HindIII y NotI y se purificó subsiguientemente usando kit de limpieza de PCR Qiagen. Se depositaron aproximadamente 50 a 100 ng de los insertos de ADNc.

Ejemplo 3: Métodos para examinar y caracterizar anticuerpos

Ejemplo 3.1.- Composiciones de arreglo

50 Veintisiete líneas de células de cáncer y una línea de células insectiles se fijaron en paraformaldehído al 4 % amortiguado con fosfato, pH 7, durante 16 a 24 horas a temperatura ambiente, se incrustaron en parafina y se arreglaron en un bloque de parafina de 28 líneas celulares (CAX05). El perfil de expresión superficial celular de integrina de varias de las líneas celulares usadas en el arreglo se caracterizó previamente por citometría de flujo, usando anticuerpos monoclonales de ratón definidos, tal como LM609 (Cheresh & Spiro, JBC 1987, 262: 17703-17712) y P1F6 (Varner & Cheresh, Important Adv Oncol 1996, 87: 69) dirigidos contra los complejos de integrina $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$, respectivamente (Mitjans et al., J Cell Sci 1995, 108 (Pt 8): 2825-38).

ES 2 622 487 T3

CAX05:	
A 431	oes cáncer escamoso
A 549	cáncer de pulmón
A2780 ADR	cáncer ovárico
C 8161	melanoma
Calu 6	adeno de pulmón
Colo 205	cáncer de colon
DU145	cáncer de próstata
HCT 116	cáncer de colon
HT 29	cáncer de colon
Igrov 1	cáncer ovárico
Kyse 30	cáncer escamoso
Lox	melanoma
M21	melanoma
M24-met	melanoma
MCF 7	cáncer de mama
MDA-MB 23	cáncer de mama
MDA-MB468	cáncer de mama
Mia-PaCa2	cáncer de páncreas
NCI-H460LC	cáncer de pulmón
Ovcar-3	cáncer ovárico
PC 3	cáncer de próstata
Raji	Linfoma de BuBVLtt
Sf9	célula insectil
SKOV 3	cáncer de ovario
Suit 7	cáncer de páncreas
SW707	cáncer de colon
U87MG	glioblastoma
WM 164	melanoma

Se compusieron arreglos de diferentes estudios experimentales (Xeno-08-A; Xeno-08-Mu1) al usar xenoinjertos de ratones tratados con vehículo.

5	Xeno-08-A:	
	M21	ratón
	U87MG	ratón

HCT116	ratón CD1 nu/un
A549 (carcinoma humano de pulmón)	ratones CD1 nu/nu
Calu 6	ratones CD1 nu/un

Xeno-08-Mu1:

A549, HCT116, U87MG, M21, Calu 6, A431, BT474, Colo205, H1975, MDA MB-231, Mes-Sa/Dx5, PC3, SW707, A2780, A2780ADR

5 Se montaron secciones de 3 μm del arreglo de línea de células de cáncer y los arreglos de xenoinjerto en portaobjetos SuperFrost^{MR}Plus positivamente cargados (Menzel-Glaeserr, Braunschweig, Alemania) y se almacenaron a -80°C con desecante.

Ejemplo 3.2: Procedimiento IHC

10 El procedimiento de tinción inmunohistoquímica que inicia con la desparafinización de secciones se realizó con los instrumentos de tinción Discovery^{MR} o el Discovery^{MR} XT (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, EUA). Después de la desparafinización, las secciones se calentaron para la recuperación de epítomos en amortiguador Tris-EDTA pH 8 o se incubaron con proteasa a 37°C durante 8 minutos (proteasa 1) o 12 minutos (proteasa 2). La peroxidasa endógena se bloqueó por incubación en peróxido de hidrógeno al 3 % (parte de los Kits OmniMap^{MR} o UltraMap^{MR}, Ventana Medical Systems). Después de calentar los sobrenadantes a temperatura ambiente en el día de la primera ejecución inmunohistoquímica, se adicionó azida sódica a una concentración final de 0.01 % (p/v), y los sobrenadantes se almacenaron a 4°C. Una serie de sobrenadantes siempre se tiñó con el mismo instrumento. Se
15 incubaron secciones con los sobrenadantes de multiclonos y subclones, o anticuerpos recombinantemente expresados (2-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 100 μl por portaobjeto), y luego con el anticuerpo secundario apropiado, como para los polímeros conjugados con HRP del Kit OmniMap o UltraMap, durante 16 minutos a 37°C. La peroxidasa de rábano (HRP) cataliza la reacción de tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina (DAB)/H₂O₂ para producir un precipitado café oscuro insoluble que se puede visualizar. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina. Los portaobjetos se lavaron en agua de grifo, se deshidrataron, y se montaron con cubreobjetos de vidrio en el medio de montaje permanente Entellan^{MR} Neu (VWR, Alemania). Los portaobjetos se almacenaron a temperatura ambiente, y los bloques de parafina se almacenaron a 6°C.

Diagrama del Procedimiento de Tinción Inmunohistoquímica:

25 A. Pre-Tratamiento

- Desparafinización (temperatura: 75°C durante 8 minutos, luego amortiguador EZ Prep a 75°C durante 8 minutos)
- Acondicionamiento celular (amortiguador Tris-EDTA pH 8, tiempo: 48 minutos; temperatura: 95°C) o
- Acondicionamiento con proteasa (proteasa 1: 0.5 U/ml, o proteasa 2: 0.1 U/ml; tiempo: 8 o 12 minutos; temperatura: 37°C)

30 B. Detección

- Anticuerpo primario (volumen: 100 μl ; tiempo: 32 minutos; temperatura: 37°C)
- Anticuerpo secundario (OmniMap o UltraMap conjugado con HRP; volumen: 100 μl ; tiempo: 16 min; temperatura: 37°C)
- Detección (ChromoMap DAB)
- 35 - Contratinción (Hematoxilina II; tiempo: 8 min)
- Post-contratinción (Reactivo Bluing)
- Limpieza de portaobjetos

40 Los arreglos de líneas celulares se exploraron con el microscopio automatizado Ariol SL-50 a X20 (escala x/y: 1 píxel = 0.38 x 0.38 μm^2). Se estableció una región circular (área de región de entrada) de 0.1 mm² en cada punto de tejido. El color café de la marcación inmunohistoquímica positiva se cuantificó con la ayuda del software de análisis de imagen del Ariol SL-50 al ajustar los umbrales para "color", "tono" y "saturación". El área positiva en el área de región de entrada fue la fracción de tejido marcado café. La intensidad del área positiva fue el valor gris medio de color café medido en tres imágenes de blanco y negro fotografiadas en un filtro de rojo, uno azul y uno ver. Los valores de grises variaron desde 0 (negro) a blanco (255). La expresión se calculó de acuerdo a la fracción de aire positiva *(255-intensidad). Los datos se visualizaron con Spotfire^{MR}DecisionSite^{MR} (versión 9.0, Spotfire Inc.).

45

Ejemplo 3.3: Protocolo de ELISA

Se revistieron integrinas recombinantes (1 µg/ml) en placas de microtítulo por adsorción 4°C; 16 h) del amortiguador de revestimiento (NaCl 150 mM; CaCl₂ 1 mM; MgCl₂ 1 mM; MnCl₂ 10 µM; Tris-Cl 50 mM; pH 7.5). Las placas se lavaron (amortiguador de lavado: 0.5 % de BSA; 0.05 % de Tween 20 en PBS), se bloquearon (1 h; 4°C; 5 % BSA en PBS), y se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en serie en amortiguador de lavado (1 h; 37°C). Después del lavado, se adicionó el anticuerpo de detección secundario (HRP anti-conejo de cabra; 1:5000) (1 h; 37°C), seguido por lavado y detección usando tetrametil-bencidina (100 µg/ml) en amortiguador de citrato-fosfato (pH 5.0), revelado con ácido sulfúrico, y lectura contra un blanco de reactivo a 450 nm. Los resultados se expresaron después de la sustracción de los valores en blanco que fueron típicamente < 5 % de los valores de control positivo.

Ejemplo 3.4: Análisis por FACS

Las células en crecimiento logarítmico se recolectaron usando tripsina (0.5 µg/ml)/EDTA (0.2 µg/ml), se lavaron en amortiguador FACS (PBS plus CaCl₂ 0.9 mM; MgCl₂ 0.5 mM; BSA al 0.5 % p/v), y se incubaron con anticuerpos anti-integrina (60 min; 4°C; 10 µg/ml en amortiguador de FACS). Después del lavado, las células se tiñeron con IgG anti-conejo marcado con Alexa-488 (Invitrogen), o IgG anti-conejo de cabra FITC (Becton-Dikinson) (30 min; 4°C), se lavaron y re-suspendieron en amortiguador de FACS (500 µl/tubo). Las células se analizaron en un FACScan (Becton-Dikinson) y la fluorescencia de intensidad media (MIF) se normalizó a la MIF del control negativo (células teñidas con PI y anticuerpo marcado secundario, sin anticuerpo primario).

Ejemplo 3.5: Evaluación y estadística

La IC₅₀ para la unión del anticuerpo en ELISA se determinó de puntos de datos en triplicado por ajuste a la curva no lineal en el paquete de software de gráficos Graphpad Prism (Ver 5.0: GraphPad Software, Inc., LaJolla Ca). Se analizó la citometría de flujo usando el programa BD FACS-scan (CellQuest MacOS 8.6).

Ejemplo 4: Caracterización de Clones anti-αvβ3 y anticuerpos anti-αvβ3**Ejemplo 4.1:** Caracterización de E3528-2-7, E3528-2-11 y E3528-2-12

Los sobrenadantes de los 24 subclones obtenidos de los multiclonos 2 y 63 de conejo E3528 se examinaron sin diluir en el arreglo de línea celular FFPE de las líneas de células de cáncer CAX05. Las señales citoplásmicas sin el perfil de membrana clara se excluyeron como no específicas de integrina. Los subclones del multiclon 2 exhiben una tinción de membrana en plasma (Figura 1). La selectividad de los subclones con respecto a ciertos tipos celulares se comparó con la IgG monoclonal de ratón, clon 20H9. El clon 20H9 es un anticuerpo anti-cadena β3 (Mitjans et al., J Cell Sci 1995, 108(Pt 8): 2825-38), que reacciona de forma cruzada en FFPE, sin embargo con una baja afinidad de unión. Los subclones positivos se probaron en una segunda ejecución en el arreglo de xenoinjerto Xeno-08-A para confirmar la reactividad cruzada en el tejido tumoral (Tabla 1).

Tabla 1: Clones a dominio αvβ3 extracelular. La intensidad de tinción se graduó de –(negativo) a +++ (fuerte)

ID de clon	Arreglo de línea de células de cáncer (CAX05)	Arreglo de xenoinjerto (Xeno-08-A)
multiclon MRK-1a-E3528-2	M21++, U87MG++, HCT116-, Calu 6-, A549-, SUIT 7-, WM164+, HT29-, MDA-MB231-	M21+, U87MG-, HCT116-, Calu 6-, A549-
subclones MRK-1a-E3528-2	clones 2-2 a 2-12 fueron positivos	M21+, U87MG-, HCT116-, Calu 6-, A549-

Tres subclones, 2-7, 2-11 y 2-12, se seleccionaron como clones finales, en base a la intensidad de tinción, selectividad con respecto a células positivas a integrina αvβ3 conocidas y a la calidad de la tinción de membrana en plasma. Los tres clones anti-αvβ3 exhibieron características similares de tinción, mostrando distinta tinción de membrana en plasma (Figura 2). En el arreglo de xenoinjerto Xeno-08-Mu1, los xenoinjertos M21 fueron los únicos positivos (Figura 3). Los subclones fueron negativos en una variedad de carcinomas que incluyen A549 y HCT116, que se conoce que no expresan αvβ3 (Tabla 2), y en el linfoma de células Raji-T independientes de anclaje. Estos datos estuvieron de acuerdo con un epítipo de αvβ3-integrina de los anticuerpos. La selectividad e intensidad de la tinción con los tres anticuerpos en el arreglo de línea de células de cáncer fue casi idéntico (Figura 4). La selectividad de la tinción de los tres anticuerpos se comparó al clon 20H9 de anticuerpo anti-αvβ3 integrina monoclonal (Figura 5, mostrado para clon E3528-2-7). Con respecto a la selectividad celular, los tres clones mostraron características similares al clon 20H9, indicando que el epítipo de los tres anticuerpos fue un epítipo de αvβ3. La alta expresión de αvβ3 en las líneas de células M21 se mostró previamente por análisis de FACS con el clon LM609 (Tabla 25; Mitjans et al., Int J Cancer 2000, 87(5): 716-723).

Tabla 2: Análisis de FACS e inmunohistoquímica anti- $\alpha\beta 3$ de varias líneas de células de cáncer

Línea de células de cáncer	FACS $\alpha\beta 3$ (MIF/fondo medio)	FACS % de células	FACS $\alpha\beta 3$ x % de células	IHC $\alpha\beta 3$ _E3528-2-7 en CAX08 (Expresión)
HCT116	0.96	0.2	0.2	0.9
KYSE-30	0.98	0.52	0.5	0.3
M21	1.55	91.8	142.3	75.6
A549	0.63	1.2	0.8	6.7
NCI-H460	0.79	0.0	0.0	6.5
Calu-6	1.5	3.6	5.4	1.1

Ejemplo 4.2: Caracterización de E3531-227 y E3531-229

5 De manera similar al Ejemplo 4.1, el subclón 227-3 se obtuvo después de una segunda ejecución de fusión de linfocitos B de conejo E3531. Los sobrenadantes de 18 subclones obtenidos de los multiclonales 227 y 29 se examinaron sin diluir en el arreglo de línea de células FFPE de las líneas de células de cáncer CAX05. Se excluyeron las señales citoplásmicas sin perfil de membrana clara como no específicas de integrina. Los clones de ambos multiclonales exhibieron una buena tinción de membrana en plasma. La selectividad de los clones con respecto a ciertos tipos celulares se comparó con la IgG monoclonal de ratón, clon 20H9. Los subclones positivos se probaron en una segunda ejecución en el arreglo de xenoinjerto Xeno-08-A para confirmar la reactividad cruzada en tejido tumoral. Se seleccionaron seis subclones E3531-227-2, -227-3, 227-6, -229-3, 229-9 y 229-11 como clones finales, en base a la intensidad de tinción, a la selectividad con respecto a las células positivas a integrina $\alpha\beta 3$ conocidas, y a la calidad de la tinción de membrana en plasma.

15 Los clones finales seleccionados se cultivaron y los anticuerpos se purificaron. Los seis clones anti- $\alpha\beta 3$ exhibieron características similares de tinción, mostrando distinta tinción de membrana en plasma (Figura 6). En el arreglo de xenoinjerto Xeno-08-Mu1, los xenoinjertos M21 fueron los únicos positivos (Figura 7). U87MG fue positivo. La selectividad de la tinción con los tres anticuerpos E3531-227-2, E3531-227-3 y E3531-227-6 en el arreglo de línea de células de cáncer CAX08 fue casi idéntica (Figura 8). La selectividad de la tinción de los anticuerpos anti- $\alpha\beta 3$ se comparó con el clon 20H9 del anticuerpo anti- $\alpha\beta 3$ integrina monoclonal, mostrado por el clon E3531-227-3 (Figura 8). Con respecto a la selectividad celular, los clones mostraron características similares al clon 20H9, indicando que el epítipo de los seis anticuerpos fue un epítipo $\alpha\beta 3$. La alta expresión de $\alpha\beta 3$ en líneas de células M21 se mostró previamente por análisis de FACS con el clon LM609 (Tabla 3; Mitjans et al., Int J Cancer 2000, 87(5): 716-423). Los clones E3531-227-3 y E3531-229-3 que producen la cantidad más alta de IgG se secuenciaron y mostraron secuencias idénticas (comparar posteriormente).

25 Tabla 3: Análisis de FACS e inmunohistoquímica anti- $\beta 3$ de varias líneas de células de cáncer

Línea de células de cáncer	FACS $\alpha\beta 3$ (MIF/fondo medio)	FACS % de células	FACS $\alpha\beta 3$ x % de células	IHC $\alpha\beta 3$ _E3531-227-3 en CAX08 (Expresión)
HCT116	0.96	0.2	0.2	1.17
KYSE-30	0.98	0.52	0.5	0.00
M21	1.55	91.8	142.3	97.4
A549	0.63	1.2	0.8	0.02
NCI-H460	0.79	0.0	0.0	0.01
Calu-6	1.5	3.6	5.4	0.12

Las características de tinción de los seis clones E3531-227-2, -227-3, 227-6, -229-3, 229-9 y 229-11, como son "tinción de membrana en plasma" y alta señal en células M21, estuvieron de acuerdo con un epítipo de $\alpha\beta 3$ -integrina de los anticuerpos. Los anticuerpos detectaron $\alpha\beta 3$ -integrina en tejido incrustado en parafina fijado con

formaldehído. También se reveló EM22703. Reacciona igualmente bien en aiiβ3 intacto (IC₅₀ fue la misma en ELISA), indicando que estuvo detectando la cadena β3 en el complejo con ambos compañeros. Esto reflejó el poder del anticuerpo monoclonal para detectar de forma exacta lo que se examina. En la práctica, la reactividad cruzada no debe prever una seria desventaja para detectar αvβ3 in situ: aiiβ3 se expresa únicamente en los linajes de macrófagos/megacariocíticos, portados en sangre, y raramente se espera que se vea en las ubicaciones intra-tejido características de αvβ3.

Ejemplo 5: Caracterización de clones anti-αvβ5 y anticuerpos anti-αvβ5

Los sobrenadantes de 27 subclones obtenidos de los multiclonos 13, 40 y 99 de conejo E3536 se examinaron sin diluir en el arreglo de línea de células FFPE de las líneas de células de cáncer CAX05. Tres subclones 99-1, 99-2 y 99-3, exhibieron una tinción de membrana en plasma (Figuras 9A-9J). Sus sobrenadantes de hibridoma fueron altamente específicos para αvβ5 con respecto a αvβ3 (un factor de > 100 en Kd aparente), con EC₅₀ en el inmunógeno de 50 pM (Figura 10). Los subclones positivos se probaron en el arreglo de xenoinjerto para confirmar la reactividad cruzada en tejido tumoral (Figura 9, columna derecha). Las líneas celulares mostraron diferentes grados de expresión de αvβ5 si se cultiva en cultivo en comparación al tejido de xenoinjerto.

Tabla 4: Clones a dominio αvβ5 extracelular. La intensidad de tinción se graduó de –(negativo) a +++(fuerte)

ID de clon	Arreglo de línea de células de cáncer (CAX05)	Arreglo de xenoinjerto (Xeno-08-A)
multiclon MRK-1c-E3536-99	HT29+++, WM164-, M21++, U87MG++, HCT116+++, Calu6++, A549+++, Suit 7+++, MDA-MB231++, Kyse30++, NCI-H460+++	M21++, U87MG++, HCT116++, Calu 6++, A549+
subclones MRK-1c-E3536-99	clones 99-1, 99-2 y 99-3 fueron positivos; se marcó la membrana en plasma	M21++, U87MG++, HCT116+, Calu 6+, A549+

Se seleccionaron tres subclones, 99-1, 99-2 y 99-3 como clones finales, en base a la intensidad de tinción, a la selectividad con respecto a células positivas a αvβ5-integrina conocidas y a la calidad de la tinción de membrana en plasma (Tabla 4). Los tres clones anti-αvβ5 marcaron la membrana en plasma (Figura 11). En el arreglo de xenoinjerto Xeno-08-Mu1, varios xenoinjertos fueron positivos, especialmente A431 (Figura 12). Los tres clones anti-αvβ5, E3536-99-1, -99-2 y -99-3, exhibieron características de tinción muy similares con respecto a la selectividad celular e intensidad de tinción medidas con análisis de imagen (Figura 13). Las líneas celulares que mostraron una alta señal de αvβ3_E3536-99-1 (o -99-2, o -99-3) (es decir HT-29, HCT116, Kyse 30, A549 y NCI-H46) exhibieron alta expresión de αvβ5 analizada por FACS con el clon P1F6 (Kemperman et al., Exp Cell Res 1997, 234(1): 156-164; Mitjans et al., Int J Cancer 2000, 87(5): 716-723). La línea de células M21 exhibió una baja señal con inmunohistoquímica y una correspondiente baja señal por análisis de FACS (Tabla 5). Las células de linfoma Raji, que fueron negativas a αv, no mostraron señal en el arreglo de línea de células de cáncer con inmunohistoquímica.

Tabla 5: Análisis de FACS e inmunohistoquímica anti-αvβ5 de varias líneas de células de cáncer

Línea de células de cáncer	de de	FACS αvβ5 (MIF/fondo medio)	FACS % de células	FACS αvβ5 x % de células	IHC αvβ5_E3536-99-1 en CAX08 (Expresión)
HCT116		6.2	72.5	450.2	103.0
KYSE-30		7.16	80.39	575.6	136.0
M21		0.84	39.1	32.8	50.0
A549		1.69	97.0	163.9	142.0
NCI-H460		1.67	78.0	130.3	128.0
Calu-6		5.2	74.4	386.9	75.0

Las características del subclón correspondieron a los datos de FACS y bioquímicos para la distribución de integrina

$\alpha v\beta 5$ y los subclones soportados 99 puesto que reaccionan con un epítipo de $\alpha v\beta 5$ -integrina. Los clones 99 se derivan de una célula de hibridoma única, como se revela por secuenciación de ADNc (comparar posteriormente).

Ejemplo 6: Caracterización de Clones Anti- $\alpha v\beta 6$ y Anticuerpos Anti- $\alpha v\beta 6$

5 Los sobrenadantes de 33 clones obtenidos de estos multiclonos se examinaron sin diluir en el arreglo de líneas de células FFPE de líneas de células de cáncer CAX08. Las señales citoplásmicas sin perfil de membrana clara se excluyeron como no específicas de integrina. Muchos sobrenadantes de subclones probados en las líneas de células de cáncer fueron positivos después del tratamiento térmico así como después del pre-tratamiento con proteasa. Los subclones de los multiclonos 52 (Figura 14), 106 y 118 mostraron una buena tinción de membrana en plasma. Los subclones positivos se probaron en una segunda ejecución en el arreglo de xenoinjerto Xeno-08-Mu1 para confirmar la reactividad cruzada en el tejido tumoral. El pre-tratamiento con proteasa dio por resultado una mayor señal para los subclones de 52 a 106. Por lo tanto, estos sobrenadantes de subclones se probaron sólo en los xenoinjertos pre-tratados con proteasa. Los diferentes subclones del clon 52 fueron idénticos en su selectividad y especificidad de tinción. El subclón 106-1 fue negativo en SW707 en contraste a los subclones de los multiclonos 52 y 118 (Tabla 6).

15 Tabla 6: Sobrenadantes de subclones a dominio $\alpha v\beta 6$ extracelular. La intensidad de tinción se graduó desde – (negativo) a +++(fuerte) así como desde 0 (negativo) a 3 (fuerte).

Pre-tratamiento de Tejido	Plasma-membrana	Cito-plasma	Líneas de células de cáncer (CAX08)
ID de Clon			Comentario
			Proteasa 0.1 unidades/ml, 12 min
52-1	3	0	Kyse30+++ , A431+++ , MDA-MB468+++ , Colo205++ , HT29++ , SW707+
52-2	3	0	Kyse30+++ , A431+++ , MDA-MB468+++ , Colo205++ , HT29++ , SW707+
52-3	3	0	Kyse30+++ , A431+++ , MDA-MB468+++ , Colo205++ , HT29++ , SW707+
52-4	3	0	Kyse30+++ , A431+++ , MDA-MB468+++ , Colo205++ , HT29++ , SW707+
52-5	3	0	Kyse30+++ , A431+++ , MDA-MB468+++ , Colo205++ , HT29++ , SW707+
52-6	3	0	Kyse30+++ , A431+++ , MDA-MB468+++ , Colo205++ , HT29++ , SW707+
52-7	3	0	Kyse30+++ , A431+++ , MDA-MB468+++ , Colo205++ , HT29++ , SW707+
52-8	3	0	Kyse30+++ , A431+++ , MDA-MB468+++ , Colo205++ , HT29++ , SW707+
52-9	3	0	Kyse30+++ , A431+++ , MDA-MB468+++ , Colo205++ , HT29++ , SW707+
52-10	2	0	Kyse30++ , A431++ , MDA-MB468++ , Colo205+ , HT29+ , SW707+
52-11	2	0	Kyse30++ , A431++ , MDA-MB468++ , Colo205+ , HT29+ , SW707+
52-12	2	0	Kyse30++ , A431++ , MDA-MB468++ , Colo205+ , HT29+ , SW707+
106-1	3	1	Kyse30+++ , A431+++ , MDA-MB468+++ , Colo205++ , HT29++ , SW707-
118-1	3	0	Kyse30++ , A431++ , MDA-MB468++ , Colo205++ , HT29++ , SW707-
			Xenoinjertos (Xeno-08-Mu1)
			Proteasa 0.1 unidades/ml, 12 min
52-1	3	1	H1975+++ , A431+++ , Colo205++ , SW7077-
52-2	3	1	H1975+++ , A431+++ , Colo205++ , SW7077-
52-3	3	1	H1975+++ , A431+++ , Colo205++ , SW7077-
52-4	3	1	H1975+++ , A431+++ , Colo205++ , SW7077-
52-6	3	1	H1975+++ , A431+++ , Colo205++ , SW7077-

Pre-tratamiento de Tejido	Plasma-membrana	Cito-plasma	Líneas de células de cáncer (CAX08)
ID de Clon			Comentario
			Proteasa 0.1 unidades/ml, 12 min
52-8	3	1	H1975+++, A431+++, Colo205++, SW7077-
52-9	3	1	H1975+++, A431+++, Colo205++, SW7077-
106-1	1	0-1	H1975+, A431+
118-1	3	0	A431+++, H1975+++, Col205+, fue mejor pre-tratamiento de proteasa

En el tejido de xenoinjerto, la línea de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) H1975 mostró la intensidad de tinción más alta (Figura 14H). En el arreglo de la línea de células de cáncer, los dos carcinomas de células escamosas Kyse30 (Figura 14I) y A431 (Figuras 14A), y en el arreglo de xenoinjerto, los xenoinjertos A431 (Figura 14B) mostraron una señal alta. Las líneas celulares con alta intensidad de tinción en el arreglo de línea de células de cáncer fueron HT29 (Figura 14G), MDA-MB468, Colo205 y A431. Esto correspondió a un alto ARNm de $\beta 6$ integrina de estas líneas celulares. La selectividad y especificidad de los sobrenadantes de subclones de los multiclonos 52, 106 y 118 estuvo de acuerdo con un epítipo de $\alpha \nu \beta 6$ reconocido por los anticuerpos. Nueve subclones 52-1, 52-2, 52-3, 52-4, 52-6, 52-8, 52-9, 106-1 y 118-1 se seleccionaron como clones finales, en base a la intensidad de tinción, a la selectividad con respecto a células positivas a $\alpha \nu \beta 6$ integrina conocidas y a la calidad de la tinción de membrana en plasma (Tabla 6). De los subclones con tinciones idénticas, los que tienen más alta concentración de IgG se seleccionaron como clones finales.

El clon con la más alta concentración de IgG, el clon E3866-52-1, se cultivó y el anticuerpo se purificó de acuerdo a protocolos normales. La actividad del anticuerpo se mostró por IHC en el arreglo de línea de células de cáncer (Figura 15). Con el anticuerpo recombinante, se tiñeron varios portaobjetos del arreglo de línea de células de cáncer y se xenoinjertos (Figura 16). En los xenoinjertos de cáncer de colon HT29, carcinoma de pulmón H1975 y un explante de tumor de próstata de paciente PRXF MRIH (Oncotest GmbH, Freiburg) al anticuerpo recombinante anti- $\alpha \nu \beta 6$ mostró una señal pronunciada, en tanto que un xenoinjerto de melanoma M21 sin expresión de ARNm de $\beta 6$, fue negativo (Figura 16). El anticuerpo recombinante anti- $\alpha \nu \beta 6$ mostró una clara tinción de la membrana en plasma (Figura 17). La señal en el arreglo de línea de células de cáncer se cuantificó con la ayuda de análisis de imagen (Figura 18). Las líneas celulares con alta señal de tinción de anticuerpo, como fueron HT29, Colo205 o MDA-MB468, correspondieron a las líneas celulares con altos niveles de ARNm del ARNm de $\beta 6$ integrina. El anticuerpo anti- $\alpha \nu \beta 6$ recombinante mostró alta reproducibilidad de portaobjeto a portaobjeto ($r=0.996$) y de ejecución a ejecución ($r=0.991$, Figura 19) usando procedimientos de tinción automatizados.

El anticuerpo $\alpha \nu \beta 6$ recombinante de IgG de conejo (EM05201) generado contra un péptido de $\alpha \nu \beta 6$ -integrina fue adecuado para tejido FFPE. Las especificidades de ELISA y las características de tinción del anticuerpo recombinante $\alpha \nu \beta 6$ (EM05201), como fueron "tinción de membrana en plasma" y alta señal en líneas celulares que expresan alto ARNm de $\beta 6$ -integrina, estuvieron de acuerdo con un epítipo de $\alpha \nu \beta 6$ -integrina del anticuerpo.

Ejemplo 7: Caracterización de clones anti- $\alpha \nu \beta 8$ y anticuerpos anti- $\alpha \nu \beta 8$

Los sobrenadantes de 36 subclones obtenidos de estos multiclonos se examinaron sin diluir en el arreglo de línea de células FFPE de líneas de células de cáncer CAX08. Todos los 36 subclones mostraron una señal de membrana, ninguno se excluyó debido a tinción citoplásmica no específica de integrina. Muchos sobrenadantes de subclones probados en las líneas de células de cáncer fueron positivos después del tratamiento térmico así como después del pre-tratamiento con proteasa. Para cada multiclón, los cuatro subclones con las concentraciones más altas de IgG se seleccionaron para prueba adicional en el arreglo de xenoinjerto Xeno-08-Mu1 para confirmar la reactividad cruzada en tejido tumoral (Figura 20). El pre-tratamiento de proteasa dio por resultado una señal mayor para los subclones. Los subclones del multiclón 6 fueron negativos en los xenoinjertos. Las líneas celulares con alta intensidad de tinción en el arreglo de línea de células de cáncer, como fueron Ovc3, M24met, MDA-MB 468 y A431 mostraron la expresión más alta de ARNm de la $\beta 8$ integrina (Tabla 7). Los subclones 40-4, 40-10, 40-11, 133-5, 133-8 y 133-9 se seleccionaron como clones finales, en base a la selectividad con respecto a la expresión conocida de ARNm de $\beta 8$ y a la calidad de la tinción de membrana en plasma. De los clones con tinciones idénticas, se seleccionaron los que tienen la más alta concentración de IgG como clones finales.

ES 2 622 487 T3

Tabla 7: Sobrenadantes de subclones a dominio extracelular de $\alpha\beta 8$. La intensidad de tinción se graduó desde – (negativo) a +++(fuerte) así como desde 0 (negativo) a 4 (muy fuerte).

Pre-tratamiento de Tejido	Plasma-membrana	Cito-plasma	Líneas de células de cáncer (CAX08)
ID de Clon			Comentario
6-1	3	0	Ovcar3+++ y Scov++ en zonas de contacto
6-5	3	0	Ovcar3+++ y Scov++ en zonas de contacto
6-8	3	0	Ovcar3+++ y Scov++ en zonas de contacto
6-12	3	0	Ovcar3+++ y Scov++ en zonas de contacto
40-4	3	0	Ovcar3+++ y Scov++ en zonas de contacto
40-9	3	0	Ovcar3+++ y Scov++ en zonas de contacto
40-10	3	0	Ovcar3+++ y Scov++ en zonas de contacto
40-11	3	0	Ovcar3+++ y Scov++ en zonas de contacto
133-5	4	0	Ovcar3+++ y Scov++ en zonas de contacto, A431++, MDA-MB468+++, M24-met+++, Scov3++, Igrov1+++, PC3++, Kyse30++
133-8	4	0	Ovcar3+++ y Scov++ en zonas de contacto, A431++, MDA-MB468+++, M24-met+++, Scov3++, Igrov1+++, PC3++, Kyse30++
133-9	4	0	Ovcar3+++ y Scov++ en zonas de contacto, A431++, MDA-MB468+++, M24-met+++, Scov3++, Igrov1+++, PC3++, Kyse30++
133-12	4	0	Ovcar3+++ y Scov++ en zonas de contacto, A431++, MDA-MB468+++, M24-met+++, Scov3++, Igrov1+++, PC3++, Kyse30++
			Xenoinjertos (Xeno-08-Mu1)
			Proteasa 0.1 unidades/ml, 12 min
6-1	0	0	fuerte en Ovcar3 en vitro, negativo en xenoinjertos
6-5	0	0	fuerte en Ovcar3 en vitro, negativo en xenoinjertos
6-8	0	0	fuerte en Ovcar3 en vitro, negativo en xenoinjertos
6-12	0	0	fuerte en Ovcar3 en vitro, negativo en xenoinjertos
40-4	0	0	fuerte en Ovcar3 en vitro, negativo en xenoinjertos
40-9	0	0	fuerte en Ovcar3 en vitro, negativo en xenoinjertos
40-10	0	0	fuerte en Ovcar3 en vitro, negativo en xenoinjertos
40-11	0	0	fuerte en Ovcar3 en vitro, negativo en xenoinjertos
133-5	3	0	U87MG++, A431++
133-8	3	0	U87MG++, A431++
133-9	3	0	U87MG++, A431++
133-12	3	0	U87MG++, A431++

El clon con la concentración más alta de IgG, el clon E3875-133-9, se cultivó y el anticuerpo se purificó de acuerdo a

métodos normales. La actividad del anticuerpo se muestra por IHC en el arreglo de línea de células de cáncer (Figura 21).

5 Con el anticuerpo recombinante, se tiñeron varios portaobjetos de los arreglos de líneas de células de cáncer, xenoinjertos, y un arreglo de tejido humano normal. Las líneas de células de cáncer Ovar-3 (carcinoma ovárico), M24-met (melanoma) y MDA-MB468 (carcinoma de mama), que expresan todas ARNm de $\beta 8$, fueron positivas, en tanto que las células MCF-7 (carcinoma de mama) sin ARNm $\beta 8$, fueron negativas (Figura 22). De estas líneas celulares, no estuvieron disponibles xenoinjertos. En los xenoinjertos de carcinoma de pulmón H1975 y más fuerte en los xenoinjertos de explante PRXF MRIH (Oncotest GmbH, Freiburg) de tumor de próstata, el anticuerpo recombinante anti- $\alpha \nu \beta 8$ mostró alguna señal (Figura 22). La señal más fuerte se observó en nervios periféricos humanos (Figura 23). El anticuerpo recombinante anti- $\alpha \nu \beta 8$ mostró una tinción clara de la membrana en plasma (Figura 24). La señal en el arreglo de línea de células de cáncer se cuantificó con la aguda de análisis de imagen (Figura 25). Las líneas de células con una tal señal de tinción de anticuerpo, como fueron Ovar-3, M24-met, y MDA-MB468, correspondieron a las líneas celulares con altos niveles de ARNm del ARNm de $\beta 8$ integrina. El anticuerpo recombinante anti- $\alpha \nu \beta 8$ mostró alta reproducibilidad de portaobjetos a portaobjetos ($r=0.982$) y de ejecución a ejecución ($r=0.986$, Figura 26).

20 El anticuerpo recombinante tipo IgG de conejo $\alpha \nu \beta 8$ (EM 13309) generado contra un péptido de $\alpha \nu \beta 8$ -integrina fue adecuado para tejido FFPE. Las especificidades de ELISA y las características de tinción del anticuerpo recombinante $\alpha \nu \beta 8$ (EM13309) como son "tinción de membrana en plasma", alta señal en líneas de células que expresan alto ARN de $\beta 8$ -integrina, y fuerte marcación de nervios periféricos mielinados estuvieron de acuerdo con el epítipo de $\alpha \nu \beta 8$ -integrina del anticuerpo.

Ejemplo 8: Caracterización de clones Anti- $\alpha \nu$ y anticuerpos Anti- $\alpha \nu$

25 Los multiclonos anteriormente seleccionados que se unen a $\alpha \nu \beta 6$ así como a $\alpha \nu \beta 8$ fueron los multiclonos E3866-68 y E3875-13. Los sobrenadantes de 24 subclones obtenidos de estos multiclonos se examinaron sin diluir en el arreglo de línea de células FFPE de líneas de células de cáncer CAX08. Todos los 24 subclones mostraron una alta señal de membrana en plasma, sin embargo, también alguna señal citoplásmica (Figura 27). Se seleccionaron nueve subclones, 5 del multiclón E3875-13 y 4 del multiclón E3866-68, para la prueba en tejido de xenoinjerto para confirmar la reactividad cruzada en tejido tumoral. Debido a una muy alta señal, los sobrenadantes se los clones 13-3, 13-9 y 68-7 se diluyeron 1:5 y 1:10. Los sobrenadantes diluidos 13-3, y 13-9 tiñeron todas las células en el arreglo de línea de células de cáncer excepto las células de linfoma Raji y las células insectiles Sf9. Los xenoinjertos mostraron alta señal de membrana en plasma y también alguna tinción citoplásmica (Figuras 27A-27J). Después de la dilución 1:5, el subclón 68-7 no tiñe MiaPaca2, una línea celular que fue positiva con el subclón 13-3. El epítipo de los subclones del multiclón E3688-68 puede ser diferente de E3875-13. Los subclones E3875-13-3 y -13-9 se seleccionaron como clones finales, en base a su alta concentración de IgG (Tabla 8).

35 Tabla 8: Sobrenadantes de subclones a dominio extracelular $\alpha \nu$. La intensidad de tinción se graduó desde - (negativa) a +++ (fuerte) así como desde 0 (negativa) a 3 (fuerte)

Pre-tratamiento de tejido	Líneas de células de cáncer (CAX08)		
	Calor en Tris EDTA pH 8		
ID de clon	Plasma-membrana	citoplasma	comentario
2b-E3875-13-3	3	1	alto en membrana en plasma y Golgi, alto citoplásmico
2b-E3875-13-5	3	1	alto en membrana en plasma y Golgi, alto citoplásmico
2b-E3875-13-6	3	1	alto en membrana en plasma y Golgi, alto citoplásmico
2b-E3875-13-7	3	1	alto en membrana en plasma y Golgi, alto citoplásmico
2b-E3875-13-9	3	1	alto en membrana en plasma y Golgi, alto citoplásmico
2a-E3866-68-4	3	2	Alto en membrana en plasma, Golgi, también positivo, no claro, algo citoplásmico
2a-E3866-68-5	3	2	Alto en membrana en plasma, Golgi también positivo, no claro, algo citoplásmico

Pre-tratamiento de tejido	Líneas de células de cáncer (CAX08)		
	Calor en Tris EDTA pH 8		
ID de clon	Plasma-membrana	citoplasma	comentario
2a-E3866-68-7	3	2	Alto en membrana en plasma, Golgi también positivo, no claro, algo citoplásmico
2a-E3866-68-9	3	2	Alto en membrana en plasma, Golgi también positivo, no claro, alto citoplásmico
	Xenoinjertos (Xeno-08-Mu1)		
	Calor en Tris EDTA pH 8		
2b-E3875-13-3	3	2	Dilución 1:5 y 1:10 probada, alto en membrana en plasma y Golgi, también aún algo citoplásmico, mejor tinción de A431 que clon 68
2b-E3875-13-5	3	2	alto en membrana en plasma y Golgi, también citoplásmico probablemente debido a muy alta señal, mejor tinción de A431 que clon 68
2b-E3875-13-6	3	2	alto en membrana en plasma y Golgi, también citoplásmico probablemente debido a muy alta señal, mejor tinción de A431 que clon 68
2b-E3875-13-7	3	2	alto en membrana en plasma y Golgi, también citoplásmico probablemente debido a muy alta señal, mejor tinción de A431 que clon 68
2b-E3875-13-9			dilución 1:5 y 1:10 probada, alto en membrana en plasma y Golgi, también aún algo citoplásmico, mejor tinción de A431 que clon 68
2a-E3866-68-4	3	1	alto en membrana en plasma y Golgi, varias células también citoplásmicas, puede ser debido a alta concentración
2a-E3866-68-5	3	1	alto en membrana en plasma y Golgi, varias células también citoplásmicas, puede ser debido a alta concentración
2a-E3866-68-7	3	1	alto en membrana en plasma y Golgi, varias células también citoplásmicas, puede ser debido a alta concentración, con dilución 1:5 y 1:10 MiaPaCa2 negativa
2a-E3866-68-9	3	1	alto en membrana en plasma y Golgi, varias células también citoplásmicas, puede ser debido a alta concentración

El clon con la más alta concentración de IgG, clon E3875-13-9, se cultivó y el anticuerpo se purificó de acuerdo a protocolos normales (Proteína G Sefarosa, HiLoad Superdex 200 pg). La actividad del anticuerpo se mostró por IHC en el arreglo de líneas de células de cáncer (Figura 28).

- 5 Con el anticuerpo recombinante, se tiñeron (Figura 29) varios portaobjetos de los arreglos de líneas de células de cáncer y arreglos de xenoinjerto. En las líneas de células de cáncer así como en los xenoinjertos el anticuerpo recombinante anti- αv mostró una señal pronunciada. Negativas fueron las líneas de células de linfoma, tal como linfoma de Raji y Pfeiffer que no expresa ARNm de αv -integrina. El anticuerpo recombinante anti- αv mostró una clara tinción de la membrana en plasma (Figura 30). La señal en el arreglo de línea de células de cáncer se cuantificó con

la ayuda de análisis de imagen (Figura 31). El anticuerpo recombinante anti- αv mostró reproducibilidad de portaobjetos a portaobjetos ($r=0.947$) y de ejecución a ejecución ($r=0.924$, Figura 32).

5 El anticuerpo recombinante tipo IgG de conejo αv (EM01309) generado contra el péptido de $\alpha v\beta 8$ -integrina fue adecuado para tejido FFPE. Las especificidades de ELISA y las características de tinción del anticuerpo recombinante αv (EM01309), como fue "tinción de membrana en plasma", alta señal en líneas celulares que expresan ARNm de αv -integrina, y ninguna señal en líneas de células de hibridoma que no expresan αv -integrina estuvieron de acuerdo con el epítipo de αv -cadena del anticuerpo.

Ejemplo comparativo 9: Caracterización de clones de integrina de dominio citoplásmico anti- $\beta 3$ y anticuerpos de integrina de dominios citoplásmico anti- $\beta 3$

10 Los sobrenadantes de 24 subclones obtenidos de los multiclonos 2 y 67 se examinaron sin diluir en el arreglo de línea de células FFPE de línea de células de cáncer CAX05. Las señales citoplásmicas sin perfil claro de membrana se excluyeron como no específicas de integrina. Los subclones del multiclón 2 exhibieron una buena tinción de membrana en plasma. La selectividad de los subclones con respecto a ciertos tipos celulares se comparó con el IgG monoclonal de ratón, clon 20H9. Los subclones positivos se probaron en una segunda ejecución en el arreglo de xenoinjerto Xen0-08-A para confirmar la reactividad cruzada en tejido de tumor. Tres subclones, 2-4, 2-10 y 2-12, se seleccionaron como clones finales, en base a la intensidad de tinción, a la selectividad con respecto a las células positivas a $\alpha v\beta 3$ integrina, y a la calidad de la tinción de membrana en plasma (Tabla 9).

20 Tabla 9: Subclones a dominio intracelular de $\beta 3$. La intensidad de tinción de graduó desde - (negativa) a +++ (fuerte) así como 1 (bajo), 2(medio), 3 (alto).

Tejido	CAX05			Xeno-08-A					
ID de clon	Plasma-membrana	Cito-plasma	Comentarios	Plasma-membrana	Cito-plasma	comentarios			
2-1	3	0	M21 +Golgi, específico avb3						
2-2	3	0	M21 +Golgi, específico avb3						
2-3	1	0	M21 +Golgi, específico avb3						
2-4	3	0	M21 +Golgi, específico avb3	3	0	+Golgi, M21 +++, U87MG+			
2-5	1	0	M21 +Golgi, específico avb3						
2-6	1	0	M21 +Golgi, específico avb3						
2-7	1	0	M21 +Golgi, específico avb3						
2-8	3	0	M21 +Golgi, específico avb3						
2-9	1	0	M21 +Golgi, específico avb3						
2-10	3	0	M21 +Golgi, específico avb3	3	0	+Golgi, M21 +++, U87MG+			
2-11	1	0	M21 +Golgi, específico avb3						
2-12	3	0	M21 +Golgi, específico avb3				3	0	+Golgi, M21 +++, U87MG+
67-1	0	0							
67-2	0	0							
67-3	0	0							
67-4									

Tejido	CAX05			Xeno-08-A		
ID de clon	Plasma-membrana	Cito-plasma	Comentarios	Plasma-membrana	Cito-plasma	comentarios
67-5	1	2	Similar a 67-7			
67-6						
67-7	1	2	WM164+++, M21++, U87MG+, sin embargo predominantemente citoplásmico, difuso y precipitación en muchas otras células			
67-8	0	0				
67-9	1	2	Similar a 67-7			
67-10	1	2	Similar a 67-7			
67-11	0	0				
67-12	0	0				

5 Los clones finales seleccionados se cultivaron y los anticuerpos se purificaron. Los tres clones anti-β3, E3592-2-4, -2-10, y -2-12, exhibieron similares características de tinción, mostrando distinta tinción de membrana en plasma (Figura 33). En el arreglo de xenoinjerto Xeno-08-Mu1, los xenoinjertos M21 fueron positivos (Figura 34). U87MG fueron negativos. La selectividad de la tinción con los tres anticuerpos en el arreglo de línea de células de cáncer CAX08 fe casi idéntico (Figura 35). La intensidad de la tinción varió y fue más fuerte para el clon E3592-2-12. La selectividad de la tinción de los tres anticuerpos se comparó con el anticuerpo anti-β3 integrina exo-dominio monoclonal, clon 20H9, mostrado para el clon E3592-2-12 (Figura 36). Con respecto a la selectividad celular, los tres clones mostraron características similares al clon 20H9, indicando que el epítipo de los tres anticuerpos fue un epítipo de β3. La alta expresión de αβ3 en líneas de células M21 se mostró anteriormente por análisis de FACS con el clon LM609 (Tabla 10; Mitjans et al., Int J Cancer 2000, 87(5): 716-723).

10 Tabla 10: Análisis de FACS e inmunohistoquímica anti-β3 de varias líneas de células de cáncer

Línea de células de cáncer	FACS αβ3 (MIF/fondo medio)	FACS % de células	FACS % de células αβ3 x	ICH β3_E3592-2-12 en CAX08 (expresión)
HCT116	0.96	0.2	0.2	10.1
KYSE-30	0.98	0.52	0.5	9.2
M21	1.55	91.8	142.3	119.6
A549	0.63	1.2	0.8	6.7
NCI-H460	0.79	0.0	0.0	1.5
Calu-6	1.5	3.6	5.4	2.4

15 Las características de tinción de los tres clones E3592-2-4, -2-10, y -2-12, como fueron “tinción de membrana en plasma” y alta señal en M21, estuvieron de acuerdo con un epítipo de β3-integrina de los anticuerpos. Los clones de hibridoma de conejo E3592-2-4 2-10, y -2-12 generados contra el péptido de β3-integrina produjeron anticuerpos adecuados para tejido FFPE. Su reconocimiento de epítipo estuvo de acuerdo con su unión de epítipo de dominio citoplásmico de β3. Las cadenas de anticuerpo del clon que producen el anticuerpo de tinción más fuertemente, E3592-2-12, se clonaron por ADNc y las regiones codificadoras de anticuerpo se secuenciaron de forma múltiple (comparar posteriormente).

Ejemplo 10: Secuenciación y listado de secuencias

Se valoraron varios clones por secuenciación de ADNc (Tabla 11). La información registrada en forma leíble por ordenador es idéntica al estado de secuencias escrito.

Tabla 11: Clones secuenciados

ID de Clon	Identificador de anticuerpo recombinante	Especificidad	Ejemplo	SEQ ID Nos
E3531-227-3	EM22703	Anti- $\alpha\beta 3$	4.2	81-120 excepto 90,110
E3531-229-3	EM22903	Anti- $\alpha\beta 3$	4.2	81-120 excepto 90,110
E3536-99-1	-	Anti- $\alpha\beta 5$	5	1-40 excepto 10, 30
E3536-99-2	EM09902	Anti- $\alpha\beta 5$	5	1-40 excepto 10, 30
E3536-99-3	-	Anti- $\alpha\beta 5$	5	1-40 excepto 10, 30
E3592-2-12	EM00212	Anti- $\beta 3$	9	41-80 excepto 50, 70
E3866-052-1	EM05201	Anti- $\alpha\beta 6$	6	121-160 excepto 130, 150
E3875-0133-9	EM13309	Anti- $\alpha\beta 8$	7	161-200 excepto 170, 190
E3875-013-9	EM01309	Anti- α	8	201-240 excepto 210, 230

5

Tres ejecuciones de secuenciación primaria en cada cadena pesada y ligera de los clones se montaron en cóntigos usando el software Lasergene (DNASTar Inc.) y se analizaron usando herramientas de alineación múltiple ClustalW. Los clones E3531-227-3 y -229-3 tienen idénticas secuencias de cadena pesada y ligera, confirmando la monoclonalidad de la población de anticuerpos. Los clones E3536-99-1, -99-2 y -99-3 tienen idénticas secuencias de cadena pesada y ligera, confirmando la monoclonalidad de la población de anticuerpos.

10

Ejemplo 11: RabMab Recombinantes son Específicos para su Ligandos por ELISA.

En condiciones normales de ELISA, se pone 1 $\mu\text{g/ml}$ de integrina revestida en la placa, los anticuerpos fueron esencialmente monoespecíficos para sus inmunógenos, como se define mejor que 4 logs de concentraciones, y no reaccionan de forma cruzada de forma significativa con las cadenas de integrina más cercanamente relacionadas (Figuras 10, 37, 38), con la excepción de EM09902 que mostró una reactividad cruzada ($\text{IC}_{50} \sim 100$ veces menor) tanto con gpiibiiia y $\alpha\beta 3$, de modo que reconoció aparentemente un epítipo relacionado tanto en las cadenas $\beta 5$ como $\beta 3$ de los complejos. No afecta de forma seria el uso FFPE, puesto que la expresión de $\alpha\beta 5$ es más prevalente que $\alpha\beta 3$ y la señal de EM09902 es extremadamente fuerte en IHC. Las especificidades de los otros anticuerpos recombinantes fueron indistinguibles en ELISA y en tinción de IHC de los sobrenadantes de hibridoma y anticuerpos derivados de estos (Figuras 10, 37, 38). En cambio, en la secuenciación de ADNc, dos de los anticuerpos anti- $\alpha\beta 3$, EM22703 y EM22903, se encontraron que se derivan de un clon individual. Las especificidades en ELISA y en las afinidades de unión aparente expresadas como IC_{50} en ELISA se muestran en la Tabla 12.

15

20

Tabla 12: IC_{50} de RabMab recombinantes en ELISA en integrinas aisladas

Identificador de anticuerpo recombinante	Inmunógeno	$\alpha\beta 3$ (ng/ml)	$\alpha\beta 5$ (ng/ml)	$\alpha\beta 6$ (ng/ml)	$\alpha\beta 8$ (ng/ml)	Gpiibiiia (ng/ml)
EM22703	$\alpha\beta 3$ ECD humano	1.4	>10000	>>10000	>>10000	0.85

25

EM09902	$\alpha\beta 5$ ECD humano	-450	5.6	>>10000	>>10000	~400
EM00212	$\alpha\beta 3$ ECD humano	>>10000	>>10000	>>10000	>>10000	>>10000
EM005201	$\alpha\beta 6$ ECD humano	>>10000	>>10000	3.8	>>10000	>>10000
EM013309	$\alpha\beta 8$ ECD humano	>>10000	>>10000	>>10000	4.0	>>10000
EM001309	$\alpha\beta 3$ ECD humano	4.7	6.5	4.9	4.1	>>10000

Ejemplo 12: RabMab recombinantes no afectan la unión de ligando a sus receptores

5 Tanto los anticuerpos como las moléculas pequeñas pueden inhibir o mejorar la actividad de las integrinas, sin embargo, los RabMabs seleccionados aquí no tiene efecto en la unión al ligando (Figura 39). Los inhibidores de $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$, hechos reaccionar como se predice, son positivos (cilengitida) y negativos (c(R β A-DfV)).

Ejemplo 13: RabMab recombinantes en citometría de flujo de células vivas (“FACS”)

10 En FACS, las integrinas nativas presentan su patrón de glicosilación nativa in situ, de modo que esto representa una “norma de oro” de especificidad. Los RabMab se valoraron en FACS en comparación a anticuerpos monoclonales, murinos, bien caracterizados, normales. Para $\alpha\beta 8$, no estuvo comercialmente disponible ningún anticuerpo. Los anticuerpos hechos reaccionar en FACS de una manera dependiente del tipo celular y los perfiles de FACS correspondieron cercanamente a los perfiles de ELISA de los anticuerpos. Los resultados se resumen como intensidad media de fluorescencia normalizada a anticuerpos de control de segunda capa (Tabla 13). Las diferencias en los niveles absolutos de expresión entre los RabMab y los Mab de ratón son probablemente debidas a la afinidad variables de los anticuerpos de segunda capa.

15 Tabla 13: Actividad de RabMab y anticuerpo comparador en citometría de flujo de células vivas usando anticuerpo de segunda capa marcado con Alexa-488 versus anti-ratón marcado con FITC o Ig de conejo. rMIF es intensidad media pico de fluorescencia, con relación a segunda capa sola

Tipo del anticuerpo	Identificador de anti-cuerpo	Inmunógeno/-objetivo	HUVEC	HT-29	A549	M24Met	M21	M21-L	M21-Gpiib
MoMab	17E6	$\alpha\beta 3$ humana	9.9	7.3	6.8	7.8	9.3	1.0	1.1
MoMab	LM609	$\alpha\beta 3$	10.7	1.0	1.3	4.9	9.1	1.1	1.2
MoMab	P1F6	$\alpha\beta 5$	2.7	3.2	3.6	3.8	3.8	1.1	1.0
MoMab	P4C1O	$\beta 1$	38.9	14.5	7.5	14.0	7.2	12.1	10.8
RabMab	EM22703	$\alpha\beta 3$ /ECD humana	12.4	1.7	1.7	8.1	17.6	1.7	56.0
RabMab	EM09902	$\alpha\beta 5$ /ECD humana	33.9	98.9	77.8	40.1	7.2	2.0	1.9
RabMab	EM00212	$\beta 3$ humana citoplásmica	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2
RabMab	EM05201	$\alpha\beta 6$ /ECD humana	$\alpha\beta 6$ 1.6	8.0	1.3	1.0	1.1	1.1	1.0
RabMab	EM013309	$\alpha\beta 8$ /ECD humana	$\alpha\beta 8$ 1.1	19.9	1.8	15.5	22.1	1.2	1.0

Tipo de anticuerpo	Identificador de anti-cuerpo	Inmunógeno/-objetivo	HUVEC	HT-29	A549	M24Met	M21	M21-L	M21-Gpiib
RabMab	EM01309	$\alpha\beta 3$ /*ECD humana	28.8	1.8	1.3	2.5	1.3	1.3	1.0

Los anticuerpos murinos mostraron que las células HUVEC expresan altos niveles de αv , $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ y no de $\alpha v\beta 6$ o $\alpha v\beta 8$. En estas células, el RabMab EM01309 reaccionó fuertemente, y a niveles comparables a 17E6, el comparador anti- αv murino. Los anticuerpos murinos mostraron altos niveles de αv , nada de $\alpha v\beta 3$, altos niveles de $\alpha v\beta 5$ y algo de $\alpha v\beta 6$ en células HT-29 CRC. Los RabMab confirmaron esto y también mostraron alta expresión de la integrina $\alpha v\beta 8$. El RabMab EM01309 reaccionó débilmente. Los anticuerpos murinos mostraron altos niveles de αv , nada de $\alpha v\beta 3$, altos niveles de $\alpha v\beta 5$ y nada de $\alpha v\beta 6$ en células A549 NSCLC. La unión de los RabMab confirmó esto, y también no mostró expresión de la integrina $\alpha v\beta 8$. El RabMab EM01309 no reaccionó. Los anticuerpos murino mostraron altos niveles de αv , $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ y nada de $\alpha v\beta 6$, y fuerte expresión de $\beta 1$ en células de melanoma M24 Met. Los RabMab confirmaron esto y también mostraron fuerte unión de EM 13309, revelando la expresión de la integrina $\alpha v\beta 8$. El RabMab EM01309 no reaccionó. Los anticuerpos murino mostraron altos niveles de αv , $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$, y nada de $\alpha v\beta 6$, y fuerte expresión de $\beta 1$ en células de melanoma M21. Los RabMab confirmaron esto y también mostraron altos niveles de unión de EM 13309, que muestra expresión de $\alpha v\beta 8$. El RabMab EM01309 no reaccionó. Los anticuerpos murinos no mostraron αv , $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ o $\alpha v\beta 6$ en las células de melanoma M21-L, y fuerte expresión de $\beta 1$. Ninguno de los RabMab se une de forma significativa por arriba del fondo. Los anticuerpos murinos no mostraron αv , $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ o $\alpha v\beta 6$ en las células de melanoma M21-gpiib, pero fuerte expresión de $\beta 1$ y $\beta 3$. Los RabMabs EM05201, EM13309 y EM01309 no se unen. Sin embargo, ambos EM22703 y EM09902 reaccionar, EM22703 fuertemente. Esto soportó los datos de ELISA (comparar Ejemplo 11) que EM22703 puede reaccionar de forma cruzada con $\alpha iib\beta 3$, y que EM09902 puede reaccionar de forma cruzada débilmente tanto con $\alpha v\beta 3$ como $\alpha iib\beta 3$.

La citometría de flujo de células vivas fue inequívoca. Los anticuerpos no reaccionan por arriba del fondo con la línea de células M21-L αv -deficientes. Puesto que la MIF normalizada lograda con el planteamiento 100 de EM22703 y EM09902, y con EM05201 y EM13309, esto indicó la señal a ruido rutinariamente lograda básica de los anticuerpos, que estuvo considerablemente por arriba que aquella lograda con los reactivos LM609 y P1F6 normales. No fue claro aún si esto fue un resultado de los reactivos con fluoresceína de segunda capa de mayor afinidad, en lugar de las propiedades de los RabMab primarios mismos, cualquiera que sea la razón, los RabMab fueron excelentes reactivos para FACS.

EM22703 dio una tinción paralela en FACS a LM609, confirmando que estuvo reconociendo el complejo $\alpha v\beta 3$, pero también reaccionó fuertemente con M21-gpiib, mostrando que esto fue la cadena $\beta 3$ en el complejo de integrina que se reconoció bien por EM22703.

La tinción EM09902 es en general paralela a la tinción de P1F6, pero reaccionó débilmente con $\beta 3$ así como con cadenas $\beta 5$. Esto fue visible en la FACS de células M21-gpiib, que no expresan $\alpha v\beta 5$, el objetivo supuesto de EM09902. Al titular el anticuerpo, se puede seleccionar la concentración óptima del reactivo para reducir al mínimo la reactividad cruzada de $\alpha v\beta 3$, en tanto que se retiene una potente señal de $\alpha v\beta 5$, como se predice de los datos de ELISA, y para FACS esto fue 0.3-1 $\mu\text{g/ml}$.

EM00212, dirigido contra el dominio citoplásmico $\beta 3$ fue negativo en FACS y ELISA. Puesto que esto es una especie, isotipo y control objetivo, es un excelente indicador de la especificidad, y sugiere que una excelente relación de señal a ruido de 100:1 se está logrando en FACS.

EM05201 fue intensamente específico para $\alpha v\beta 6$ y reveló esta proteína sólo en células HT29, donde se conoce que se expresa.

EM13309 es el primer reactivo capaz de FACS de células vivas de la integrina $\alpha v\beta 8$, y proporcionó información sorprendente que $\alpha v\beta 8$ se expresa más ampliamente que $\alpha v\beta 6$, en carcinoma HT29, y melanomas M21 y M24 met. La tinción de linaje neuroectodérmico fue quizá no sorprendente puesto que $\alpha v\beta 8$ se reportó en el linaje neuronal de atrociitos, sin embargo, fue inesperada la tinción del carcinoma, y puede reflejar la biológica: el análisis reciente de la $\alpha v\beta 8$ mostró que su expresión en las APC de intestino controló la respuesta inflamatoria en este sitio. De forma concebible, la línea CRC HT29 también reflejó este mecanismo.

EM01309, contra el dominio extracelular αv , fue uniformemente negativo con la excepción de HUVEC.

En resumen, se mostró que los anticuerpos RabMab funcionan en citometría de flujo de células vivas. Esto proporciona un puente valioso entre la bioquímica y la IHC de tejido para validación y caracterización de tumor. Especialmente, los reactivos $\alpha v\beta 6$ y $\alpha v\beta 8$ son un recurso importante para estudios de integrinas, y la capacidad de hacer estos anticuerpos con estos perfiles de reactividad en los RabMab abre una puerta, finalmente en un análisis

riguroso de los patrones de expresión de integrina en tejido de archivo.

Ejemplo 14: Experimentos de Titulación

5 Se realizaron experimentos de titulación en FACS para investigar las concentraciones de tinción apropiadas (Figuras 40-43). Las formas de la curva no indican saturación, pero empiezan a aplanarse por arriba de 1 mg/ml. los anticuerpos de conejo son fuertes aglutinantes en FACS. Especialmente, EM09902 tiene alta afinidad, y una fuerte unión se ve a 0.1 µg/ml de concentración de anticuerpo y por lo tanto, se puede usar de forma exitosa a <1 µg/ml de concentración de tinción.

LISTADO DE SECUENCIAS

- SEQ ID NO: 1 (CDR-1-V_L-αβ5)
- 10 RCALVM
- SEQ ID NO: 2 (CDR-2-V_L-αβ5)
- QDIGSD
- SEQ ID NO: 3 (CDR-3-V_L-αβ5)
- AGYKSYSDDGHG
- 15 SEQ ID NO: 4 (CDR-1-V_H-αβ5)
- PLRNVWIS
- SEQ ID NO: 5 (CDR-2-V_H-αβ5)
- CIYGRDWP
- SEQ ID NO: 6 (CDR-3-V_H-αβ5)
- 20 ARIVYGGAGYRL
- SEQ ID NO: 7 (FR-1-V_L-αβ5)
- MDTRAPTQLLGLLLLWLPGA
- SEQ ID NO: 8 (FR-2-V_L-αβ5)
- TQTTPSVEAAVGGTVTINCQAS
- 25 SEQ ID NO: 9 (FR-3-V_L-αβ5)
- LAWYQQKPGQPPELLIYSASSLASGVPSRFKASGSGTQFTLTISDVQCDDAATYSC
- SEQ ID NO: 10 (DTM-αβ5)

GLNICTSGSATSCEECLLIHPKCAWCSKEDFGSPRSITSRCDLRANLVKNGCGGEIESPAS
 SFHVLRLSLPLSSKSGSAGWDVIQMTQPQEI AVNLRPGDKTTFQLQVRQVEDYPVDLYYLM
 LLSMKDDLDNIRSLGTLKLAEMRKLTSNFRLLGFGSFVDKDISPFSYTAPRYQTNPCIGYK
 LFPNCVPSFGFRHLLPLTDRVDSFNEEVRKQVRSRNRDAPEGGFDAVLQAAVCKEKIGWRK
 DALHLLVFTTDDVPHIALDGKLGGLVQPHDGOCHLNEANEYTASNQMDYPSLALLGEKLA
 NNINLIFAVTKNHMYLYKNFTALIPGTTVEILDGDSKNI IQLI INAYNSIRSKVELSVWDQ
 PEDLNLFFTATCQDGVSYPGQRKCEGLKIGDTASFEVSLEARSCPSRHTEHVLFALRPVGF
 DSLEVGVTYNTCTCGCSVGLPNSARCNGSGTYVCGLCECSPGYLGTRCECQDGENQSVYQN
 LCREAEGKPLCSGRGDCSCNQCSCFESEFGKIYGPFCEDNFSCARNKGVLCSGHGEGCHCG
 ECKCHAGYIGDNCNCSTDISTCRGRDQICSERGHCLCGQCQCTEPGAFGEMCEKCPTCPD
 ACSTKRDCVECLLLHSGKPDNQTCHSLCRDEVITWVDTI VKDDQEAVLCFYKTAKDCVMMF
 TYVELPSGKSNLTVLREPECGNTPN

- SEQ ID NO: 11 (FR-1-V_H-αβ5)
- 30 METGLRWLLLVAVLKGVQCQEELSGGLVQPEGSLTLTCTVSGF

SEQ ID NO: 12 (FR-2-V_H-αβ5)

WVRQAPGKGLEWIG

SEQ ID NO: 13 (FR-3-V_H-αβ5)

YYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQMTSLTATDTATYFC

5 SEQ ID NO: 14 (FR-4-V_H-αβ5)

WGPGLVTVSS

SEQ ID NO: 15 (V_L-αβ5: CDRs + FRs)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCALVMTQTTPPSVEAAVGGT^{.....}VTINCQASQDIGSDLAWYQQK
PGQPPKLLIYSASSLASGVPSRFKASGSGTQFTLTISDVQCDDAATYSCAGYKSYSDDGHG

SEQ ID NO: 16 (V_H-αβ5: CDRs + FRs)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQL^{.....}EESGGGLVQPEGS^{.....}LTLTCTVSGFPLRNWISWVRQAPG
KGLEWIGCIYTGRDWPYYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQMTSLTATDTATYFCARIVYGGA
GYRLWGPGLVTVSS

10

SEQ ID NO: 17 (C_L-αβ5)

FGGGTEVVVKGDPVAPT^{.....}VLIFFPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQT^{.....}TGI
ENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYN^{.....}SHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

SEQ ID NO: 18 (C_H-αβ5)

GQPKAPSVFPLAPCCGDT^{.....}PSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSG
LYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFI^{.....}FPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQV^{.....}RTARPPLEQQFNSTIRVVSTLP
IAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCM
INGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSG^{.....}SYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMH
EALHNHYTQKSISRSPGK

15 SEQ ID NO: 19 (L-αβ5: CDRs + FRs + C_L)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGA [REDACTED] TQTTPPSVEAAVGGT^{.....}VTINCQASQDIGSDLAWYQQK
PGQPPKLLIYSASSLASGVPSRFKASGSGTQFTLTISDVQCDDAATYSCAGYKSYSDDGHG
FGGGTEVVVKGDPVAPT^{.....}VLIFFPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQT^{.....}TGI
ENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYN^{.....}SHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

SEQ ID NO: 20 (H-αβ5: CDRs + FRs + C_H)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQL^{.....}EESGGGLVQPEGS^{.....}LTLTCTVSGF [REDACTED] WVRQAPG
KGLEWIGCIYTGRDWPYYASWAKGRFTISKSSSTTVTLQMTSLTATDTATYFCARIVYGGA
GYRLWGPGLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDT^{.....}PSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTL
TNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPP
PELLGGPSVFI^{.....}FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQV^{.....}RTARPPLR
EQQFNSTIRVVSTLP IAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPP
PREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSG^{.....}SYFLYSKLSVPT
SEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

SEQ ID NO: 21 (CDR-1-V_L-αβ5)

AGATGTGCGCTTGTGATG

SEQ ID NO: 22 (CDR-2-V_L-αβ5)

ACATTGGTAGCGAC

5 SEQ ID NO: 23 (CDR-3-V_L-αβ5)

GCAGGCTATAAAAGTTATAGTGATGATGGTCATGG

SEQ ID NO: 24 (CDR-1-V_H-αβ5)

CCCCTCCGTAATGTCTGGATATCC

SEQ ID NO: 25 (CDR-2-V_H-αβ5)

10 TGCATTTATACTGGTAGGGATTGG

SEQ ID NO: 26 (CDR-3-V_H-αβ5)

GCGAGAATTGTTTATGGTGGTGGTGGTTATAGATTG

SEQ ID NO: 27 (FR-1-V_L-αβ5)

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCC

15 SEQ ID NO: 28 (FR-2-V_L-αβ5)

**ACCCAGACTCCACCCTCCGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCAGG
CCAGTCAGG**

SEQ ID NO: 29 (FR-3-V_L-αβ5)

**TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCA
GTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGATTCAAAGCCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCT
CACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTCCTGT**

SEQ ID NO: 30 (DTM-αβ5 incl. péptido de señal [minúscula])

atgccgcgggccccggcgccgctgtacgcctgcctcctggggctctgcgcgctcctgcccc
 ggctcgcaGGTCTCAACATATGCACTAGTGGAAAGTGCCACCTCATGTGAAGAATGTCTGCT
 AATCCACCCAAAATGTGCCTGGTGTCCAAAGAGGACTTCGGAAGCCCACGGTCCATCACC
 TCTCGGTGTGATCTGAGGGCAAACCTTGTCAAAAATGGCTGTGGAGGTGAGATAGAGAGCC
 CAGCCAGCAGCTTCCATGTCCTGAGGAGCCTGCCCCTCAGCAGCAAGGGTTCGGGCTCTGC
 AGGCTGGGACGTCATTGAGATGACACCACAGGAGATTGCCGTGAACCTCCGGCCCCGGTGAC
 AAGACCACCTTCCAGCTACAGGTTCCGCCAGGTGGAGGACTATCCTGTGGACCTGTACTACC
 TGATGGACCTCTCCCTGTCCATGAAGGATGACTTGGACAATATCCGGAGCCTGGGCACCAA
 ACTCGCGGAGGAGATGAGGAAGCTCACCAGCAACTTCGGTTGGGATTTGGGTCTTTTGT
 GATAAGGACATCTCTCCTTCTCCTACACGGCACCGAGGTACCAGACCAATCCGTGCATTG
 GTTACAAGTTGTTTCCAAATTGCGTCCCCTCCTTTGGGTTCCGCCATCTGCTGCCTCTCAC
 AGACAGAGTGGACAGCTTCAATGAGGAAGTTCCGAAACAGAGGGTGTCCCGGAACCGAGAT
 GCCCCTGAGGGGGCTTTGATGCAGTACTCCAGGCAGCCGTCTGCAAGGAGAAGATTGGCT
 GGCGAAAGGATGCACTGCATTTGCTGGTGTTCACAACAGATGATGTGCCCCACATCGCATT
 GGATGGAAAATTGGGAGGCCTGGTGCAGCCACACGATGGCCAGTGCCACCTGAACGAGGCC
 AACGAGTACACAGCATCCAACAGATGGACTATCCATCCCTTGCCTTGCTTGGAGAGAAAT
 TGGCAGAGAACAACATCAACCTCATCTTTGCAGTGACAAAAACCATTATATGCTGTACAA
 GAATTTTACAGCCCTGATACCTGGAACAACGGTGGAGATTTTAGATGGAGACTCCAAAAAT
 ATTATTCAACTGATTATTAATGCATACAATAGTATCCGGTCTAAAGTGGAGTTGTGAGTCT
 GGGATCAGCCTGAGGATCTTAATCTCTTCTTTACTGCTACCTGCCAAGATGGGGTATCCTA
 TCCTGGTTCAGAGGAAGTGTGAGGGTCTGAAGATTGGGGACACGGCATCTTTTGAAGTATCA
 TTGGAGGCCCGAAGCTGTCCCAGCAGACACACGGAGCATGTGTTTGCCTGCGGCCGGTGG
 GATTCCGGGACAGCCTGGAGGTGGGGGTACCTACAACTGCACGTGCGGCTGCAGCGTGGG
 GCTGGAACCCAACAGCGCCAGGTGCAACGGGAGCGGGACCTATGTCTGCGGCCTGTGTGAG
 TGCAGCCCCGGCTACCTGGGCACCAGGTGCGAGTGCCAGGATGGGGAGAACCAGAGCGTGT
 ACCAGAACCTGTGCCGGGAGGCAGAGGGCAAGCCACTGTGCAGCGGGCGTGGGGACTGCAG
 CTGCAACCAGTGCTCCTGCTTCGAGAGCGAGTTTGGCAAGATCTATGGGCCTTTCTGTGAG
 TGCGACAACCTTCTCCTGTGCCAGGAACAAGGGAGTCTCTGCTCAGGCCATGGCGAGTGTC
 ACTGCGGGGAATGCAAGTGCCATGCAGGTTACATCGGGGACAACCTGTAACCTGCTCGACAGA
 CATCAGCACATGCCGGGGCAGAGATGGCCAGATCTGCAGCGAGCGTGGGCACTGTCTCTGT
 GGGCAGTGCCAATGCACGGAGCCGGGGGCCTTTGGGGAGATGTGTGAGAAGTGCCCCACCT
 GCCCCGATGCATGCAGCACCAAGAGAGATTGCGTCGAGTGCCTGCTGCTCCACTCTGGGAA
 ACCTGACAACCAGACCTGCCACAGCCTATGCAGGGATGAGGTGATCACATGGGTGGACACC
 ATCGTGAAAGATGACCAGGAGGCTGTGCTATGTTTCTACAAAACCGCCAAGGACTGCGTCA
 TGATGTTACCTATGTGGAGCTCCCCAGTGGGAAGTCCAACCTGACCGTCCTCAGGGAGCC
 AGAGTGTGGAAACACCCCAAC

SEQ ID NO: 31 (FR-1-V_H-αvβ5)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGAGG
 AGCAGCTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGAGGGATCCCTGACACTCACCTG
 CACAGTCTCTGGATTC

SEQ ID NO: 32 (FR-2-V_H-αvβ5)

5 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGA

SEQ ID NO: 33 (FR-3-V_H-αvβ5)

CCCTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATTTCCAAGTCCTCGTCCGACCACGG
TGACTCTCAAATGACCAGTCTGACAGCCACGGACACGGCCACATATTTCTGT

SEQ ID NO: 34 (FR-4-V_H-αβ5)

TGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTTTCCTCA

SEQ ID NO: 35 (V_L-αβ5: CDRs + FRs)

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCA
GATGTGCGCTTGTGATGACCCAGACTCCACCCTCCGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCACAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGGACATTGGTAGCGACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCAGTCTGGCATCTGGGGTCCCAT
CGCGATTCAAAGCCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCGACGTGCAGTG
TGACGATGCTGCCACTTACTCCTGTGCAGGCTATAAAAGTTATAGTGATGATGGTCATGG

5

SEQ ID NO: 36 (V_H-αβ5: CDRs + FRs)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCCAGG
AGCAGCTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGAGGGATCCCTGACACTCACCTG
CACAGTCTCTGGATTCCCCCTCCGTAATGTCTGGATATCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGGCTGGAGTGGATCGGATGCATTTATACTGGTAGGGATTGGCCCTACTACGCGAGCT
GGGCGAAAGGCCGATTACCATTTCCAAGTCCTCGTCCGACCACGGTGACTCTCAAATGAC
CAGTCTGACAGCCACGGACACGGCCACATATTTCTGTGCGAGAATTGTTTATGGTGGTGCT
GGTTATAGATTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTTTCCTCA

SEQ ID NO: 37 (C_L-αβ5)

TTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAGGGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATC
TTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATA
AATACTTTCCCGATGTCACCGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGCAT
CGAGAACAGTAAACACCGCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTG
ACACTGACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCA
CGACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG

10 SEQ ID NO: 38 (C_H-αβ5)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCCAGG
 AGCAGCTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGAGGGATCCCTGACACTCACCTG
 CACAGTCTCTGGATTC [REDACTED] TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
 AAGGGGCTGGAGTGGATCGGATGCATTTATACTGGTAGGGATTGGCCCTACTACGCGAGCT
 GGGCGAAAGGCCGATTACCATTTCCAAGTCCTCGTCCGACCACGGTGACTCTCCAAATGAC
 CAGTCTGACAGCCACGGACACGGCCACATATTTCTGT [REDACTED]
 [REDACTED] TGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTTTCTCAGGGCAACCTAAGGCTC
 CATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCAGCTCCACGGTGACCCTGGG
 CTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCCTC
 ACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCA
 GCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCACCTGCAACGTGGCCCACCCAGCCAC
 CAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCCACGTGCCACCC
 CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCTGTCTTCATCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCA
 TGATCTCACGCACCCCCGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGA
 GGTGCAGTTCACATGGTACATAAACAACGAGCAGGTGCGCACCGCCCGGCCGCGCTACGG
 GAGCAGCAGTTCAACAGCACGATCCGCGTGGTCCAGCACCTCCCCATCGCGCACCCAGGACT
 GGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCATCGA
 GAAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAGGTCTACCCATGGGCCCT
 CCCC GGAGGAGCTGAGCAGCAGGTCCGGTCCAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACC
 CTTCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACA ACTACAAGACCAC
 GCCGGCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACG
 AGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGACACAACC
 ACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 41 (CDR-1-V_L-β3)

RFAQIVM

SEQ ID NO: 42 (CDR-2-V_L-β3)

5 QSIYSY

SEQ ID NO: 43 (CDR-3-V_L-β3)

QAYSDSYSYDNS

SEQ ID NO: 44 (CDR-1-V_H-β3)

DFSSDYWMS

10 SEQ ID NO: 45 (CDR-2-V_H-β3)

YINVGDGK

SEQ ID NO: 46 (CDR-3-V_H-β3)

GKDLGL

SEQ ID NO: 47 (FR-1-V_L-β3)

15 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGA

SEQ ID NO: 48 (FR-2-V_L-β3)

TQTPASVEAAVGGTVTIKCQAS

SEQ ID NO: 49 (FR-3-V_L-β3)

LSWFQQKPGQPPLLIIYDASKLASGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECAATFYCQS

20 SEQ ID NO: 50 (β3-inmunógeno incl. proteína GST [subrayado])

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDG
DVKLTQSMALIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYS KDFETLKVDF
LSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDMFLYDALDVVLYMDP MCLDAFPKLVCFKKRI
EAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDGSTRSTSLYKKAGFGGGGSENLYF
QKLLITIHDRKEFAKFEERARAKWDTANNPLYKEATSTFTNITYRGT

SEQ ID NO: 51 (FR-1-V_H-β3)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGGTLTLTCKASGF

SEQ ID NO: 52 (FR-2-V_H-β3)

5 WVRQGP GKGLQWIA

SEQ ID NO: 53 (FR-3-V_H-β3)

TYYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLAAADTATYFC

SEQ ID NO: 54 (FR-4-V_H-β3)

WGPGLVTVSS

10 SEQ ID NO: 55 (V_L-β3: CDRs + FRs)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARFAQIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSIYSYLSWFQQ
KPGQPPNLLIYDASKLASGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECADAAATFYCQSQAYSDSYSY
DNS

SEQ ID NO: 56 (V_H-β3: CDRs + FRs)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGGLVKPGGTLTLTCKASGDFSSDYWMSWVRQGP
KGLQWIAYINVGDKTYYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLAAADTATYFCGKDLGLWG
PGTLVTVSS

SEQ ID NO: 57 (C_L-β3)

FGGGTELVEGDPVAPT VLI FPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTGI
ENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYN SHKEYTCKVTQGTTSV VQSFNRGDC

15

SEQ ID NO: 58 (C_H-β3)

GQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSG
LYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFI FPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLEQQFNSTIRVVSTLP
IAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCM
INGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDS DGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMH
EALHNHYTQKSISRSPGK

SEQ ID NO: 59 (L-β3: CDRs + FRs + C_L)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGA [REDACTED] TQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSIYSYLSWFQQ
KPGQPPNLLIYDASKLASGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECADAAATFYCQS QAYSDSYSY
DNS FGGGTELVEGDPVAPT VLI FPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQT
TGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYN SHKEYTCKVTQGTTSV VQSFNRGDC

ES 2 622 487 T3

SEQ ID NO: 60 (H-β3: CDRs + FRs + CH)

METGLRWLLLVAVLKGVCQSLEESGGGLVKPGGTLTLTCKASGF ██████████ WVRQGP
KGLQWIAYINVGDGKTYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLAAADTATYFC ██████████
PGTLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRT
FPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGG
PSVFIFFPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNS
TIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELS
SRSVSLTCMINGFYPDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRG
DVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

SEQ ID NO: 61 (CDR-1-V_L-β3)

AGATTTGCCCAAATTGTGATG

5 SEQ ID NO: 62 (CDR-2-V_L-β3)

AGCATTTACAGCTA

SEQ ID NO: 63 (CDR-3-V_L-β3)

CAAAGCCAGGCTTATAGTGATAGTTATAGTTATGATAATAG

SEQ ID NO: 64 (CDR-1-V_H-β3)

10 GACTTCAGTAGCGACTACTGGATGTCC

SEQ ID NO: 65 (CDR-2-V_H-β3)

TACATTAATGTTGGTGATGGTAAA

SEQ ID NO: 66 (CDR-3-V_H-β3)

GGCAAAGATTTAGGCTTG

15 SEQ ID NO: 67 (FR-1-V_L-β3)

ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTACTGCTCTGGCTCCCAGGTGCC

SEQ ID NO: 68 (FR-2-V_L-β3)

ACCCAGACTCCAGCCTCCGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGG
CCAGTCAG

SEQ ID NO: 69 (FR-3-V_L-β3)

20 CTTATCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAACCTCCTGATCTACGATGCATCC
AAACTGGCCTCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTC
TCACCATCAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTTCTACTGT

SEQ ID NO: 70 (β3-inmunógeno)

CACGACCGAAAAGAATTCGCTAAATTTGAGGAAGAACGCGCCAGAGCAAAATGGGACACAGCCAACA
ACCCACTGTATAAAGAGGCCACGTCTACCTTACCAATATCACGTACCGGGGCACTTAA

SEQ ID NO: 71 (FR-1-V_H-β3)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTTCAGT
CGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGAGGAACCCTGACACTCACCTGCAA
AGCCTCTGGATTC

SEQ ID NO: 72 (FR-2-V_H-β3)

TGGGTCCGCCAGGGTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGATCGCA

SEQ ID NO: 73 (FR-3-V_H-β3)

ACTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGG
TGACTCTGCAAATGACCAGTCTGGCAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGT

5

SEQ ID NO: 74 (FR-4-V_H-β3)

TGGGGCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 75 (V_L-β3: CDRs + FRs)

ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTACTGCTCTGGCTCCAGGTGCCA
GATTTGCCCAAATTGTGATGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCAC
AGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTACAGCTACTTATCCTGGTTTCAGCAG
AAACCAGGGCAGCCTCCCAACCTCCTGATCTACGATGCATCCAAACTGGCCTCTGGGGTCC
CATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGACCTGGA
GTGTGCCGATGCTGCCACTTTCTACTGTCAAAGCCAGGCTTATAGTGATAGTTATAGTTAT
GATAATAG

10 SEQ ID NO: 76 (V_H-β3: CDRs + FRs)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTTCAGT
CGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGAGGAACCCTGACACTCACCTGCAA
AGCCTCTGGATTCGACTTCAGTAGCGACTACTGGATGTCTGGGTCCGCCAGGGTCCAGGG
AAGGGGCTGCAGTGGATCGCATACTAATGTTGGTGATGGTAAACTTACTACGCGAGCT
GGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTIONCTGCAAATGAC
CAGTCTGGCAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGGCAAAGATTTAGGCTTGTGGGGC
CCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 77 (C_L-β3)

TTTCGGCGGGGGGACCGAACTGGTGGTGAAGGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCTCCTCATC
TTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATA
AATACTTTCCCGATGTCACCGTACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGCAT
CGAGAACAGTAAACACCGCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTG
ACACTGACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCA
CGACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG

SEQ ID NO: 78 (C_H-β3)

GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCCTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAGCT
 CCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCCTGACCTG
 GAACTCGGGCACCTCACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCCTCAGGC
 CTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCACCTGCAACG
 TGGCCCACCCAGCCACCAACACCAAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGACATGCAGCAA
 GCCACGTGCCACCCCCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAA
 CCCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCACCCCCGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCACATGGTACATAAAACAACGAGCAGGTGCGCACCCG
 CCGGCCCGCTACGGGAGCAGCAGTTCACACGACGATCCGCGTGGTACGACCCCTCCCC
 ATCGCGCACCAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAGTGCAGGTCACACAACAGGCAC
 TCCCGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAGGT
 CTACACCATGGGCCCTCCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTCCGGTACGCTGACCTGCATG
 ATCAACGGCTTCTACCCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGG
 ACAACTACAAGACCACGCCGGCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCTCTACAGCAA
 GCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTACCTGCTCCGTGATGCAC
 GAGGCCTTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTA

SEQ ID NO: 79 (L-β3: CDRs + FRs + CL)

ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTACTGCTCTGGCTCCAGGTGCC
 ACCCAGACTCCAGCCTCCGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCAC
 AGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTACAGCTACTTATCCTGGTTTCAGCAG
 AAACCAGGGCAGCCTCCCAACCTCCTGATCTACGATGCATCCAAACTGGCCTCTGGGGTCC
 CATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGACCTGGA
 GTGTGCCGATGCTGCCACTTTCTACTGTCAAAGCCAGCCTTATAGTATAGTATAGTTAT
 GATAATAGTTTCGGCGGGGGACCGAACTGGTGGTTCGAAGGTGATCCAGTTGCACCTACTG
 TCCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGT
 GGCGAATAAATACTTCCCAGTGTACCGTACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACA
 ACTGGCATCGAGAACAGTAAAACACCGCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCA
 GCACTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGAC
 CCAGGGCACGACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG

SEQ ID NO: 80 (H-β3: CDRs + FRs + CH)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCACT
 CGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGAGGAACCCTGACACTCACCTGCAA
 AGCCTCTGGATTCTGGGTCCGCCAGGGTCCAGGG
 AAGGGGCTGCAGTGGATCGCATAATTAATGTTGGTGGTAAACTTACTACGCGAGCT
 GGGCGAAAGGCCGATTACCATTCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAAATGAC
 CAGTCTGGCAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGGGGC
 CCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCCTGG
 CCCCTGCTGCGGGGACACACCAGCTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTA
 CCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCTCACCAATGGGGTACGCACC
 TTCCCGTCCGTCCGGCAGTCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGGAGCGTGACCT
 CAAGCAGCCAGCCCGTCACTGCAACGTGGCCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGGACAA
 GACCGTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCCACGTGCCACCCCTGAACTCCTGGGGGGA
 CCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCACCCCG
 AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTACATGGTA
 CATAACAACGAGCAGGTGCGCACCCGCCCGCCGCTACGGGAGCAGCAGTTCAACAGC
 ACGATCCGCGTGGTCAGCACCTCCCATCGCGCACCCAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGT
 TCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC
 CAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCCGGGAGGAGCTGAGC
 AGCAGGTGCGTCAACCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCTTCCGACATCTCGGTGG
 AGTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACACTACAAGACCACGCCGCGCTGCTGGACAG
 CGACGGCTCCTACTTCTTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGC
 GACGTCTTACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGCAACAACCACTACACGCAGAAGTCCA
 TCTCCCGCTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 81 (CDR-1-V_L-avβ3)

TFAQVL

SEQ ID NO: 82 (CDR-2-V_L-avβ3)

5 ESVYADIA

SEQ ID NO: 83 (CDR-3-V_L-avβ3)

AGDYGAGTEPNL

SEQ ID NO: 84 (CDR-1-V_H-avβ3)

SLSSYGVS

10 SEQ ID NO: 85 (CDR-2-V_H-avβ3)

SISTTGI

SEQ ID NO: 86 (CDR-3-V_H-avβ3)

ARGFPGHLRKPSDI

SEQ ID NO: 87 (FR-1-V_L-avβ3)

15 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGA

SEQ ID NO: 88 (FR-2-V_L-avβ5)

TQTPSSVSAVGGTVSISCQSS

SEQ ID NO: 89 (FR-3-V_L-avβ3)

LSWFQQKPGQPPLLIYGASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISDVQCDAATYYC

SEQ ID NO: 90 (DTM- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$)

GPNICTTRGVSSCQQCLAVSPMCAWCSDEALPLGSPRCDLKENLLKDNCAPESIEFPVSEA
RVLEDRPLSDKSGDSSQVTQVSPQRIALRLRPDDSKNFSIQVRQVEDYPVDIYYLMDLSY
SMKDDLWSIQNLGTKLATQMRKLTSNLRIGFGAFVDKPVSPYMYISPPEALENPCYDMKTT
CLPMFGYKHVLTLTLDQVTRFNEEVKKQSVSRNRDAPEGGFDAIMQATVCDEKIGWRNDASH
LLVFTTDAKTHIALDGRLAGIVQPNDGQCHVGSNDHYSASTTMDYPSLGLMTEKLSQKNIN
LIFAVTENVVNLYQNYSELI PGTTVGVLSMDSSNVLQLIVDAYGKIRSKVELEVRDLPEEL
SLSFNATCLNNEV I PGLKSCMGLKIGDTV SFS IEAKVRGCPQEKEKSFTIKPVGFKDSLIV
QVTFDCDCACQAQAEPNSHRCNNGNGTFECGVCRCGPWLGSGQCECSEEDYRPSQODECSP
REGQPVCSQRGECLCGQCVCHSSDFGKITGKYCECDDFSCVRYK GEMCSGHGQCS CGDCLC
DSDWTGYCNCCTTRTDTCMSSNGLLCSGRGKCECGSCVCIQPGSYGDTCEKCPTCPDACTF
KKECVECKKFDREPYMTENTCNRYCRDEIESVKELKDTGKDAVNCTYKNEDDCVVRFQYYE
DSSGKSILYVVEEPEC PKGPD

SEQ ID NO: 91 (FR-1- $V_{\text{H}}\text{-}\alpha\text{v}\beta\text{3}$)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVKESEGGLFKPTDTLILTCTVSGF

5 SEQ ID NO: 92 (FR-2- $V_{\text{H}}\text{-}\alpha\text{v}\beta\text{3}$)

WVRQAPGNLEYIG

SEQ ID NO: 93 (FR-3- $V_{\text{H}}\text{-}\alpha\text{v}\beta\text{3}$)

TYYASWAKSRSTITRNTNLYTVTLKMTGLTAADTATYFC

SEQ ID NO: 94 (FR-4- $V_{\text{H}}\text{-}\alpha\text{v}\beta\text{3}$)

10 WGPGLVTVSA

SEQ ID NO: 95 ($V_{\text{L}}\text{-}\alpha\text{v}\beta\text{3}$: CDRs + FRs)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTPSSVSAAVGGTVSISCQSSES VYADIALSWFQ
QKPGQPPKLLIYGASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISDVQCDAATYYCAGDYGAGTEP
NL

SEQ ID NO: 96 ($V_{\text{H}}\text{-}\alpha\text{v}\beta\text{3}$: CDRs + FRs)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVKESEGGLFKPTDTLILTCTVSGFSLSSYGVS WVRQAPGN
GLEYIGSISTTGITYYASWAKSRSTITRNTNLYTVTLKMTGLTAADTATYFCARGFP GHLR
KPSDIWGPGLVTVSA

15 SEQ ID NO: 97 ($C_{\text{L}}\text{-}\alpha\text{v}\beta\text{3}$)

FGGGTEVVVSGDPVAPT VLI FPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGI
ENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

SEQ ID NO: 98 ($C_{\text{H}}\text{-}\alpha\text{v}\beta\text{3}$)

GQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTF PPSVRQSSG
LYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFI FPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPP LREQQFNSTIRVVSTLP
IAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTI SKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCM
INGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMH
EALHNHYTQKSISRSPGK

SEQ ID NO: 99 (L- α β 3: CDRs + FRs + CL)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGA [REDACTED] TQTPSSVSAAVGGTVSISCSSESSESVYADIALSWFQ
QKPGQPPKLLIYGASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SDVQCDAATYYC [REDACTED] AGDYGAGTEE
[REDACTED] FGGGTEVVVSGDPVAPTFLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTT
GIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

SEQ ID NO: 100 (H- α β 3: CDRs + FRs + CH)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVKESEGGLFKPTDTLILTCTVSGF [REDACTED] WVRQAPGN
GLEIYIGSISTTGITYYASWAKSRSTITRNTNLYTVTLKMTGLTAADTATYFC [REDACTED] ARGFPCHLR
[REDACTED] KPSDIWGPGLVTVSAGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGT
LTNGVRTFPVSRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCP
PPELLGGPSVFI FPPKPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSDQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPPL
REQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMG
PPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLSDSGSYFLYSKLSVP
TSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

5 SEQ ID NO: 101 (CDR-1-VL- α β 3)

ACATTTGCCCAAGTGCTG

SEQ ID NO: 102 (CDR-2-VL- α β 3)

AGTGTTTATGCTGACATCGC

SEQ ID NO: 103 (CDR-3-VL- α β 3)

10 GCAGGCGATTATGGGGCTGGTACTGAGCCTAATCTT

SEQ ID NO: 104 (CDR-1-VH- α β 3)

TCCCTCAGTAGCTATGGAGTGAGC

SEQ ID NO: 105 (CDR-2-VH- α β 3)

TCCATTAGTACTACTGGTATC

15 SEQ ID NO: 106 (CDR-3-VH- α β 3)

GAGGTTTTCTGGTCATCTTCGTAAGCCGTCGGACA

SEQ ID NO: 107 (FR-1-VL- α β 3)

ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCC

SEQ ID NO: 108 (FR-2-VL- α β 3)

ACCCAGACTCCATCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCAGCATCAGTTGCCAGT
CCAGTGAG

20

SEQ ID NO: 109 (FR-3-VL- α β 3)

CTTATCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCC
ACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTC
TCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGCTGCTGCCACTTACTATTGT

SEQ ID NO: 110 (DTM- α β 3 incl. péptido de señal [minúscula])

atgcgagcgcggccgcggccccggccgctctgggtgactgtgctggcgcgtgggggcgctgg
 cgggcgcttggcgttaggaGGGCCCAACATCTGTACCACGCGAGGTGTGAGCTCCTGCCAGCA
 GTGCCTGGCTGTGAGCCCCATGTGTGCCTGGTGTCTGATGAGGCCCTGCCTCTGGGCTCA
 CCTCGCTGTGACCTGAAGGAGAATCTGCTGAAGGATAACTGTGCCCCAGAATCCATCGAGT
 TCCCAGTGAGTGAGGCCGAGTACTAGAGGACAGGCCCTCAGCGACAAGGGCTCTGGAGA
 CAGCTCCAGGTCACCTCAAGTCAGTCCCCAGAGGATTGCACTCCGGCTCCGGCCAGATGAT
 TCGAAGAATTTCTCCATCCAAGTGCGGCAGGTGGAGGATTACCCTGTGGACATCTACTACT
 TGATGGACCTGTCTTACTCCATGAAGGATGATCTGTGGAGCATCCAGAACCCTGGGTACCAA
 GCTGGCCACCCAGATGCGAAAGCTCACCAGTAACCTGCGGATTGGCTTTCGGGGCATTGTG
 GACAAGCCTGTGTCACCATACATGTATATCTCCCCACCAGAGGCCCTCGAAAACCCCTGCT
 ATGATATGAAGACCACCTGCTTGCCCATGTTTGGCTACAAACACGTGCTGACGCTAACTGA
 CCAGGTGACCCGCTTCAATGAGGAAGTGAAGAAGCAGAGTGTGTCACGGAACCGAGATGCC
 CCAGAGGGTGGCTTTGATGCCATCATGCAGGCTACAGTCTGTGATGAAAAGATTGGCTGGA
 GGAATGATGCATCCCCTTGCTGGTGTTTACCACTGATGCCAAGACTCATATAGCATTGGA
 CGGAAGGCTGGCAGGCATTGTCCAGCCTAATGACGGGCAGTGTATGTTGGTAGTGACAAT
 CATTACTCTGCCTCCACTACCATGGATTATCCCTCTTTGGGGCTGATGACTGAGAAGCTAT
 CCCAGAAAAACATCAATTTGATCTTTGCAGTGACTGAAAATGTAGTCAATCTCTATCAGAA
 CTATAGTGAGCTCATCCCAGGGACCACAGTTGGGGTTCTGTCCATGGATTCCAGCAATGTC
 CTCCAGCTCATTGTTGATGCTTATGGGAAAATCCGTTCTAAAGTCGAGCTGGAAGTGCGTG
 ACCTCCCTGAAGAGTTGTCTCTATCCTTCAATGCCACCTGCCTCAACAATGAGGTCATCCC
 TGGCCTCAAGTCTTGTATGGGACTCAAGATTGGAGACACGGTGAGCTTCAGCATTGAGGCC
 AAGGTGCGAGGCTGTCCCAGGAGAAGGAGAAGTCCTTTACCATAAAGCCCGTGGGCTTCA
 AGGACAGCCTGATCGTCCAGGTCACCTTTGATTGTGACTGTGCCTGCCAGGCCCAAGCTGA
 ACCTAATAGCCATCGCTGCAACAATGGCAATGGGACCTTTGAGTGTGGGGTATGCCGTTGT
 GGGCCTGGCTGGCTGGGATCCCAGTGTGAGTGTCTCAGAGGAGGACTATCGCCCTTCCAGC
 AGGACGAGTGCAGCCCCCGAGAGGGTCAGCCCGTCTGCAGCCAGCGGGGCGAGTGCCTCTG
 TGGTCAATGTGTCTGCCACAGCAGTGACTTTGGCAAGATCACGGGCAAGTACTGCGAGTGT
 GACGACTTCTCCTGTGTCCGCTACAAGGGGGAGATGTGCTCAGGCCATGGCCAGTGCAGCT
 GTGGGGACTGCCTGTGTGACTCCGACTGGACCGGCTACTACTGCAACTGTACCACGCGTAC
 TGACACCTGCATGTCCAGCAATGGGCTGCTGTGCAGCGGCCGCGGCAAGTGTGAATGTGGC
 AGCTGTGTCTGTATCCAGCCGGGCTCCTATGGGGACACCTGTGAGAAGTGCCCCACCTGCC
 CAGATGCCTGCACCTTTAAGAAAGAAATGTGTGGAGTGTAAGAAGTTTGACCGGGAGCCCTA
 CATGACCGAAAATACCTGCAACCGTTACTGCCGTGACGAGATTGAGTCAGTGAAAGAGCTT
 AAGGACACTGGCAAGGATGCAGTGAATTGTACCTATAAGAATGAGGATGACTGTGTCTGCA
 GATTCAGTACTATGAAGATTCTAGTGGAAGTCCATCCTGTATGTGGTAGAAGAGCCAGA
 GTGTCCCAAGGGCCCTGAC

SEQ ID NO: 111 (FR-1-V_H-αβ3)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCACT
 CGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTCTTCAAGCCAACGGATACCCTGATACTCACCTGCAC
 AGTCTCTGGATTC

SEQ ID NO: 112 (FR-2-V_H-αβ3)

5 TGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAACGGGCTGGAATACATCGGA

SEQ ID NO: 113 (FR-3 -V_H-αβ3)

ACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAACACCAACCTGTACA
CGGTGACTCTGAAAATGACCCGGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGA

SEQ ID NO: 114 (FR-4-V_H-αβ3)

TTTGGGGCCCCGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCGCA

SEQ ID NO: 115 (V_L-αβ3: CDRs + FRs)

ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCA
CATTTGCCCAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGT
CAGCATCAGTTGCCAGTCCAGTGAGAGTGTTTATGCTGACATCGCCTTATCCTGGTTTCAG
CAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCACTCTGGCATCTGGGG
TCCCATCGCGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCGACGT
GCAGTGTGACGCTGCTGCCACTTACTATTGTGCAGGCGATTATGGGGCTGGTACTGAGCCT
AATCTT

5

SEQ ID NO: 116 (V_H-αβ3: CDRs + FRs)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCACT
CGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTCTTCAAGCCAACGGATACCCTGATACTCACCTGCAC
AGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATGGAGTGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAC
GGGCTGGAATACATCGGATCCATTAGTACTACTGGTATCACATACTACGCGAGCTGGGCGA
AAAGCCGATCCACCATCACCAGAAACACCAACCTGTACACGGTGACTCTGAAAATGACCCG
TCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAGAGGTTTTCTGGTCACTTTCTG
AAGCCGTCGGACATTTGGGGCCCCGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCGCA

SEQ ID NO: 117 (C_L-αβ3)

TTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAGCGGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCT
TCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAA
ATACTTTCCCGATGTCACCGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGCATC
GAGAACAGTAAAACACCGCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGA
CACTGACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCAC
GACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG

10 SEQ ID NO: 118 (C_H-αβ3)

GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCCTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAGCT
 CCACGGTGACCCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTG
 GAACTCGGGCACCCTACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCCCTCAGGC
 CTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTACCTGCAACG
 TGGCCCCACCCAGCCACCAACACCAAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGACATGCAGCAA
 GCCACGTGCCACCCCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAA
 CCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCACCCCCGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCACATGGTACATAAAACAACGAGCAGGTGCGCACCCG
 CCGGCCCGCGCTACGGGAGCAGCAGTTCACACAGCAGATCCGCGTGGTCCAGCACCCTCCCC
 ATCGCGCACCAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAGAGTCAAAGTCCACAACAAGGCAC
 TCCCGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAGGT
 CTACACCATGGGCCCTCCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTCGGTCCAGCCTGACCTGCATG
 ATCAACGGCTTCTACCCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGG
 ACAACTACAAGACCACGCCGGCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCCTCTACAGCAA
 GCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTACCTGCTCCGTGATGCAC
 GAGGCCTTGACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 119 (L- α v β 3: CDRs + FRs + C_L)

ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCC
 ACCCAGACTCCATCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGT
 CAGCATCAGTTGCCAGTCCAGTGAGAGTGTATGCTGACATCGCCTTATCCTGGTTTCAG
 CAGAAACCAGGGCAGCCTCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCACTCTGGCATCTGGGG
 TCCCATCGCGGTTCCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCGACGT
 GCAGTGTGACGCTGCTGCCACTTACTATTGTCCACACGATTATCGGCTGGTACTGACCT
 ATCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCCAGCGGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCC
 TCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGC
 GAATAAATACTTCCCGATGTCACCGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACA
 GGCATCGAGAACAGTAAACACCGCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCA
 CTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCA
 GGGCACGACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG

SEQ ID NO: 120 (H- α v β 3: CDRs + FRs + C_H)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTGGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGAGT
 CGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTCTTCAAGCCAACGGATAACCTGATACTCACCTGCAC
 AGTCTCTGGATTCTGGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAC
 GGGCTGGAATACATCGGATCCATTAGTACTACTGGTATCACATACTACGCGAGCTGGGCGA
 AAAGCCGATCCACCATCACAGAAACACCAACCTGTACACGGTGACTCTGAAAATGACCGG
 TCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGA
 AAGCCGTGGACA
 TTTGGGGCCCCGGCACCCCTGGTACCCTCTCCGCAGGGCAACCTAAGG
 CTCCATCAGTCTTCCCCTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCAGCTCCACGGTGACCCT
 GGGCTGCCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCAGGAGCCAGTGACCCGTGACCTGGAACCTCGGGCACC
 CTCACCAATGGGGTACGCACCTTCCCCTCCGTCCGGCAGTCCCTCAGGCCTCTACTCGCTGA
 GCAGCGTGGTGGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCACCTGCAACGTGGCCCACCCAGC
 CACCAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCACGTGCCCA
 CCCCCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCTGTCTTTCATCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCC
 TCATGATCTCACGCACCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCC
 CGAGGTGCAGTTCACATGGTACATAAAACAACGAGCAGGTGCGCACCCGCCCCGGCCCGCTA
 CGGGAGCAGCAGTTCAACAGCACGATCCGCGTGGTCCAGCACCCCTCCCATCGCGCACCAGG
 ACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCCAT
 CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGC
 CCTCCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTCCGTGAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCT
 ACCCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACACTACAAGAC
 CACGCCGGCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCC
 ACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGACA
 ACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCCTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 121 (CDR-1-V_L-αβ6)

RCAYDMTQTPASVEW

SEQ ID NO: 122 (CDR-2-V_L-αβ6)

5 QSVGIN

SEQ ID NO: 123 (CDR-3-V_L-αβ6)

QTYSSGNVDNV

SEQ ID NO: 124 (CDR-1-V_H-αβ6)

IDLSSAAN

10 SEQ ID NO: 125 (CDR-2-V_H-αβ6)

VIGGSTGPY

SEQ ID NO: 126 (CDR-3-V_H-αβ6)

GLFGINNDISRI

SEQ ID NO: 127 (FR-1-V_L-αβ6)

15 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGA

SEQ ID NO: 128 (FR-2-V_L-αβ6)

VGGVTIKCQAS

SEQ ID NO: 129 (FR-3-V_L-αβ6)

LAWYQKKSQRPKLLIYAASLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDLECADAATYYCQ

SEQ ID NO: 130 (DTM- α v β 6)

GRNDHVQGGCAVGGAEETCEDCLLIGPQCAWCSQENFTHLSGVGERCDTPANLLAKGCQLTF
IENPVSQVEILTNKPLSIGRQKNSSDIVQISPOQLALKLRPGLEQTLQVQVRQTEDYPVDL
YYLMDLSASMDDLNTIKELGSLLSKEMSKLTSNFRGLGFGSFVEKPI SPMKTTPEEIANP
CSSIPYFCLPTFGFKHILPLTND AERFNEIVKNQKISANIDTPEGGFDAIMQAAVCKEKIG
WRNDSLHLLLVFVSDADSHFGMDSKLAGIVIPNDGLCHLDSKNEYSMSTILEYPTIGQLIDK
LVQNNVLLIFAVTQEQVHLYENYAKLIPGATVGVLOKDSGNILQLIISAYEELRSEVELEV
LGDTEGLNLSFTAICNTGIPVPHQKCSHMKVGD TASFNVTVSLPNCERRSRHIILKPVGL
GDALEILVSPECSCDCQKEVEVNSSKCNNGNSFQCGVCACHPGHMGHHCECGEDTLSTES
CKEAPGRPSCSGRGDCYCGQCVCHLSPYGNIYGPYCQDNFSCVRHKGLLCGDNGDCDCGE
CVCRSWGTGEYCNC'TTSTDPVSEDGILCSGRGDCVCGKCICTNPGASGPTCERCPTCGDP
CNSKRSCIECYLSADGQAQEECVDKCKLAGATINEEEDFSKDSFVSCSLQGENECLITFLL
TTDNEGKTVIHSINEKDCPKPPN

SEQ ID NO: 131 (FR-1-V_H- α v β 6)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGRLVKPGTPLTLTCTVSG

5 SEQ ID NO: 132 (FR-2-V_H- α v β 6)

WVRQAPGKLEWIG

SEQ ID NO: 133 (FR-3-V_H- α v β 6)

YASWVNGRFTISKSTTTVALKIAGPTTEDTATYFCAR

SEQ ID NO: 134 (FR-4-V_H- α v β 6)

10 WGPGLVTVSL

SEQ ID NO: 135 (V_L- α v β 6: CDRs + FRs)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCAYDMTQTPASVEVVVGGTVTIKQASQSVGINLAWYQKK
SGQRPKLLIYAAS TLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYCQQTYSSGNVDNV

SEQ ID NO: 136 (V_H- α v β 6: CDRs + FRs)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGRLVKPGTPLTLTCTVSGIDLSSAAINWVRQAPGK
GLEWIGVIGGSTGPYYASWVNGRFTISKSTTTVALKIAGPTTEDTATYFCARGLFGINNDI
SRIWGPGLVTVSL

15 SEQ ID NO: 137 (C_L- α v β 6)

FGGGTEVVVKGDPVAPT VLI FPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGI
ENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQYN SHKEYTCKVTXGTTSSVVQSFNRGDC

SEQ ID NO: 138 (C_H- α v β 6)

GQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPFSVRQSSG
LYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFFPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLP
IAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCM
INGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMH
EALHNHYTQKSISRSPGK

SEQ ID NO: 139 (L- $\alpha\beta$ 6: CDRs + FRs + C_L)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGA [REDACTED] VGGTVTIKQASQSVGINLAWYQKK
SGQRPKLLIYAASSTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYCO [REDACTED] [REDACTED]
FGGGTEVVVKGDPVAPT VLIFFPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGI
ENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVXTXGTTSVVQSFNRGDC

SEQ ID NO: 140 (H- $\alpha\beta$ 6: CDRs + FRs + C_H)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGRLVKPGTPLTLTCTVSG [REDACTED] WVRQAPGK
GLEWIGVIGGSTGPYYASWVNGRFTISKSTTTVALKIAGPTTEDTATYFCAR [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED] [REDACTED] WGPGLVTVSLGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLT
NGVRTFPFSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPP
ELLGGPSVFIFFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLRE
QQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPP
REELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGGSYFLYSKLSVPTS
EWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

5

SEQ ID NO: 141 (CDR-1-V_L- $\alpha\beta$ 6)

AGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGTT

SEQ ID NO: 142 (CDR-2-V_L- $\alpha\beta$ 6)

CAGAGCGTTGGTATTAAT

10 SEQ ID NO: 143 (CDR-3-V_L- $\alpha\beta$ 6)

CAGACTTATAGTAGTGGTAATGTTGATAATGTG

SEQ ID NO: 144 (CDR-1-V_H- $\alpha\beta$ 6)

TCGACCTCAGTAGCGCTGCAATAAAC

SEQ ID NO: 145 (CDR-2-V_H- $\alpha\beta$ 6)

15 GTCATTGGTGGTAGTACCGGTCCATAC

SEQ ID NO: 146 (CDR-3-V_H- $\alpha\beta$ 6)

GGCTTGTTGGTATAAATAATGATATTAGTAGGATC

SEQ ID NO: 147 (FR-1-V_L- $\alpha\beta$ 6)

ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCC

20 SEQ ID NO: 148 (FR-2-V_L- $\alpha\beta$ 6)

GTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGT

SEQ ID NO: 149 (FR-3-V_L- $\alpha\beta$ 6)

TTAGCCTGGTATCAAAAAAATCAGGGCAGCGTCCCAAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCA
 CTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCT
 CACCATCAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTATTGTGAG

SEQ ID NO: 150 (DTM- $\alpha\beta 6$ incl. péptido de señal [minúscula])

atggggattgaactgctttgcctggttctttctatttctaGGAAGGAATGATCACGTACAAG
 GTGGCTGTGCCCTGGGAGGTGCAGAAACCTGTGAAGACTGCCTGCTTATTGGACCTCAGTG
 TGCCTGGTGTGCTCAGGAGAATTTTACTCATCCATCTGGAGTTGGCGAAAGGTGTGATACC
 CCAGCAAACCTTTTAGCTAAAGGATGTCAATTAACCTTCATCGAAAACCTGTCTCCCAAG
 TAGAAATACTTAAAAATAAGCCTCTCAGTGTAGGCAGACAGAAAAATAGTTCTGACATTGT
 TCAGATTGCGCCTCAAAGCTTGATCCTTAAGTTGAGACCAGGTGGTGCAGACTCTGCAG
 GTGCATGTCCGCCAGACTGAGGACTACCCGGTGGATTTGTATTACCTCATGGACCTCTCCG
 CCTCCATGGATGACGACCTCAACACAATAAAGGAGCTGGGCTCCCGGCTTTCCAAAGAGAT
 GTCTAAATTAACCAGCAACTTTAGACTGGGCTTCGGATCTTTTGTGGAAAACCTGTATCC
 CCTTTCGTGAAAACAACACCAGAAGAAATTGCCAACCTTGCAGTAGTATTCCATACTTCT
 GTTTACCTACATTTGGATTCAAGCACATTTTGGCATTGACAAATGATGCTGAAAGATTCAA
 TGAAATTGTGAAGAATCAGAAAATTTCTGCTAATATTGACACACCCGAAGGTGGATTTGAT
 GCAATTATGCAAGCTGCTGTGTGTAAGGAAAAAATTGGCTGGCGGAATGACTCCCTCCACC
 TCCTGGTCTTTGTGAGTGATGCTGATTCTCATTTTGGAAATGGACAGCAAACCTAGCAGGCAT
 CGTCATTCCTAATGACGGGCTCTGTCACTTGGACAGCAAGAATGAATACTCCATGTCAACT
 GTCTTGGAAATATCCAACAATTGGACAACCTCATTGATAAACTGGTACAAAACAACGTGTTAT
 TGATCTTCGCTGTAACCCAAGAACAAGTTCATTTATATGAGAATTACGCAAACCTTATTCC
 TGGAGCTACAGTAGGTCTACTTCAGAAGGACTCCGGAAACATTCTCCAGCTGATCATCTCA
 GCTTATGAAGAACTGCGGTCTGAGGTGGAAGTATTAGGAGACACTGAAGGACTCA
 ACTTGTCAATTTACAGCCATCTGTAACAACGGTACCCTCTTCCAACACCAAAGAAATGCTC
 TCACATGAAAGTGGGAGACACAGCTTCCTTCAGCGTGAAGTATCCCAACTGCGGAG
 AGAAGAAGCAGGCACATTATCATAAAGCCTGTGGGGCTGGGGGATGCCCTGGAATTAATTG
 TCAGCCCAGAATGCAACTGCGACTGTCAGAAAGAAGTGAAGTGAACAGCTCCAAATGTCA
 CCACGGGAACGGCTCTTCCAGTGTGGGGTGTGTGCCTGCCACCCTGGCCACATGGGGCCT
 CGCTGTGAGTGTGGCGAGGACATGCTGAGCACAGATTCTGCAAGGAGGCCCCAGATCATC
 CCTCCTGCAGCGGAAGGGGTGACTGCTACTGTGGGCAGTGTATCTGCCACTTGTCTCCCTA
 TGAAACATTTATGGGCCTTATTGCCAGTGTGACAATTTCTCCTGCGTGAGACACAAAGGG
 CTGCTCTGCGGAGGTAACGGCGACTGTGACTGTGGTGAATGTGTGTGCAGGAGCGGCTGGA
 CTGGCGAGTACTGCAACTGCACCACCAGCACGGACTCCTGCGTCTCTGAAGATGGAGTGCT
 CTGCAGCGGGCGCGGGGACTGTGTTTGTGGCAAGTGTGTTTGCACAAACCTGGAGCCTCA
 GGACCAACCTGTGAACGATGTCCTACCTGTGGTGACCCCTGTAACCTAAACCGGAGCTGCA
 TTGAGTGCCACCTGTGAGCAGCTGGCCAAGCCCGAGAAGAATGTGTGGACAAGTGCAAACCT
 AGCTGGTGCAGCCATCAGTGAAGAAGAAGATTTCTCAAAGGATGGTTCTGTTTCTGCTCT
 CTGCAAGGAGAAAATGAATGTCCTTATTACATTCCTAATAACTACAGATAATGAGGGGAAAA
 CCATCATTACAGCATCAATGAAAAGATTGTCCGAAGCCTCCAAAC

SEQ ID NO: 151 (FR-1-VH- $\alpha\beta 6$)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGAGT
 CGCTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCCTGGTCAAGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCAC
 AGTCTCTGGAA

ES 2 622 487 T3

SEQ ID NO: 152 (FR-2-V_H-αβ6)

TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGG

SEQ ID NO: 153 (FR-3-V_H-αβ6)

TACGCGAGCTGGGTGAATGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGCTCTGA
AAATCGCCGGGCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGA

5 SEQ ID NO: 154 (FR-4-V_H-αβ6)

TGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTTA

SEQ ID NO: 155 (V_L-αβ6: CDRs + FRs)

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCA
GATGTGCCATATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGTTGTGGGAGGCACAGT
CACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCGTTGGTATTAATTTAGCCTGGTATCAAAAAAAAA
TCAGGGCAGCGTCCCAAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCAT
CGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCCTCACCATCAGCGACCTGGAGTG
TGCCGATGCTGCCACTTACTATTGTCAGCAGACTTATAGTAGTGGTAATGTTGATAAATGTG

SEQ ID NO: 156 (V_H-αβ6: CDRs + FRs)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGAGT
CGCTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCCTGGTCAAGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCAC
AGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAGCGCTGCAATAAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
GGGCTGGAATGGATCGGGGTCATTGGTGGTAGTACCGGTCCATACTACGCGAGCTGGGTGA
ATGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGCTCTGAAAATCGCCGGGCCGAC
AACCAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGGCTTGTTTGGTATAAATAATGATATT
AGTAGGATCTGGGGCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTTA

10

SEQ ID NO: 157 (C_L-αβ6)

TTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCT
TCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAA
ATACTTTCCCGATGTCACCGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGCATC
GAGAACAGTAAAACCCGCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGA
CACTGACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACNNAGGGCAC
GACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAGAGTGAGAGCGGCCGC

SEQ ID NO: 158 (C_H-αβ6)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGT CAGT
 CGCTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCTGGTCAAGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCAC
 AGTCTCTGGAA ██████████ TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
 GGGCTGGAATGGATCGGGGTCATTGGTGGTAGTACCGGTCCATACTACGCGAGCTGGGTGA
 ATGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGCTCTGAAAATCGCCGGGCCGAC
 AACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGA ~~GGCTTGTGGTATAAATAATATAT~~
~~AGTAGGATC~~ TGGGGCCAGGCACCCTGGTACCCTCCTTAGGGCAACCTAAGGCTCCAT
 CAGTCTTCCCCTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCAGCTCCACGGTGACCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCTCACC
 AATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCG
 TGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCGTCACCTGCAACGTGGCCCACCCAGCCACCAA
 CACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCACGTGCCACCCCCT
 GAACTCCTGGGGGGACCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGA
 TCTCACGCACCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGT
 GCAGTTCACATGGTACATAACAACGAGCAGGTGCGCACCCGCCGCCGCTACGGGAG
 CAGCAGTTCAACAGCAGCATCCGCGTGGTACGACCCCTCCCATCGCGCACCAGGACTGGC
 TGAGGGGCAAGGAGTTC AAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCCATCGAGAA
 AACCATCTCAAAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCC
 CGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTCCGTGAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCTT
 CCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACA ACTACAAGACCACGCC
 GGCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGT
 GAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGCAACAACCACT
 ACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAATGAGCGCTGTGCCGGCGAGCTGCGGC
CGC

SEQ ID NO: 161 (CDR-1-VL- α V β 8)

RCDVVMTQTPSSVSEP

SEQ ID NO: 162 (CDR-2-VL- α V β 8)

5 ENIYSS

SEQ ID NO: 163 (CDR-3-VL- α V β 8)

QCTGGIIIDGGA

SEQ ID NO: 164 (CDR-1-VH- α V β 8)

FSLNSGNMQ

10 SEQ ID NO: 165 (CDR-2-VH- α V β 8)

YIGSGGSTF

SEQ ID NO: 166 (CDR-3-VH- α V β 8)

GRYGGSRGV

SEQ ID NO: 167 (FR-1-VL- α V β 8)

15 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGA

SEQ ID NO: 168 (FR-2-VL- α V β 8)

VGGTVTINCQAS

SEQ ID NO: 169 (FR-3-VL- α V β 8)

LAWYQQKPGQPPLLIIYAASNLASGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLACADAATYYC

SEQ ID NO: 170 (DTM- $\alpha\beta 8$)

EDNRCASSNAASCARCLALGPECGWCVQEDFISGGSRSERCDIVSNLISKGCSVDSIEYPS
VHVIIPTENEINTQVTPGEVSIQLRPGAEANFMLKVHPLKKYPVDLYLVDSASMHNNIE
KLNSVGNLDRKMAFFSRDFRLGFGSYVDKTVSPYISIHPERIHNQCSYNDLDCMPPHGYI
HVLSTENITEFEKAVHRQKISGNIDTPEGGFDMALQAAVCESHIGWRKEAKRLLLVMTDQ
TSHLALDSKLAGIVVPNDGNCHLKNNVYVKSTTMEHPSLGQLSEKLIDNNINVI FAVQGKQ
FHWYKDLLPLLPGTIAGEIESKAANLNLVVEAYQKLI SEVKVQVENQVQGIYFNITAI CP
DGSRKPGMEGCRNVTSNDEVLFNVTVTMKKCDVTGGKNYAIIKPIGFNETAKIHIHRNCSC
QCEDNRGPKGKCVDETFLDKCFQCDENKCHFDEDQFSSESCKSHKDQPVCSGRGVCVCGK
CSCHKIKLGKVGKYCEKDDFSCPYHHGNLCAGHGECEAGRCQCFSGWEGDRQCPSAAAQ
HCVNSKGQVCSGRGTCVCGRCECTDPRSIGRFEHCPTCYTACKENWNCMQCLHPHNL SQA
ILDQCKTSCALMEQQHYVDQTSECFSSPSYLR

SEQ ID NO: 171 (FR-1-V_H- $\alpha\beta 8$)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVEESGGRLVTPGTPLTLTCAVSG

5 SEQ ID NO: 172 (FR-2-V_H- $\alpha\beta 8$)

WVRQAPGKLEYIG

SEQ ID NO: 173 (FR-3-V_H- $\alpha\beta 8$)

YASWVNGRFTISKSTTVDLKITSPTTEDTATYFC

SEQ ID NO: 174 (FR-4-V_H- $\alpha\beta 8$)

10 WPGTLVTVSL

SEQ ID NO: 175 (V_L- $\alpha\beta 8$: CDRs + FRs)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCDVVMQTTPSSVSEPVGGTIVTINCQASENIYSSLAWYQQK
PGQPPKLLIYAASNLAGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLACADAATYYCQCTGGIIIDGGA

SEQ ID NO: 176 (V_H- $\alpha\beta 8$: CDRs + FRs)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVEESGGRLVTPGTPLTLTCAVSGFSLNSGMQWVRQAPGK
GLEYIGYIGSGSTFYASWVNGRFTISKSTTVDLKITSPTTEDTATYFCGRYGGSRGVWG
PGTLVTVSL

15 SEQ ID NO: 177 (C_L- $\alpha\beta 8$)

FGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGI
ENSKTPHNSADCTYNLISTLTLTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQXFNRGDCLE

SEQ ID NO: 178 (C_H- $\alpha\beta 8$)

GQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSG
LYLSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFI FPPK
PKDTLMISRTPVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVTRARPPLEQQFNSTIRVVSTLP
IAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCM
INGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMH
EALHNHYTQKSISRSPGK

SEQ ID NO: 179 (L- $\alpha\beta 8$: CDRs + FRs + C_L)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGA [REDACTED] VGGTVTINCOASENIYSSLAWYQOK
PGQPPKLLIYAASNLASGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLACADAATYYC [REDACTED] IDGGA
FGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGI
ENSKTPHNSADCTYNLISTLTLTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQXFNRGDCLE

SEQ ID NO: 180 (H- α β8: CDRs + FRs + C_H)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVEESGRLVTPGTPLTLTCAVSG [REDACTED] WVRQAPGK
GLEYIGYIGSGGSTFYASWVNGRFTISKSTTVDLKITSPTTEDTATYFC [REDACTED] RYGGSRGVWG
PGTLVTVSLGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRT
FPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGG
PSVFIFFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPPREELS
TIRVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELS
SRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLSDGSYFLYSKLSVPTSEWQRG
DVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

SEQ ID NO: 181 (CDR-1-V_L- α β8)

5 AGATGTGATGTTGTGATGACCCAGACTCCATCCTCCGTGTCTGAACCT

SEQ ID NO: 182 (CDR-2-V_L- α β8)

GAGAACATTTACAGTTCT

SEQ ID NO: 183 (CDR-3-V_L- α β8)

TGTACTGGTGGTATTATTATTGATGGGGGTGCT

10 SEQ ID NO: 184 (CDR-1-V_H- α β8)

TTCTCCCTCAATAGTGGCAATATGCAA

SEQ ID NO: 185 (CDR-2-V_H- α β8)

TACATTGGTAGTGGTGGTAGCACATTC

SEQ ID NO: 186 (CDR-3-V_H- α β8)

15 GGCAGATATGGTGGTAGTAGGGGTGTA

SEQ ID NO: 187 (FR-1-V_L- α β8)

ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCC

SEQ ID NO: 188 (FR-2-V_L- α β8)

GTGGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGT

20 SEQ ID NO: 189 (FR-3-V_L- α β8)

TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCA
ATCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACCTCT
CACCATCAGCGACCTGGCGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTATTGTCAA

SEQ ID NO: 190 (DTM- α v β 8 incl. péptido de señal [minúscula])

atgtgcggctcggccctggctttttttaccgctgcatttgtctgcctgcaaaacgaccggc
gaggtcccgcctcgttctctctgggcagcctgggtgttttcaactgttcttggactgggcca
aggtGAAGACAATAGATGTGCATCTTCAAATGCAGCATCCTGTGCCAGGTGCCTTGCGCTG
GGTCCAGAATGTGGATGGTGTGTTCAAGAGGATTCATTTTCAGGTGGATCAAGAAGTGAAC
GTTGTGATATTGTTTCCAATTTAATAAGCAAAGGCTGCTCAGTTGATTCAATAGAATAACCC
ATCTGTGCATGTTATAATACCCACTGAAAATGAAATTAATACCCAGGTGACACCAGGAGAA
GTGTCTATCCAGCTGCGTCCAGGAGCCGAAGCTAATTTTATGCTGAAAGTTCATCCTCTGA
AGAAATATCCTGTGGATCTTTATTATCTTGTGATGTCTCAGCATCAATGCACAATAATAT
AGAAAATTAATTTCCGTTGGAACGATTTATCTAGAAAATGGCATTTTTCTCCCGTGAC
TTTCGTCTTGGATTTGGCTCATACTGATAAAACAGTTTCACCATAATTAGCATCCACC
CCGAAAGGATTCATAATCAATGCAGTGACTACAATTTAGACTGCATGCCTCCCCATGGATA
CATCCATGTGCTGTCTTTGACAGAGAACATCACTGAGTTTGAGAAAGCAGTTCATAGACAG
AAGATCTCTGGAAACATAGATACACCAGAAGGAGGTTTTGACGCCATGCTTCAGGCAGCTG
TCTGTGAAAGTCATATCGGATGGCGAAAAGAGGCTAAAAGATTGCTGCTGGTGATGACAGA
TCAGACGTCTCATCTCGCTCTTGATAGCAAATTTGGCAGGCATAGTGGTGCCCAATGACGGA
AACTGTCATCTGAAAACAACGTCTATGTCAAATCGACAACCATGGAACACCCCTCACTAG
GCCAACTTTTCAGAGAAATTAATAGACAACAACATTAATGTCATCTTTGCAGTTCAGGAAA
ACAATTTTCATTGGTATAAGGATCTTCTACCCCTCTTGCCAGGCACCATTGCTGGTGAAATA
GAATCAAAGGCTGCAAACCTCAATAATTTGGTAGTGGAAGCCTATCAGAAGCTCATTTTCAG
AAGTGAAAGTTCAGGTGGAAAACAGGTACAAGGCATCTATTTTAACATTACCGCCATCTG
TCCAGATGGGTCCAGAAAGCCAGGCATGGAAGGATGCAGAAACGTGACGAGCAATGATGAA
GTTCTTTTCAATGTAACAGTTACAATGAAAAAATGTGATGTACAGGAGGAAAAAACTATG
CAATAATCAAACCTATTGGTTTTAATGAAACCGCTAAAATTCATATACACAGAAACTGCAG
CTGTCTAGTGTGAGGACAAACAGAGGACCTAAAGGAAAGTGTGTAGATGAAACTTTTTCTAGAT
TCCAAGTGTTCAGTGTGATGAGAATAAATGTCATTTTGATGAAGATCAGTTTTCTTCTG
AGAGTTGCAAGTCACACAAGGATCAGCCTGTTTGCAGTGGTTCGAGGAGTTTGTGTTTGTGG
GAAATGTTTCATGTCACAAAATTAAGCTTGGAAAAGTGTATGGAAAATACTGTGAAAAGGAT
GACTTTTTCTTGTCCATATCACCATGGAAATCTGTGTGCTGGGCATGGAGAGTGTGAAGCAG
GCAGATGCCAATGCTTCAGTGGCTGGGAAGGTGATCGATGCCAGTGCCCTTCAGCAGCAGC
CCAGCACTGTGTCAATTCAAAGGGCCAAGTGTGCAGTGGAAGAGGCACGTGTGTGTGTGGA
AGGTGTGAGTGCACCGATCCCAGGAGCATCGGCCGCTTCTGTGAACACTGCCCCACCTGTT
ATACAGCCTGCAAGGAAAACCTGGAATTGTATGCAATGCCTTCACCCTCACAATTTGTCTCA
GGCTATACTTGATCAGTGCAAAACCTCATGTGCTCTCATGGAACAACAGCATTATGTGCGAC
CAAACCTCAGAATGTTTCTCCAGCCCAAGCTACTTGAGA

SEQ ID NO: 191 (FR-1-V_H- α v β 8)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGAGT
CGGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTTCAGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCGC
AGTCTCTGGA

SEQ ID NO: 192 (FR-2-V_H- α v β 8)

5 TGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGA

SEQ ID NO: 193 (FR-3-V_H- α v β 8)

TACGCGAGCTGGGTGAATGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGA
AGATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTTTGT

SEQ ID NO: 194 (FR-4-V_H-αβ8)

TGGGGCCCAGGCACCCTG

SEQ ID NO: 195 (V_L-αβ8: CDRs + FRs)

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCA
GATGTGATGTTGTGATGACCCAGACTCCATCCTCCGTGTCTGAACCTGTGGGAGGCACAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTGAGAACATTTACAGTTCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAATCTGGCATCTGGGGTCCCAT
CGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACCTCTCACCATCAGCGACCTGGCGTG
TGCCGATGCTGCCACTTACTATTGTCAATGTACTGGTGGTATTATTATTGATGGGGGTGCT

5 SEQ ID NO: 196 (V_H-αβ8: CDRs + FRs)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGAGT
CGGTGGAGGAGTCCGGGGGTTCGCCTGGTTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCGC
AGTCTCTGGATTCTCCCTCAATAGTGGCAATATGCAATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
GGGCTGGAATACATCGGATACATTGGTAGTGGTGGTAGCACATTCTACGCGAGCTGGGTGA
ATGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAGATCACCAGTCCGAC
AACCGAGGACACGGCCACCTATTTTTGTGGCAGATATGGTGGTAGTAGGGGTGTATGGGGC
CCAGGCACCCTG

SEQ ID NO: 197 (C_L-αβ8)

TTCCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCT
TCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTACCATCGTGTGTGTGGCGAATAA
ATACTTTCCCGATGTCACCGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGCATC
GAGAACAGTAAACACCCGCATAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCATCAGCACTCTGA
CACTGACCANCAACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCAC
GACCTCAGTCGTCCAGANCTTCAATAGGGGTGACTGTTTAGAGTGAGAGCGGCCCG

SEQ ID NO: 198 (C_H-αβ8)

GTCACCGTCTCCTTAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCCTGCCCCCTGCTGCG
GGGACACACCAGCTCCACGGTGACCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCC
AGTGACCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCCCTACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTC
CGGCAGTCCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CCGTACCTGCAACGTGGCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCC
CTCGACATGCAGCAAGCCCACGTGCCACCCCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCTGTCTTC
ATCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCACCCCGAGGTCACATGCG
TGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCACATGGTACATAAACAACGA
GCAGGTGCGCACCGCCCGGCCGCTACGGGAGCAGCAGTTCAACAGCACGATCCGCGTG
GTCAGCACCTCCCCATCGCGCACCCAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAG
TCCACAACAAGGCACTCCCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAGAGGGCAGCC
CCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTTCGGTC
AGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGA
ACGGGAAGGCAGAGGACAACACTACAAGACCACGCCGCGCTGCTGGACAGCGACGGCTCCTA
CTTCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTACC
TGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGCAACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTC
CGGGTAAATGAGCGCTGTGCCGGCGAGCTGCGGCCCG

10

SEQ ID NO: 199 (L-αβ8: CDRs + FRs + C_L)

IDLTSNSLS

SEQ ID NO: 205 (CDR-2-V_H-αv)

AISSRATTY

SEQ ID NO: 206 (CDR-3-V_H-αv)

5 GKFNL

SEQ ID NO: 207 (FR-1-V_L-αv)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGA

SEQ ID NO: 208 (FR-2-V_L-αv)

VGGTVTINCQAS

10 SEQ ID NO: 209 (FR-3-V_L-αv)

LAWFQQKPGQPPELLIYYASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYC

SEQ ID NO: 210 (DTM-αv)

FNLDVDS PAEYSGPEGSYFGFAVDFFVPSASSRMFLLVGAPKANTTQPGIVEGGQVLKCDW
SSTRRCQPIEFDATGNRDYAKDDPLEFKSHQWFGASVRSKQDKILACAPLYHWRTEMKQER
EPVGT CFLQDGTKTVEYAPCRSQDIDADGQGFQGGFSIDFTKADR VLLGGPGS FYWQGQL
ISDQVAEIVSKYDPNVYSIKYNNQLATRTAQAI FDDSYLGYSVAVGDFNGDGIDDFVSGVP
RAARTLGMVYIYDGKNMSSLYNFTGEQMAAYFGFSVAATDINGDDYADVFIGAPLFMDRGS
DGKLEVEGQVSVSLQRASGDFQTTKLNQFEV FARFGSAIAPLGDLDQDGFNDIAIAAPYGG
EDKKGIVYIFNGRSTGLNAVPSQILEGQWAARSMPPSFGYSMKGATDIDKNGYPDLIVGAF
GVDRAILYRARPVITVNAGLEVYPSILNQNKTCSLPGTALKVSCFNVRFLKADGKGVLP
RKLNFQVELLLDKLKQKGAIRRALFLYSRSPSHSKNMTISRGLMQCEELIAYLRDESEFR
DKLTPITIFMEYRLDYRTAADTTGLQPILNQFTPANISRQAHILLDCGEDNVCKPKLEVSV
DSDQKKIYIGDDNPLTLIVKAQNQGE GAYEAELIVSIPLQADFIGVVRNNEALARLSCAFK
TENQTRQVVC DLGNPMKAGTQLLAGLRF SVHQQSEMDTSVKFDLQIQSSNLFDKVSPV VSH
KVDLAVLA AVEIRGVSSPDHIFLPIPNWEHKENPETEEDVGPV VQHIYELRNNGPSSFSKA
MLHLQWPYKYNNTLLYILHYDIDGPMNCTSDMEINPLRIKISSLQTTTEKNDTVAGQGERD
HLITKRDLALSEGDIHTLGCQVAQCLKIVCQVGR LDRGKSAILYVKSLLWTETFMNKENQN
HSYSLKSSASFNVIEFPYKNLPIEDITNSTLVTTNVTWGIQP

SEQ ID NO: 211 (FR-1-V_H-αv)

15 METGLRWLLLVAVLKGAQCQSVEESGGRLVTPGTSLTLTCTVSG

SEQ ID NO: 212 (FR-2-V_H-αv)

WVRQAPGKGLEWIG

SEQ ID NO: 213 (FR-3-V_H-αv)

FAAWAKGRFTISRTSTTVDLRITSLTASDTATYFC

20 SEQ ID NO: 214 (FR-4-V_H-αv)

WGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 215 (V_L-αv: CDRs + FRs)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTPSSVSAAVGGTVTINCQASQSVASNNALAWFQ
QKPGQPPKLLIYYASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYCLGGYDCRGTD
CNV

SEQ ID NO: 216 (V_H-av: CDRs + FRs)

METGLRWLLLVAVLKGAQCQSVEESGGRLVTPGTSLTLTCTVSGIDLTSNSLSWVRQAPGK
GLEWIGAISSRATTYFAAWAKGRFTISRSTTVDLRITSLTASDTATYFCGKFNLWGQGL
VTVSS

SEQ ID NO: 217 (C_L-av)

FGGGTEVVVKGDPVAPTFLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTGI
ENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

5 SEQ ID NO: 218 (C_H-av)

GQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFFPSVRQSSG
LYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFFPK
PKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSDQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLP
IAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCM
INGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMH
EALHNHYTQKSISRSPGK

SEQ ID NO: 219 (L-av: CDRs + FRs + C_L)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGA [REDACTED] VGGTVTINCQASQSVASNNALAWFO
OKPGQPPKLLIYYASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECADATYYC [REDACTED]
[REDACTED] FGGGTEVVVKGDPVAPTFLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQT
TGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

SEQ ID NO: 220 (H-av: CDRs + FRs + C_H)

METGLRWLLLVAVLKGAQCQSVEESGGRLVTPGTSLTLTCTVSG [REDACTED] WVRQAPGK
GLEWIGAISSRATTYFAAWAKGRFTISRSTTVDLRITSLTASDTATYFCGKFNLWGQGL
VTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFFPSV
RQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSV
IFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSDQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRV
VSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSV
SLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFT
CSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

10

SEQ ID NO: 221 (CDR-1-V_L-av)

CATTTGCCAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCTCCGTGTCTGCAGC

SEQ ID NO: 222 (CDR-2-V_L-av)

CAGAGTGTGCTAGTAACAATGCC

15 SEQ ID NO: 223 (CDR-3-V_L-av)

GGCGTTATGATTGTAGGGTACTGATTGTAATGTT

SEQ ID NO: 224 (CDR-1-V_H-av)

ATCGACCTCACTAGCAATTCGCTGAGC

SEQ ID NO: 225 (CDR-2-V_H-av)

20 GCCATTAGTAGTCGTGCTACCACATAT

ES 2 622 487 T3

SEQ ID NO: 226 (CDR-3-V_H-αv)

GGGAAATTTAATTTG

SEQ ID NO: 227 (FR-1-V_L-αv)

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCA

5 SEQ ID NO: 228 (FR-2-V_L-αv)

TGTGGGGGGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGT

SEQ ID NO: 229 (FR-3-V_L-αv)

**TTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAACCTCCTGATCTATTATGCGTCCA
CTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGATTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCT
CACCATCAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCTA**

SEQ ID NO: 230 (DTM-αv incl. péptido de señal [minúscula])

atggccttttccgcccgcggcgacggctgcgccctcggtccccgcggcctcccgcttcttctct
cgggactcctgctacctctgtgcccgcgcctTCAACCTAGACGTGGACAGTCCTGCCGAGTA
CTCTGGCCCCGAGGGAAGTTACTTTCGGCTTCGCCGTGGATTTCTTCGTGCCCAGCGCGTCT
TCCCGGATGTTTCTTCTCGTGGGAGCTCCCAAAGCAAACACCACCAGCCTGGGATTGTGG
AAGGAGGGCAGGTCCTCAAATGTGACTGGTCTTCTACCCGCCGGTGCCAGCCAATTGAATT
TGATGCAACAGGCAATAGAGATTATGCCAAGGATGATCCATTGGAATTTAAGTCCCATCAG
TGGTTTGGAGCATCTGTGAGGTCGAAACAGGATAAAAATTTTGGCCTGTGCCCCATTGTACC
ATTGGAGAACTGAGATGAAACAGGAGCGAGAGCCTGTTGGAACATGCTTTCTTCAAGATGG
AACAAAGACTGTTGAGTATGCTCCATGTAGATCACAAAGATATTGATGCTGATGGACAGGGA
TTTTGTCAAGGAGGATTCAGCATTGATTTTACTAAAGCTGACAGAGTACTTCTTGGTGGTC
CTGGTAGCTTTTTATTGGCAAGGTTCAGCTTATTTTCGGATCAAGTGGCAGAAATCGTATCTAA
ATACGACCCCAATGTTTACAGCATCAAGTATAATAACCAATTAGCAACTCGGACTGCACAA
GCTATTTTTGATGACAGCTATTTGGGTTATTCTGTGGCTGTTCGGAGATTTCAATGGTGATG
GCATAGATGACTTTGTTTCAGGAGTTCGAAGAGCAGCAAGGACTTTGGGAATGGTTTATAT
TTATGATGGGAAGAACATGTCCTCCTTATACAATTTTACTGGCGAGCAGATGGCTGCATAT
TTCGGATTTTCTGTAGCTGCCACTGACATTAATGGAGATGATTATGCAGATGTGTTTATTG
GAGCACCTCTCTTCATGGATCGTGGCTCTGATGGCAAACCTCCAAGAGGTGGGGCAGGTCTC
AGTGTCTCTACAGAGAGCTTCAGGAGACTTCAGACGACAAAGCTGAATGGATTTGAGGTC
TTTGCACGGTTTGGCAGTGCCATAGCTCCTTTGGGAGATCTGGACCAGGATGGTTTCAATG
ATATTGCAATTGCTGCTCCATATGGGGGTGAAGATAAAAAAGGAATTGTTTATATCTTCAA
TGGAAGATCAACAGGCTTGAACGCAGTCCCATCTCAAATCCTTGAAGGGCAGTGGGCTGCT
CGAAGCATGCCACCAAGCTTTGGCTATTCAATGAAAGGAGCCACAGATATAGACAAAAATG
GATATCCAGACTTAATTGTAGGAGCTTTTGGTGTAGATCGAGCTATCTTATACAGGGCCAG
ACCAGTTATCACTGTAAATGCTGGTCTTGAAGTGTACCCTAGCATTTTAAATCAAGACAAT
AAAACCTGCTCACTGCCTGGAACAGCTCTCAAAGTTTCTGTTTTAAATGTTAGGTTCTGCT
TAAAGGCAGATGGCAAAGGAGTACTTCCCAGGAAACTTAATTTCCAGGTGGAACCTCTTTT
GGATAAACTCAAGCAAAAGGGAGCAATTCGACGAGCACTGTTTCTCTACAGCAGGTCCCCA
AGTCACTCCAAGAACATGACTATTTCAAGGGGGGGACTGATGCAGTGTGAGGAATTGATAG
CGTATCTGCGGGATGAATCTGAATTTAGAGACAAACTCACTCCAATTACTATTTTTTATGGA
ATATCGGTTGGATTATAGAACAGCTGCTGATACAACAGGCTTGCAACCCATTCTTAACCAG
TTCACGCCTGCTAACATTAGTCGACAGGCTCACATTCTACTTGACTGTGGTGAAGACAATG
TCTGTAAACCCAAGCTGGAAGTTTCTGTAGATAGTGATCAAAGAAGATCTATATTGGGGA
TGACAACCTCTGACATTGATTGTTAAGGCTCAGAATCAAGGAGAAGGTGCCTACGAAGCT
GAGCTCATCGTTTCCATTCCACTGCAGGCTGATTTTCATCGGGGTTGTCCGAAACAATGAAG
CCTTAGCAAGACTTTCTGTGCATTTAAGACAGAAAACCAAACCTCGCCAGGTGGTATGTGA
CCTTGGAACCCCAATGAAGGCTGGAACCTCAACTCTTAGCTGGTCTTCGTTTTCAGTGTGCAC
CAGCAGTCAGAGATGGATACTTCTGTGAAATTTGACTTACAAATCCAAAGCTCAAATCTAT
TTGACAAAGTAAGCCCAGTTGTATCTCACAAAGTTGATCTTGCTGTTTTAGCTGCAGTTGA
GATAAGAGGAGTCTCGAGTCCTGATCATATCTTTCTTCCGATTCCAAACTGGGAGCACAAG
GAGAACCCTGAGACTGAAGAAGATGTTGGGCCAGTTGTTTCAGCACATCTATGAGCTGAGAA
ACAATGGTCCAAGTTCATTCAGCAAGGCAATGCTCCATCTTCAGTGGCCTTACAAATATAA
TAATAACACTCTGTTGTATATCCTTCATTATGATATTGATGGACCAATGAACTGCACTTCA
GATATGGAGATCAACCCTTTGAGAATTAAGATCTCATCTTTGCAAACAACCTGAAAAGAATG
ACACGGTTGCCGGGCAAGGTGAGCGGGACCATCTCATCACTAAGCGGGATCTTGCCCTCAG
TGAAGGAGATATTCACACTTTGGGTTGTGGAGTTGCTCAGTGCTTGAAGATTGTCTGCCAA
GTTGGGAGATTAGACAGAGGAAAGAGTGCAATCTTGACGTAAAGTCATTACTGTGGACTG
AGACTTTTATGAATAAAGAAAATCAGAATCATTCCTATTCTCTGAAGTCGTCTGCTTCATT
TAATGTCATAGAGTTTCCTTATAAGAATCTTCCAATTGAGGATATCACCAACTCCACATTG
GTTACCACTAATGTACCTGGGGCATTACGCCA

SEQ ID NO: 231 (FR-1-V_H-αv)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGCCAGTGTCACT
CGGTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCTGGTCACGCCTGGGACATCCCTGACACTCACCTGCAC
GGTCTCTGGA

SEQ ID NO: 232 (FR-2-V_H-αv)

TGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGG

5 SEQ ID NO: 233 (FR-3-V_H-αv)

TTTCGCGGCTTGGGCGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAACCTCGACCACGGTGGATCTCA
GAATCACCACTCTGACAGCTTCAGACACGGCCACCTATTTCTGT

SEQ ID NO: 234 (FR-4-V_H-αv)

TGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 235 (V_L-αv: CDRs + FRs)

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCA
CATTGCCCCAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGGGGCACAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTGCTAGTAACAATGCCTTAGCCTGGTTTCAG
CAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAACCTCCTGATCTATTATGCGTCCACTCTGGCATCTGGGG
TCCCATCGCGATTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCCTCCTCACCATCAGCGACCT
GGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCGGTTATGATTGTAGGGGTACTGAT
TGTAATGTT

10

SEQ ID NO: 236 (V_H-αv: CDRs + FRs)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGCCAGTGTCACT
CGGTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCTGGTCACGCCTGGGACATCCCTGACACTCACCTGCAC
GGTCTCTGGAATCGACCTCACTAGCAATTCGCTGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
GGGCTGGAATGGATCGGGGCCATTAGTAGTCGTGCTACCACATATTTTCGCGGCTTGGGCGA
AGGGCCGATTACCATCTCCAGAACCTCGACCACGGTGGATCTCAGAATCACCACTCTGAC
AGCTTCAGACACGGCCACCTATTTCTGTGGGAAATTTAATTTGTGGGGCCAAGGCACCCTG
GTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 237 (C_L-αv)

TTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCT
TCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAA
ATACTTTCCCGATGTCACCGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGCATC
GAGAACAGTAAACACCGCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGA
CACTGACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCAC
GACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAGAGTGAGAGCGGCCGC

15 SEQ ID NO: 238 (C_H-αv)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGCCAGTGTCACT
 CGGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTCACGCCTGGGACATCCCTGACACTCACCTGCAC
 GGTCTCTGGA [REDACTED] TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
 GGGCTGGAATGGATCGGGGCCATTAGTAGTCGTGCTACCACATATTTTCGGGCTTGGGCGA
 AGGGCCGATTACCATCTCCAGAACCTCGACCACGGTGGATCTCAGAATCACCACTGTGAC
 AGCTTCAGACACGGCCACCTATTTCTGT [REDACTED] TGGGGCCAAGGCACCCTG
 GTCACCGTCTCCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCCTGGCCCCCTGCTGCG
 GGGACACACCAGCTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGTACCTCCCGGAGCC
 AGTGACCGTGACCTGGAACTCGGGCACCCTCACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTC
 CGGCAGTCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGC
 CCGTCACTGCAACGTGGCCACCAGCCACCAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCC
 CTCGACATGCAGCAAGCCCACGTGCCACCCCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCTGTCTTC
 ATCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCACCCCGAGGTACATGCG
 TGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCACATGGTACATAAAACAACGA
 GCAGGTGCGCACCGCCCGGCCGCGCTACGGGAGCAGCAGTTC AACAGCAGGATCCGCGTG
 GTCAGCACCCCTCCCCATCGCGCACCCAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTC AAGTGCAAAG
 TCCACAACAAGGCACTCCCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCC
 CCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCCTCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTCCGCTC
 AGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGA
 ACGGGAAGGCAGAGGACA ACTACAAGACCACGCCGCGCTGCTGGACAGCGACGGCTCCTA
 CTTCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTACC
 TGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTC
 CGGGTAAATGAGCGCTGTGCCGGCGAGCTGCGGCCGC

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal obtenido mediante inmunización de un conejo con un inmunógeno recombinante que consiste en un dominio extracelular de integrina con patrón de glicosilación derivado de insecto que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 (DTM- $\alpha\text{v}\beta 5$), 90 (DTM- $\alpha\text{v}\beta 3$), 130 (DTM- $\alpha\text{v}\beta 6$), 170 (DTM- $\alpha\text{v}\beta 8$) o 210 (DTM- αv), en donde el anticuerpo es capaz de unirse a heterodímeros intactos de integrina $\alpha\text{v}\beta 5$, integrina $\alpha\text{v}\beta 3$, integrina $\alpha\text{v}\beta 6$, integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ e integrina respectivamente que tiene cadena αv en material incrustado en parafina fijado con formalina (FFPE), en una forma aislada en ELISA y en las células viables con sustancialmente la misma especificidad.
- 10 2. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (V_L - $\alpha\text{v}\beta 5$) y una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (V_H - $\alpha\text{v}\beta 5$).
3. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95 (V_L - $\alpha\text{v}\beta 3$) y una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96 (V_H - $\alpha\text{v}\beta 3$).
- 15 4. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 (V_L - $\alpha\text{v}\beta 6$) y una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 (V_H - $\alpha\text{v}\beta 6$).
- 20 5. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 175 (V_L - $\alpha\text{v}\beta 8$) y una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 176 (V_H - $\alpha\text{v}\beta 8$).
6. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 215 (V_L - αv) y una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 216 (V_H - αv).
7. Polinucleótido que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 25 8. Uso del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la detección de integrinas en material incrustado en parafina fijado con formalina (FFPE).

Figura 1

Clón E3528-2-12 (dominio extracelular avb3)

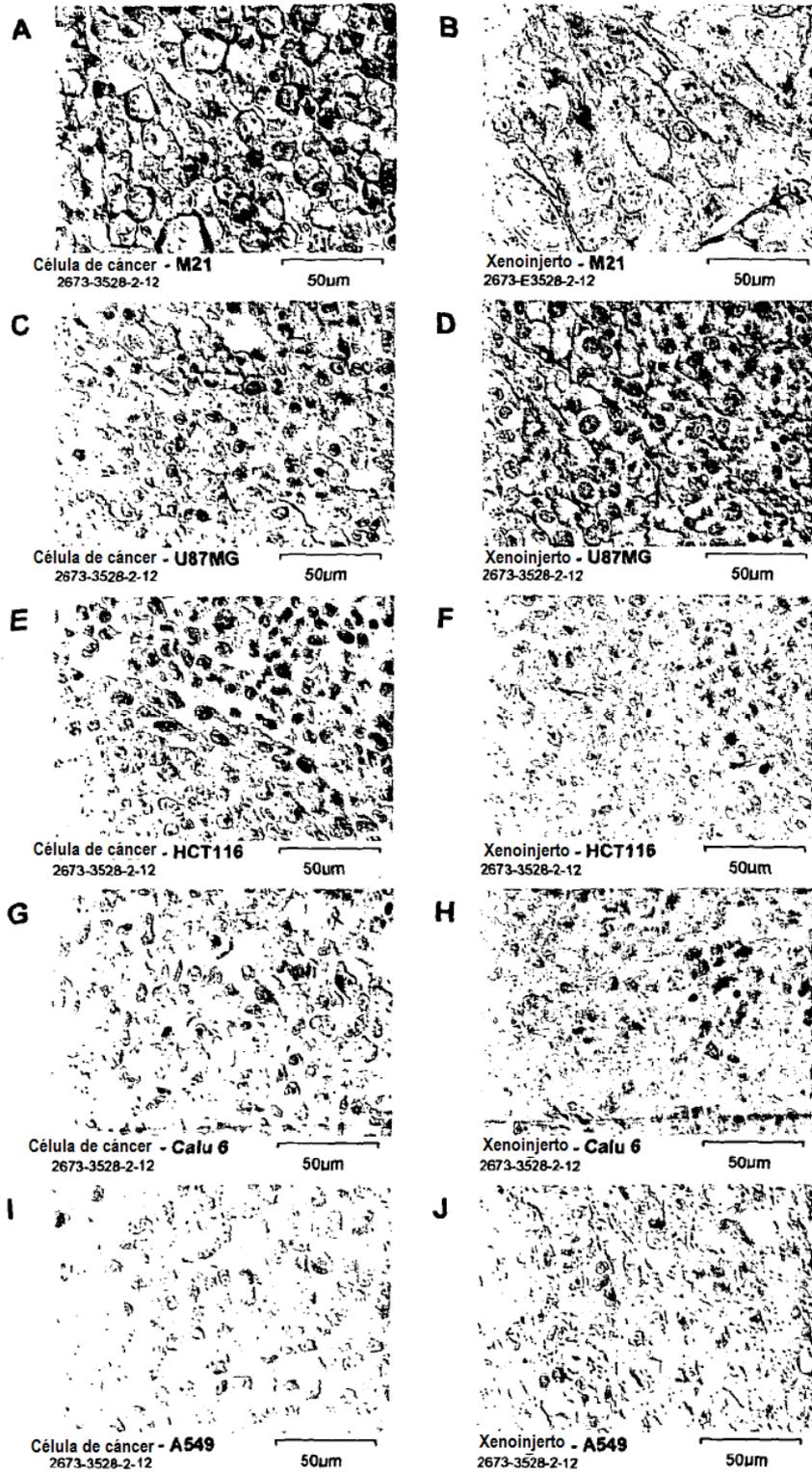


Figura 2

2779-avb3-2-7



M21 xenoinjerto

Figura 3

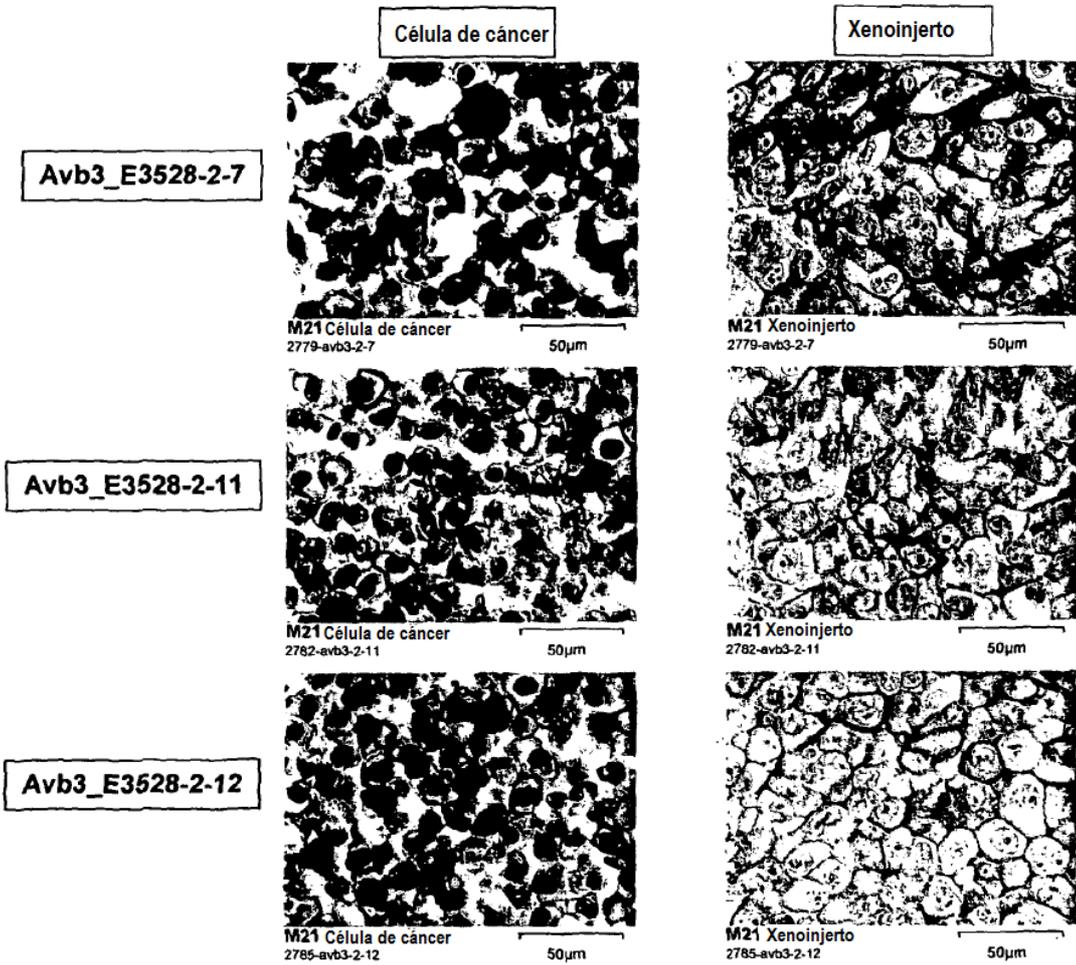
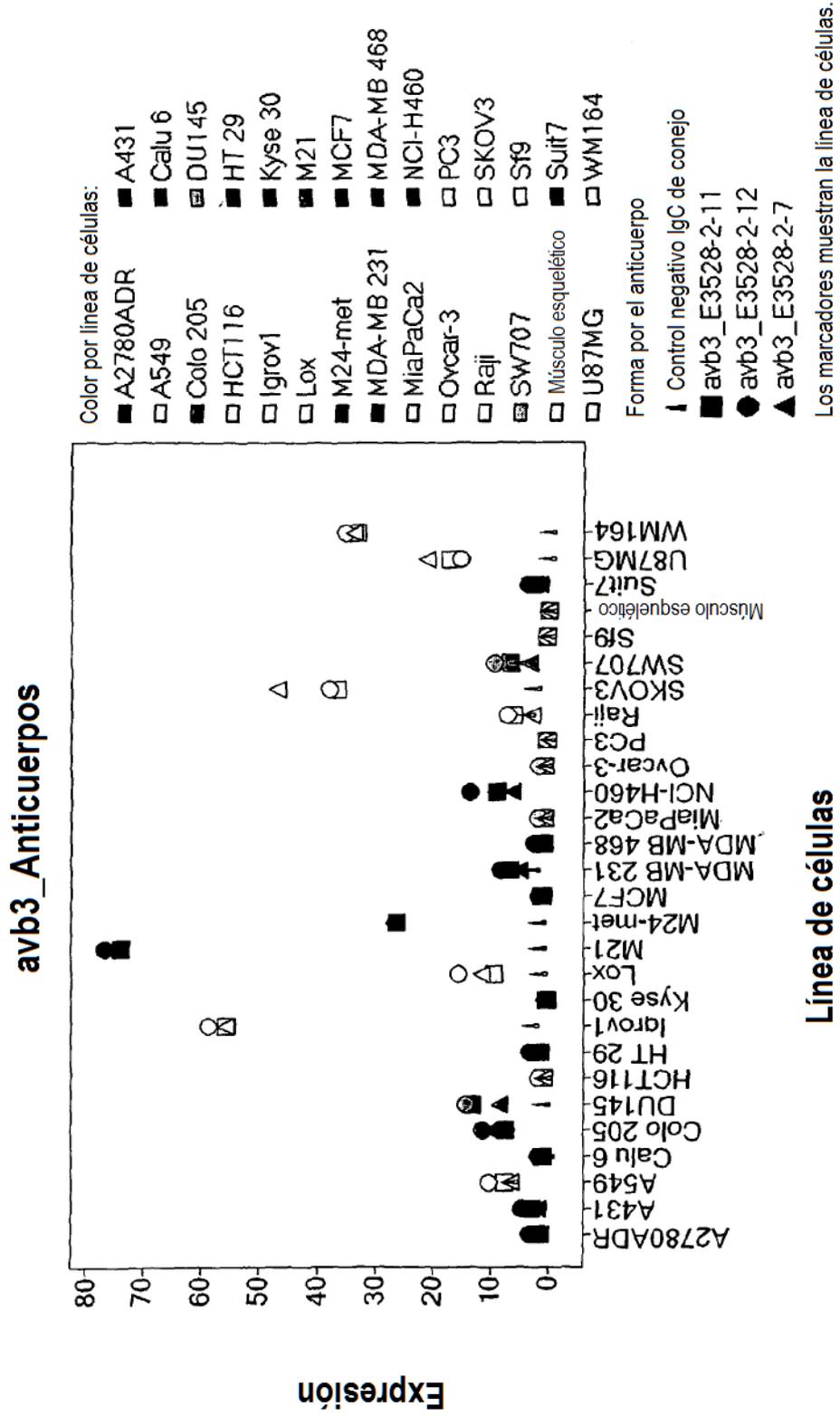
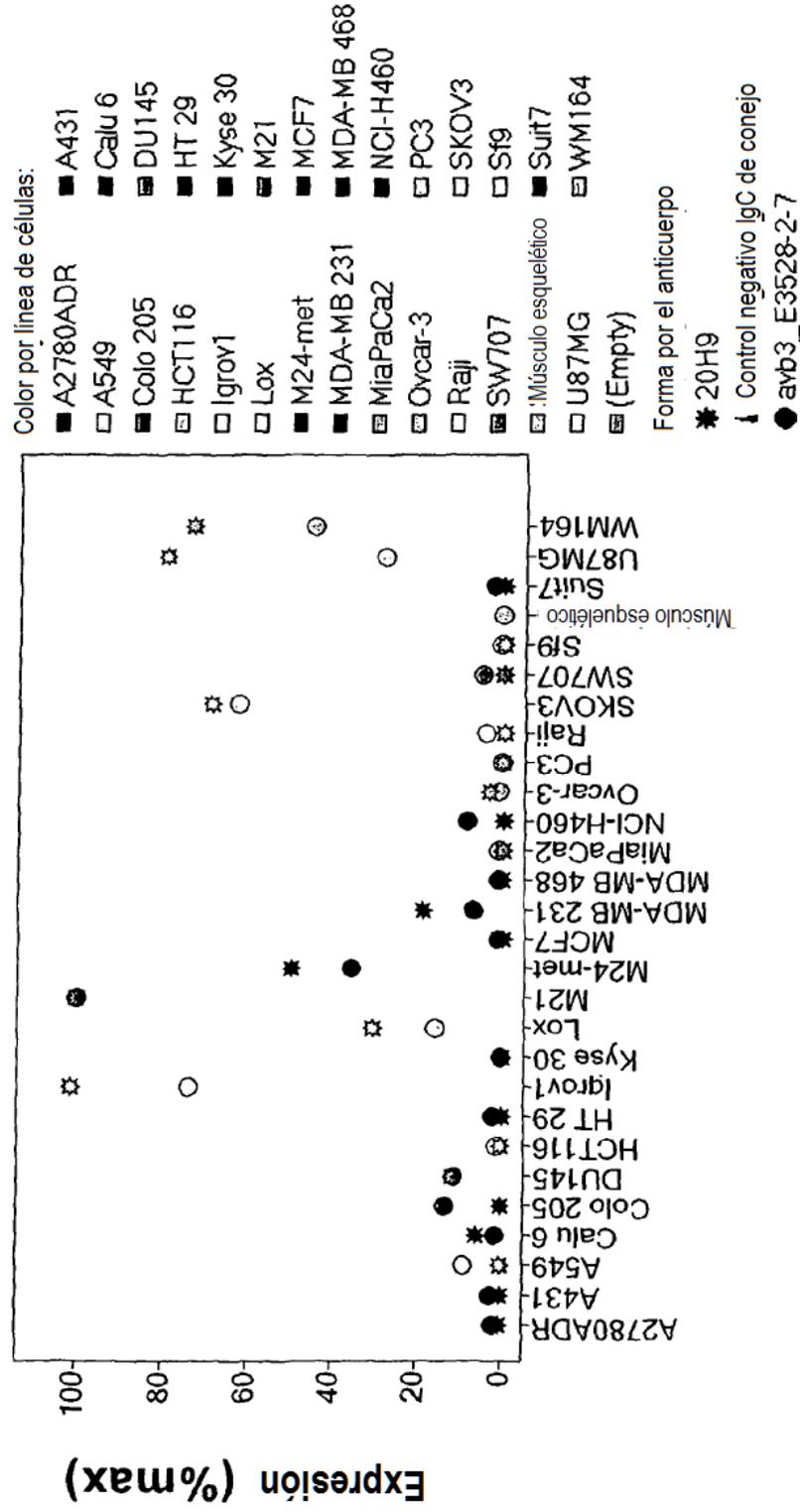


Figura 4



avb3-E3528-2-7



Línea de células

Los marcadores muestran la línea de células.

Figura 5

Figura 6

avb3_E3531-227-3



avb3_E3531-229-3



Figura 7

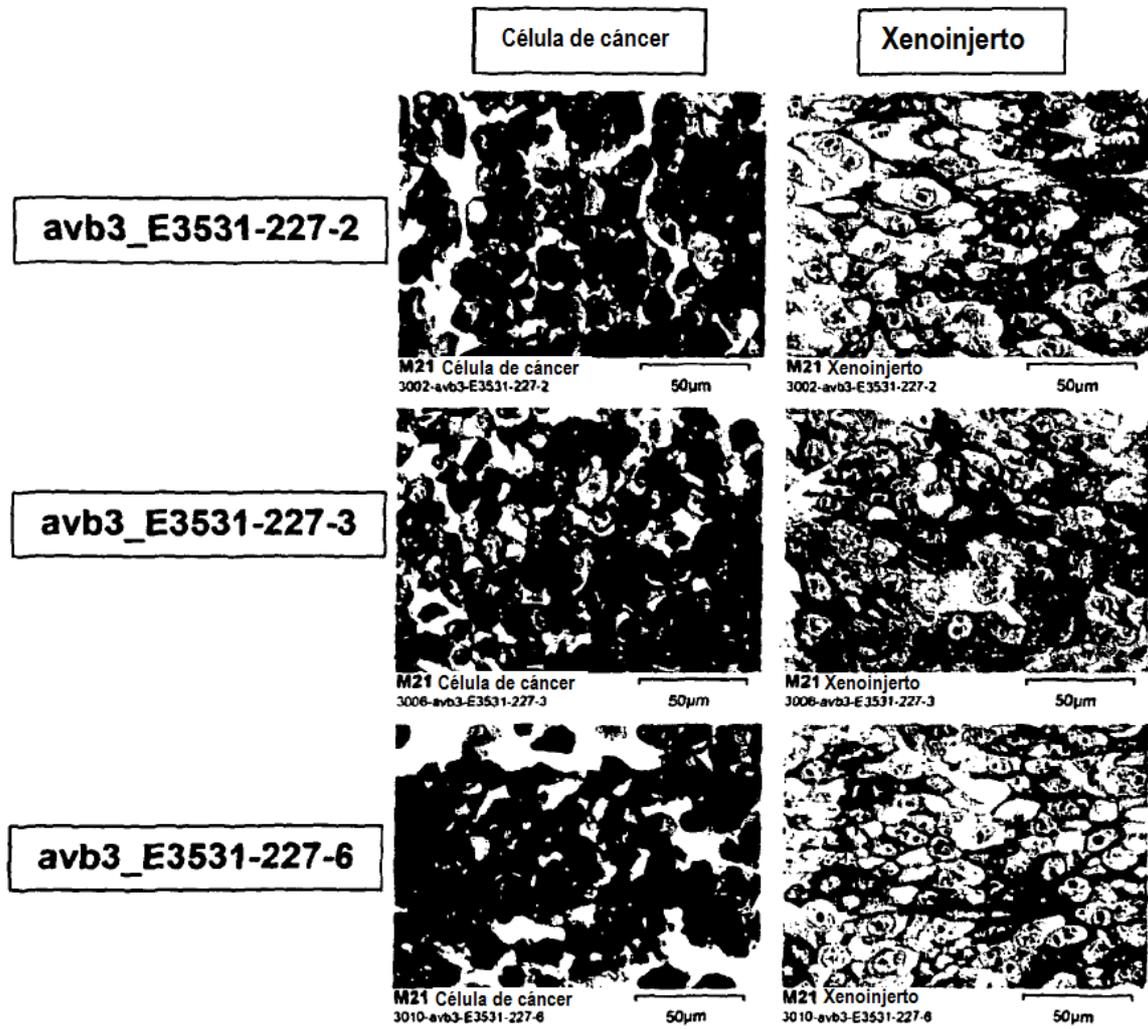
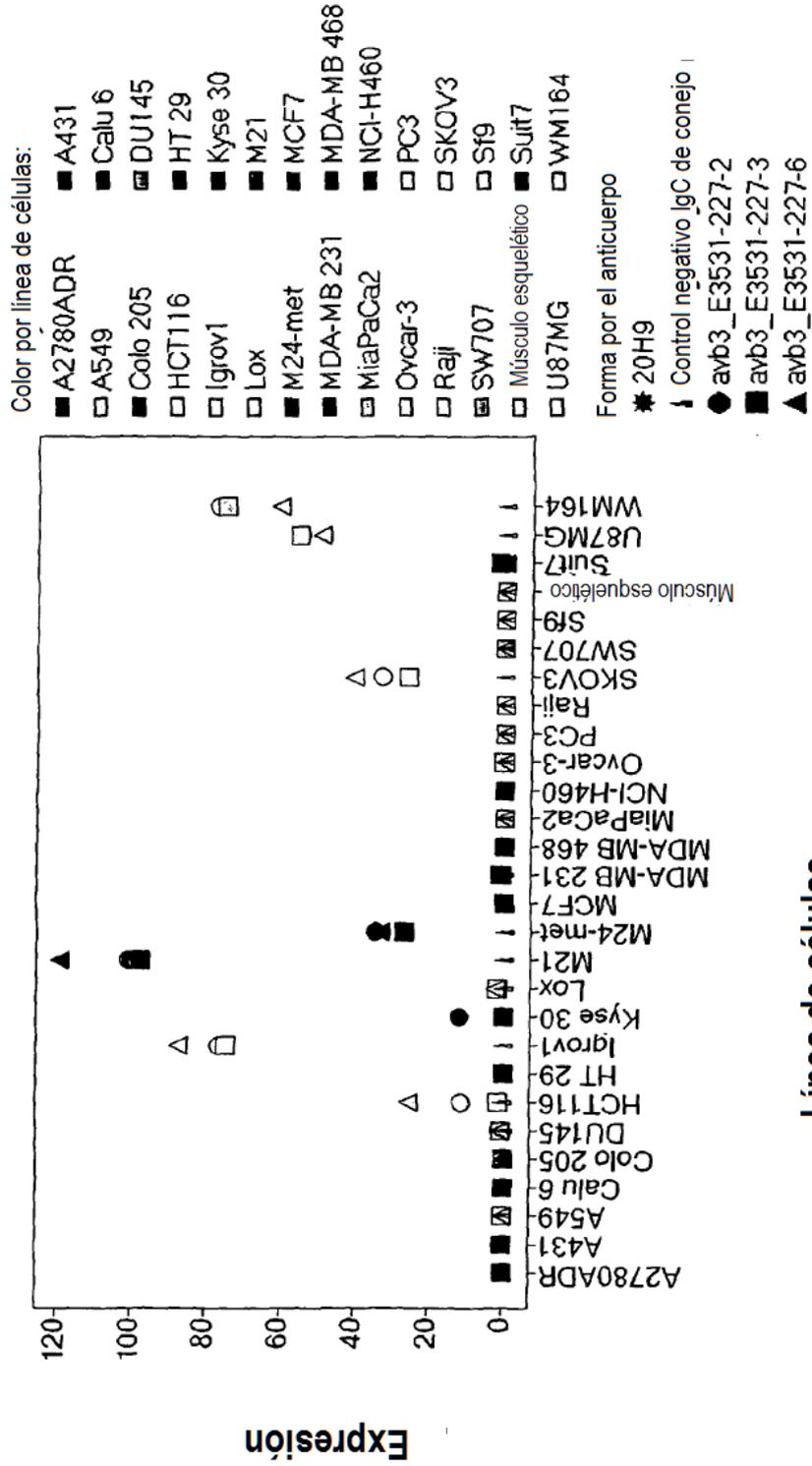


Figura 8



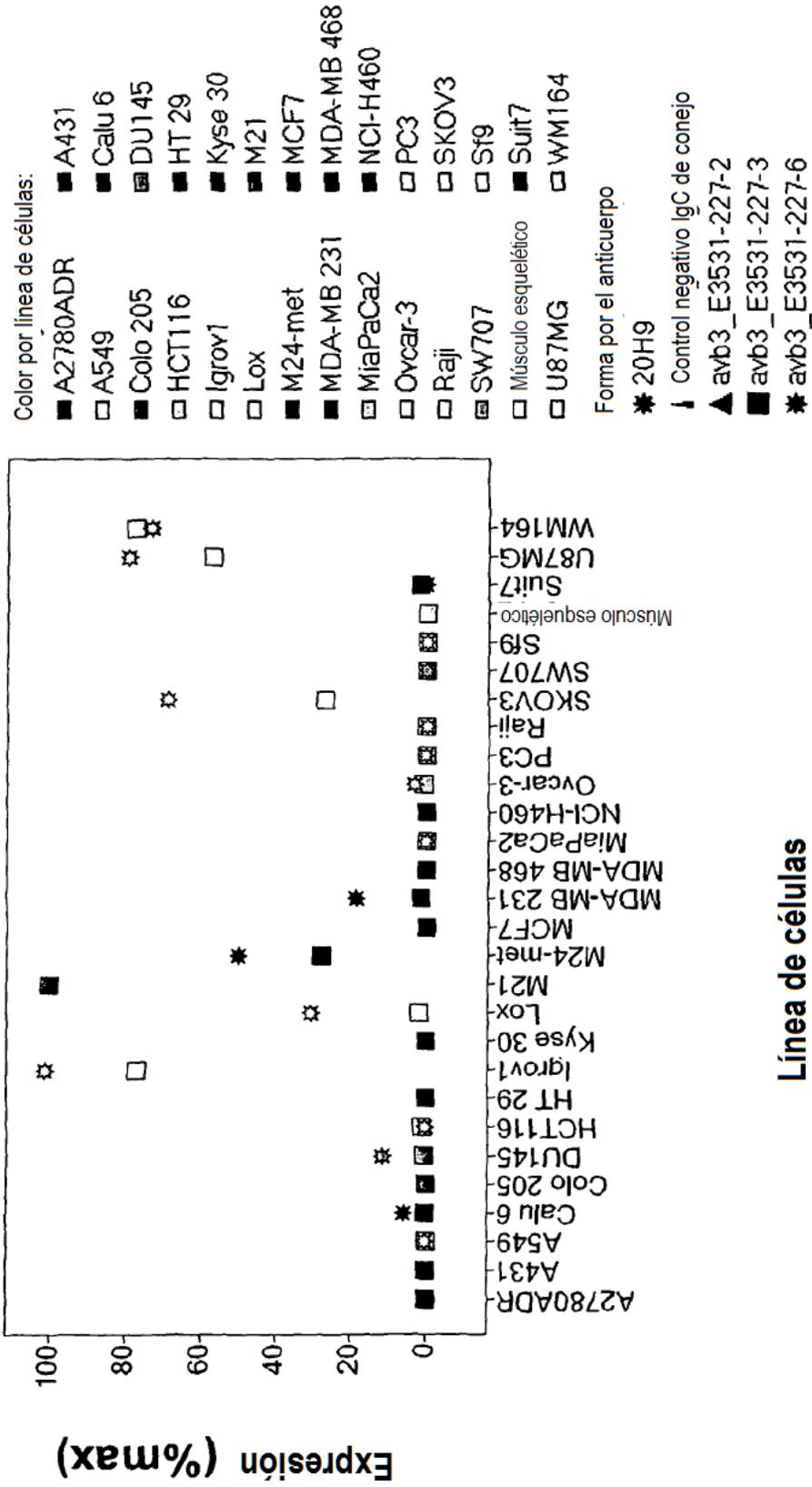


Figura 9

Clón E3536-99-3 (dominio extracelular avb5)

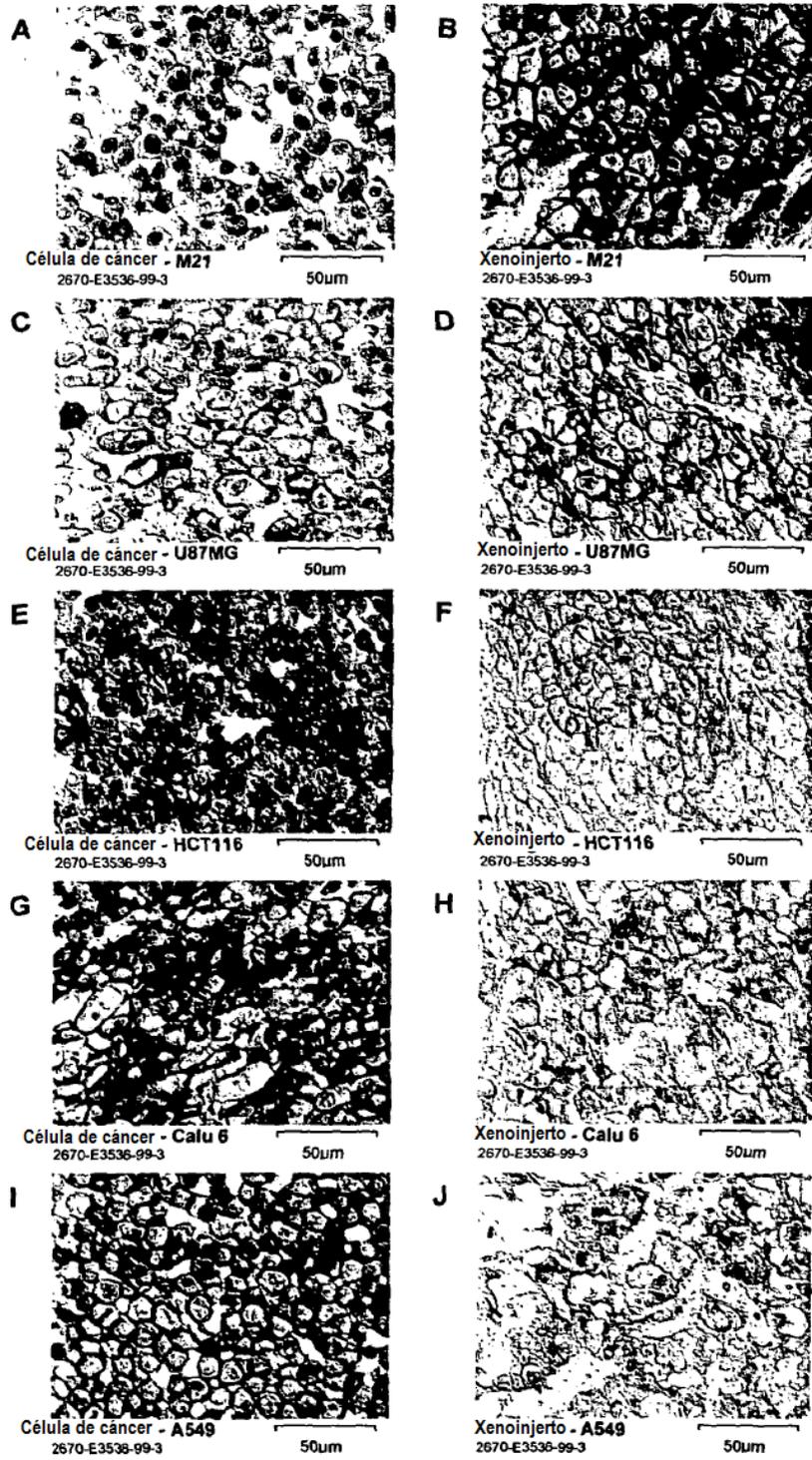


Figura 10

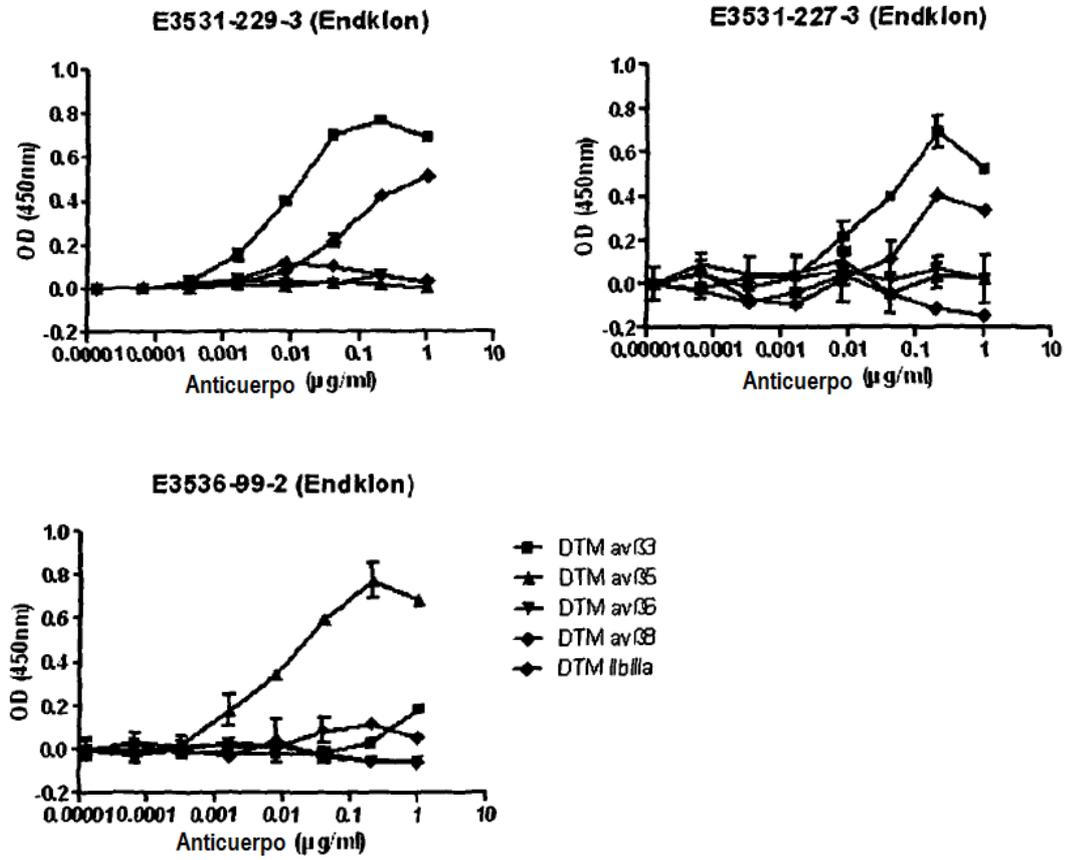


Figura 11



20µm



HCT116 Xenoinjerto

20µm

Figura 12

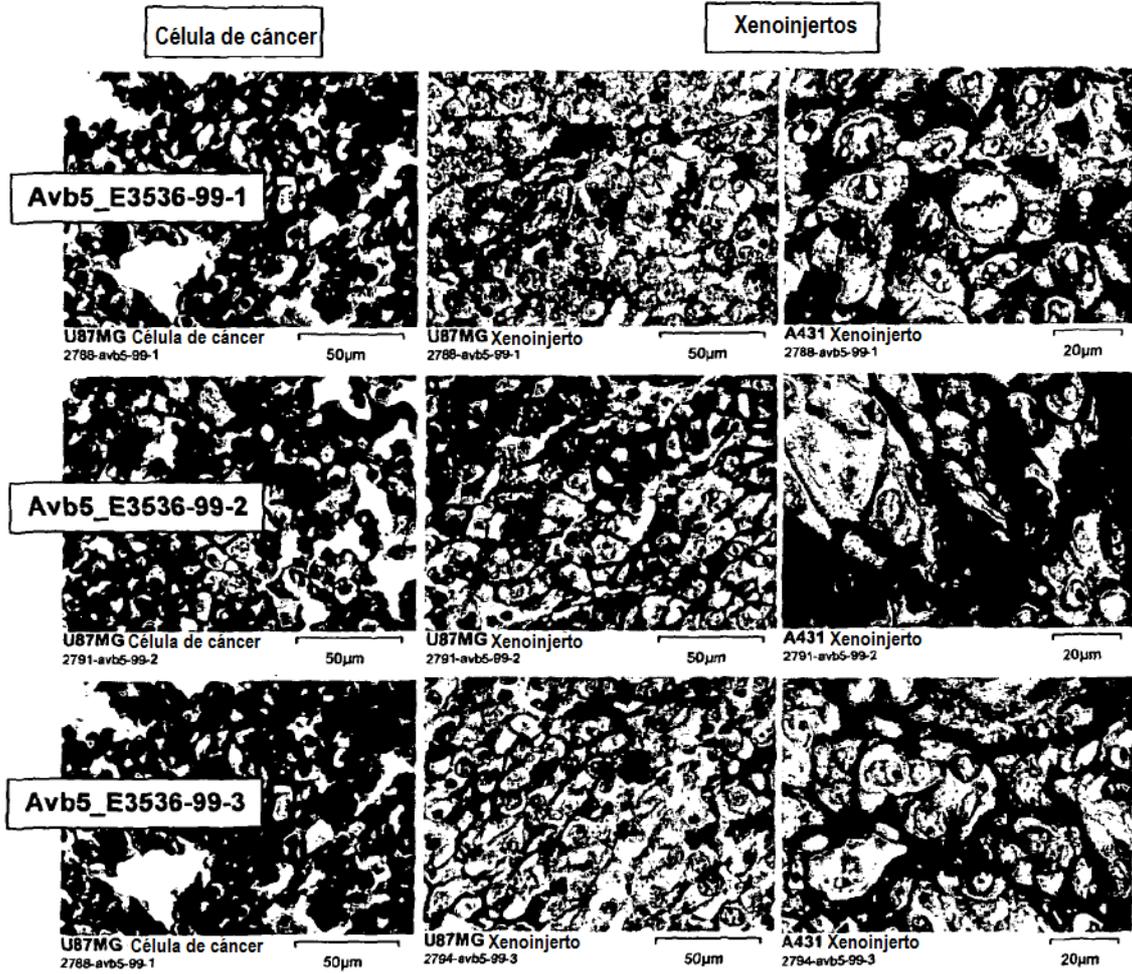


Figura 13

avb5_Anticuerpos

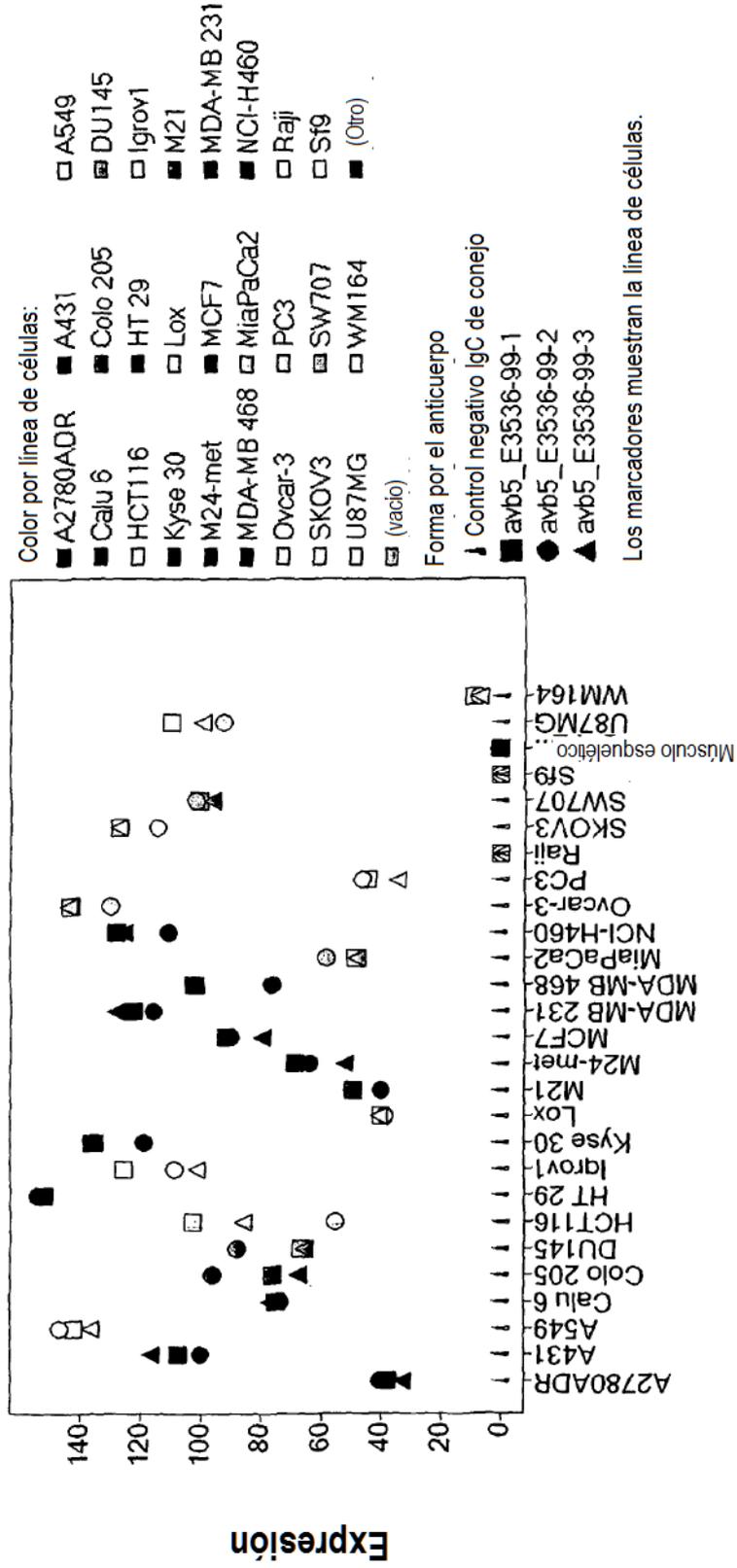


Figura 14

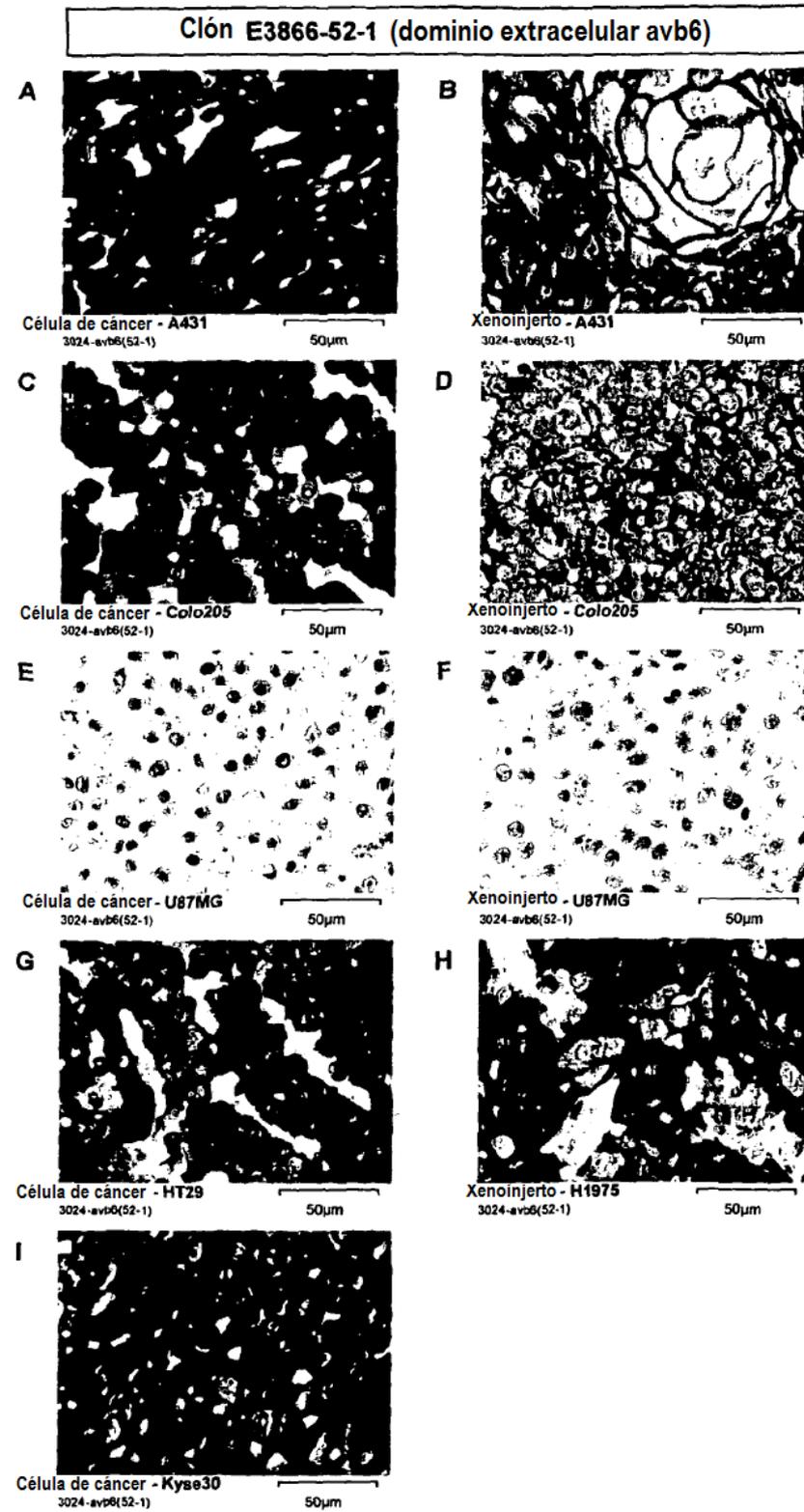


Figura 15

Imunohistoquímica con el anticuerpo	avb6 (E3866-52-1)
Experimento: CAX08	Instrumento: MIRAXSCAN
Protocolo: 3297	Tejido: Líneas de células de cáncer in vitro (FFPE)

	1	2	3	4	5
CAX08		24 A.431 OBS ca escamosas	18 Suit Z ca páncreas	12 C.8161 melanoma	6 NHFL460 ca pulmón LC
		23 MDA-MB 231 ca mama	17 MiaPaCa2 ca páncreas	11 A2780 ADR ca ovario	5 Calu 6 adeno de pulmón
	28 Raii linfoma de Burkitt	22 MDA-MB468 ca mama	16 M24-mel melanoma	10 Ovar-3 ca ovario	4 SW707 ca colon
	27 SF 9 célula de insecto	21 MCF 7 ca mama	15 M21 melanoma	9 SKOV 3 ca ovario	3 HT 29 ca colon
	26 Icov1 ca ovario	20 PC 3 prostata 3	14 Lox melanoma	8 U87MG glioblastoma	2 Colo 205 ca colon
	25 Kyse 30 OBS ca escamosas	19 DU145 ca próstata	13 WM 184 melanoma	7 A 549 ca pulmón	1 HCT 116 ca colon
			M*	M*	M*

M* = Músculo de corazón de perro para propósitos de orientación

Mapa de arreglo, M: músculo de corazón de perro

CAX08, visión general

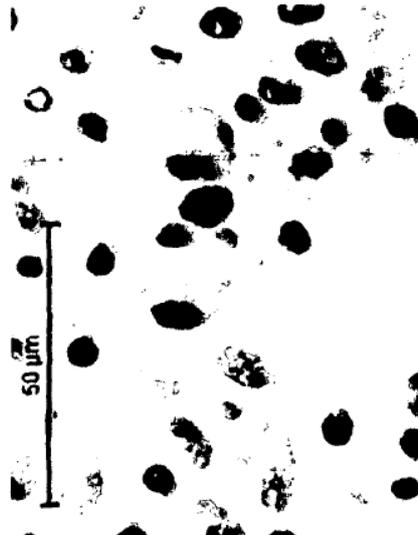
Inmunohistoquímica con el anticuerpo	avb6 (E3866-52-1)
Experimento: CAX08	Instrumento: MIRAXSCAN
Protocolo: 3297	Tejido: Líneas de células de cáncer in vitro (FPPE)



HT29



Raji



HT29



Raji

Figura 16

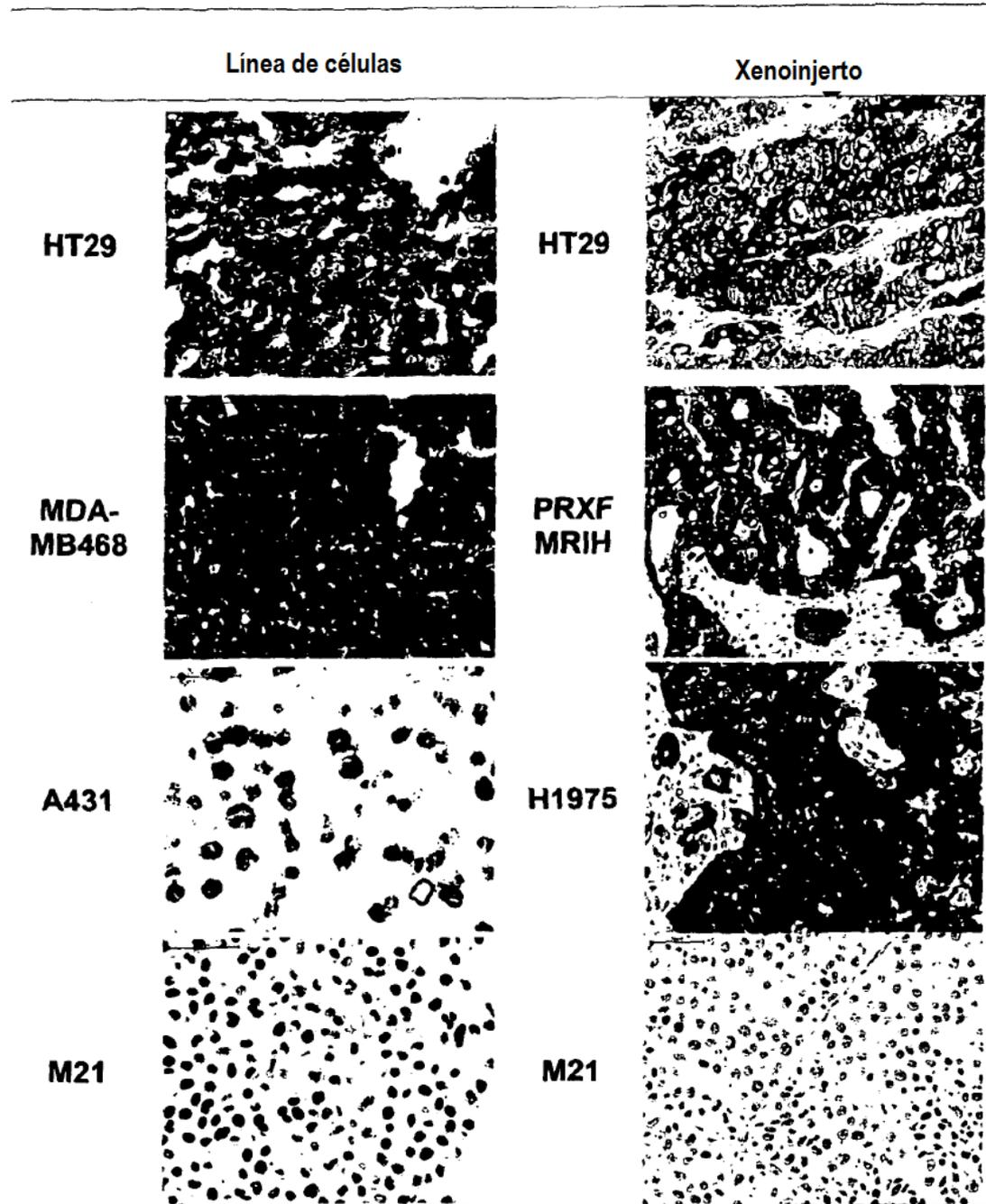


Figura 17



Figura 18

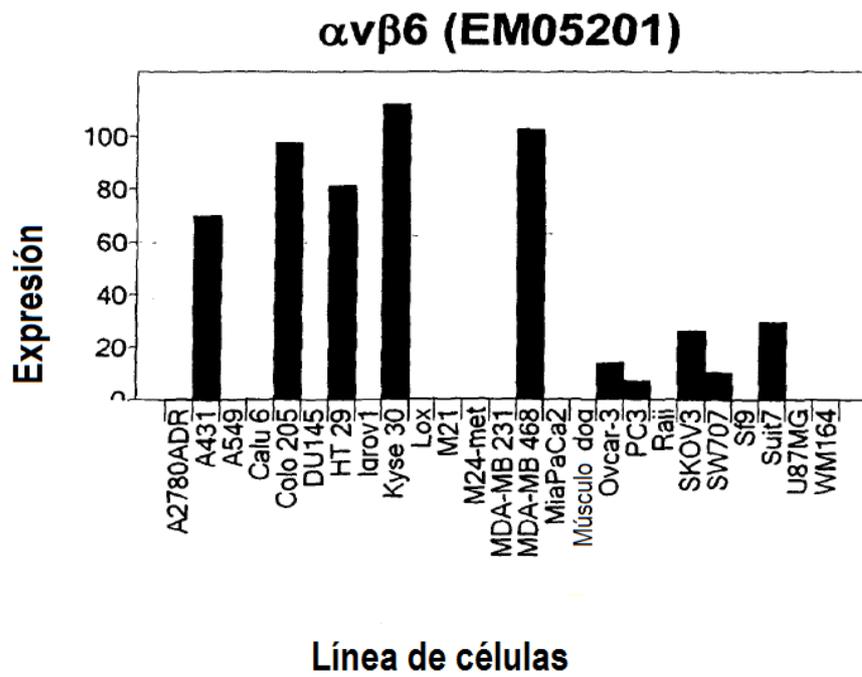


Figura 19

$\alpha v \beta 6$ (EM05201)

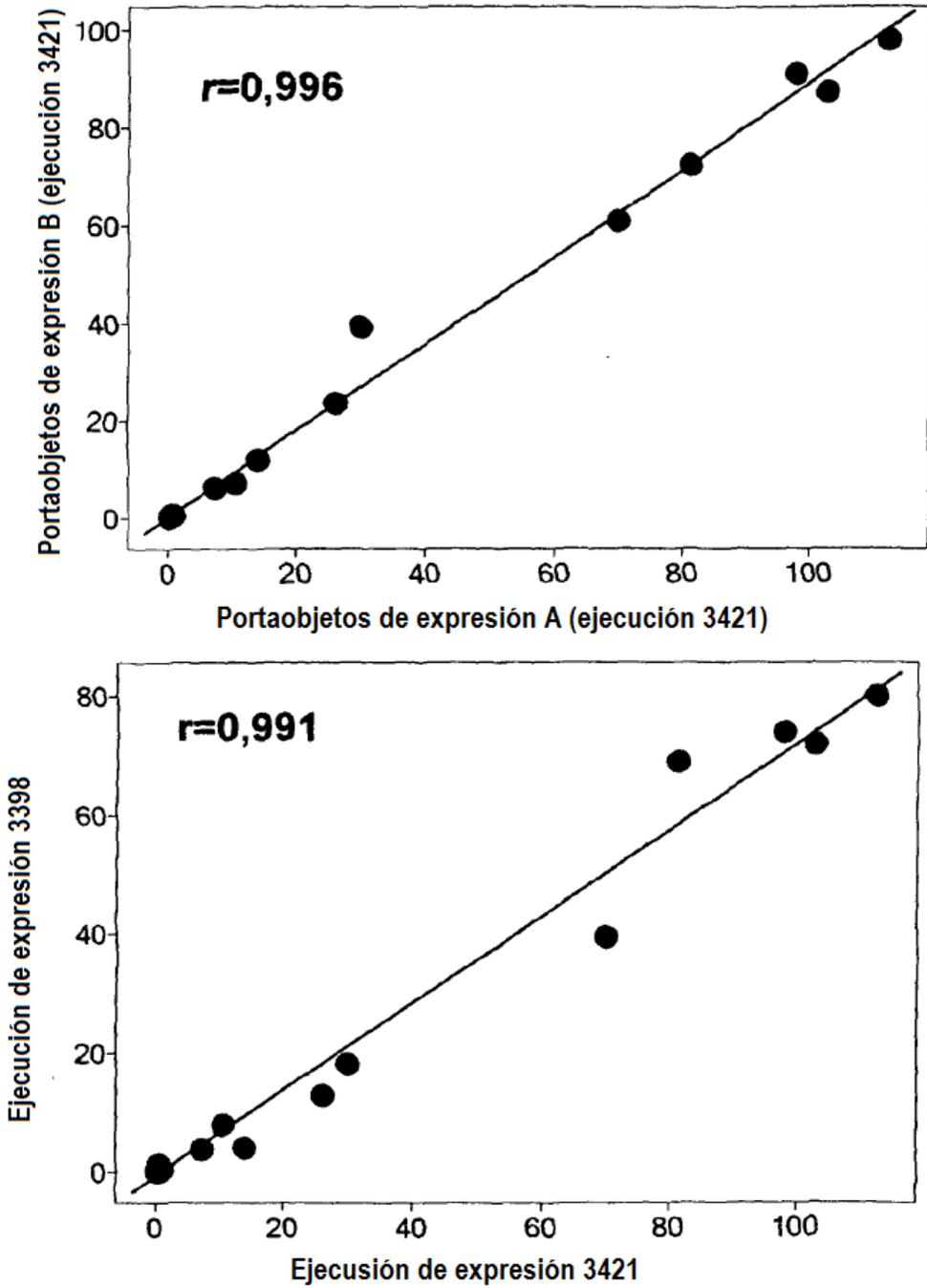


Figura 20

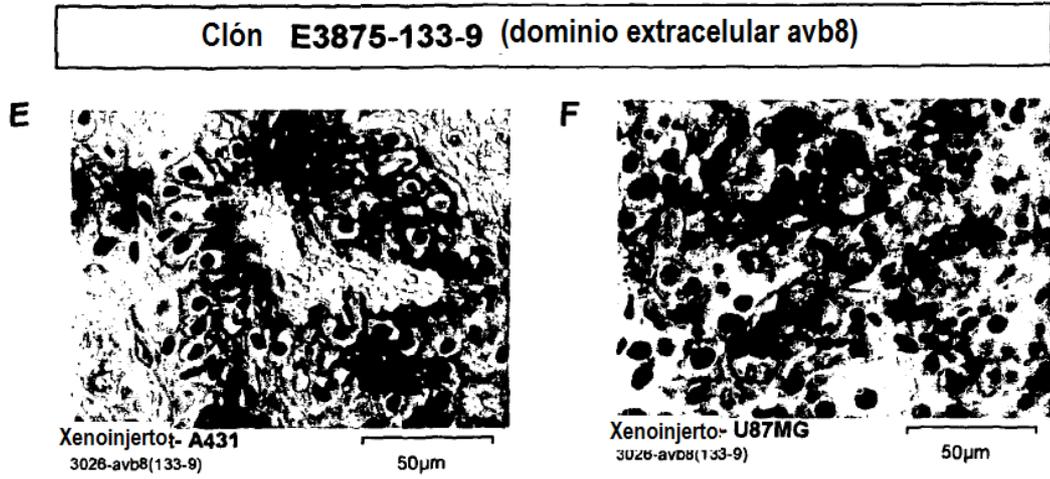


Figura 21

Immunohistoquímica con el anticuerpo	Avb8 (E3875-133-9)
Experimento: CAX08	Instrumento: MIRAXSCAN
Protocolo: 3298	Tejido: Líneas de células de cáncer in vitro (FFPE)

	1	2	3	4	5
CAX08		24 <u>A431</u> oesca escamosas	18 <u>SuitZ</u> ca páncreas	12 <u>C.8161</u> melanoma	6 <u>NHEH460</u> ca pulmón LC
		23 <u>MDA-MB-231</u> ca mama	17 <u>MiaPaCa2</u> ca páncreas	11 <u>A2780 ADR</u> ca ovario	5 <u>Calu6</u> adeno de pulmón
	28 <u>Raji</u> linfoma de Burkitt	22 <u>MDA-MB468</u> ca mama	16 <u>M24-mel</u> melanoma	10 <u>Ovar.3</u> ca ovario	4 <u>SW707</u> ca colon
	27 <u>SF.9</u> célula de insecto	21 <u>MCF7</u> ca mama	15 <u>M.21</u> melanoma	9 <u>SKOV.3</u> ca ovario	3 <u>HT.29</u> ca colon
	26 <u>Igrov1</u> ca ovario	20 <u>PC.3</u> próstata 3	14 <u>Lox</u> melanoma	8 <u>U87MG</u> glioblastoma	2 <u>Colo.205</u> ca colon
	25 <u>Kyse 30</u> ca escamosas	19 <u>DU145</u> ca próstata	13 <u>WM.164</u> melanoma	7 <u>A.549</u> ca pulmón	1 <u>HCT.116</u> ca colon
			M ⁺	M ⁺	M ⁺

M⁺ = Músculo de corazón de perro para propósitos de orientación

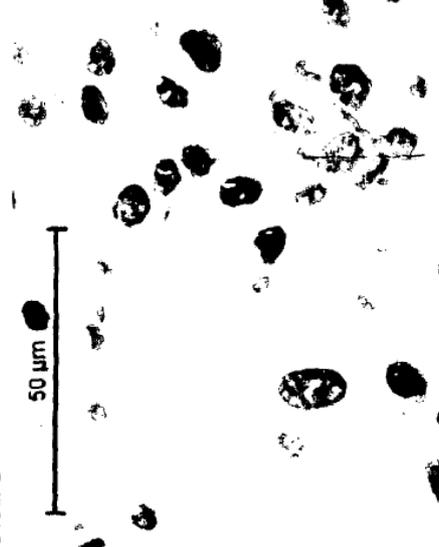
Mapa de arreglo, M: músculo de corazón de perro

CAX08, visión general

Imunohistoquímica con el anticuerpo	avb6 (E3875-133-9)
Experimento: CAX08	Instrumento: MIRAXSCAN
Protocolo: 3298	Tejido: Líneas de células de cáncer in vitro (FFPE)



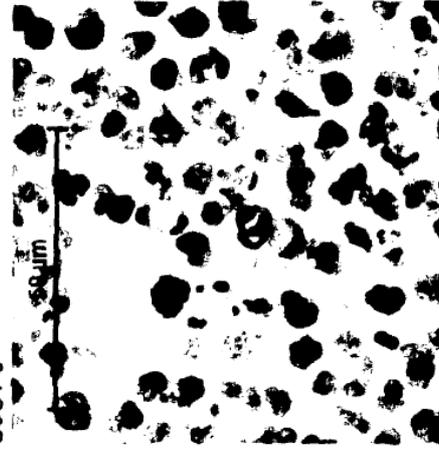
Ovar-3



U87MG



SCOV-3



Raji

Figura 22

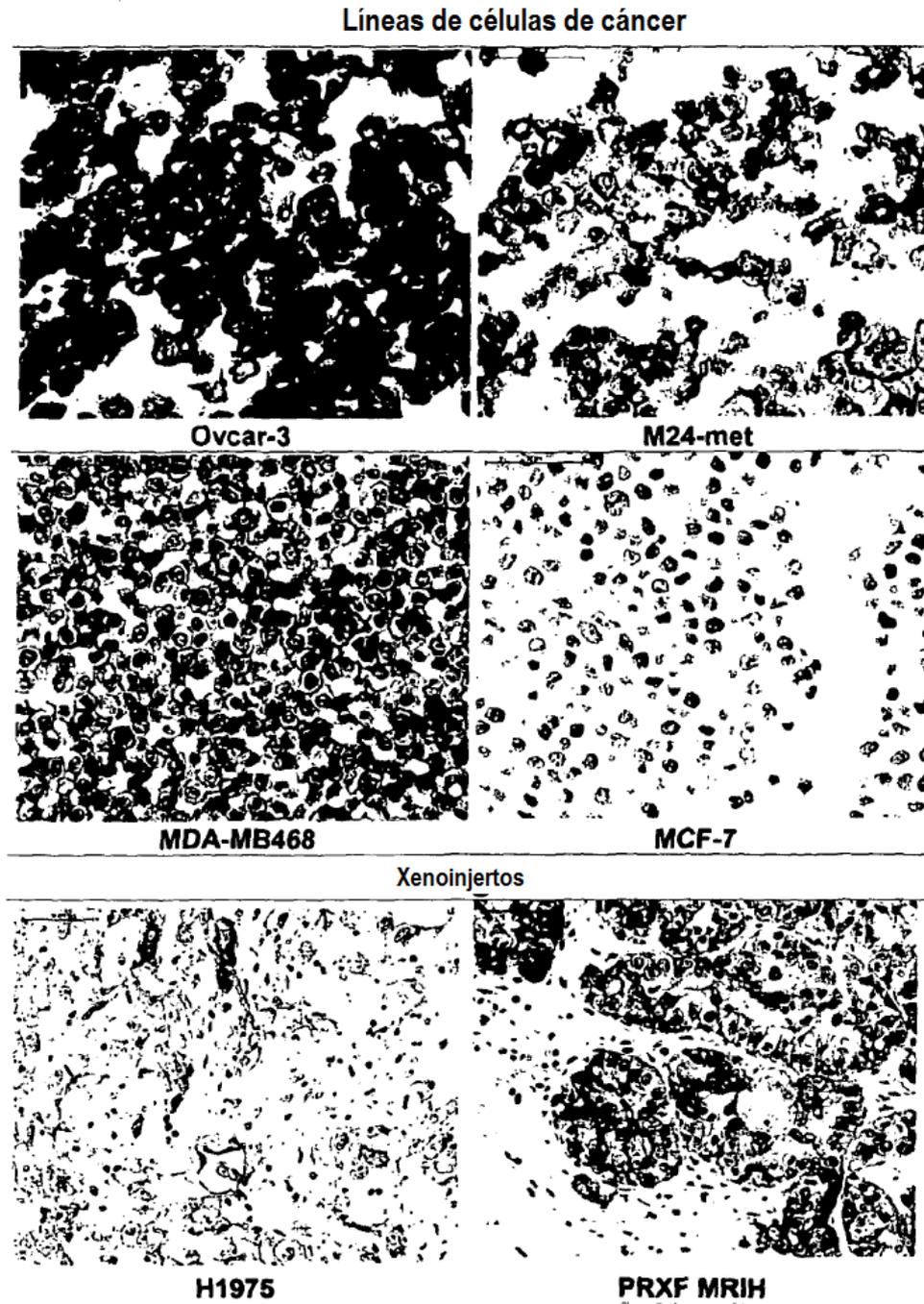


Figura 23

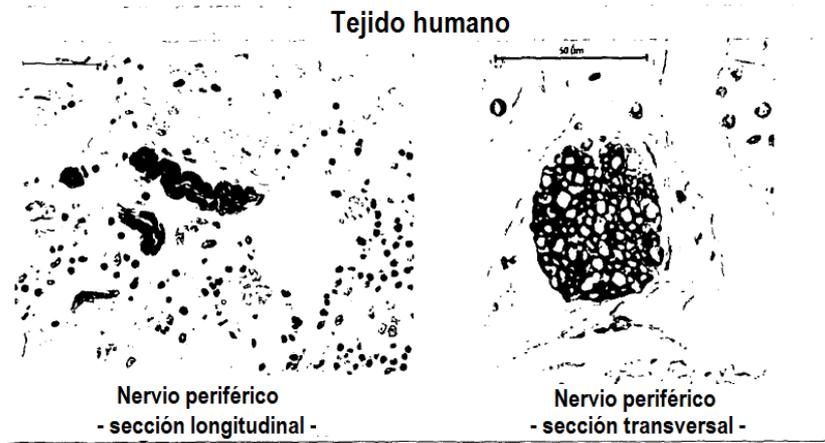


Figura 24



Figura 25

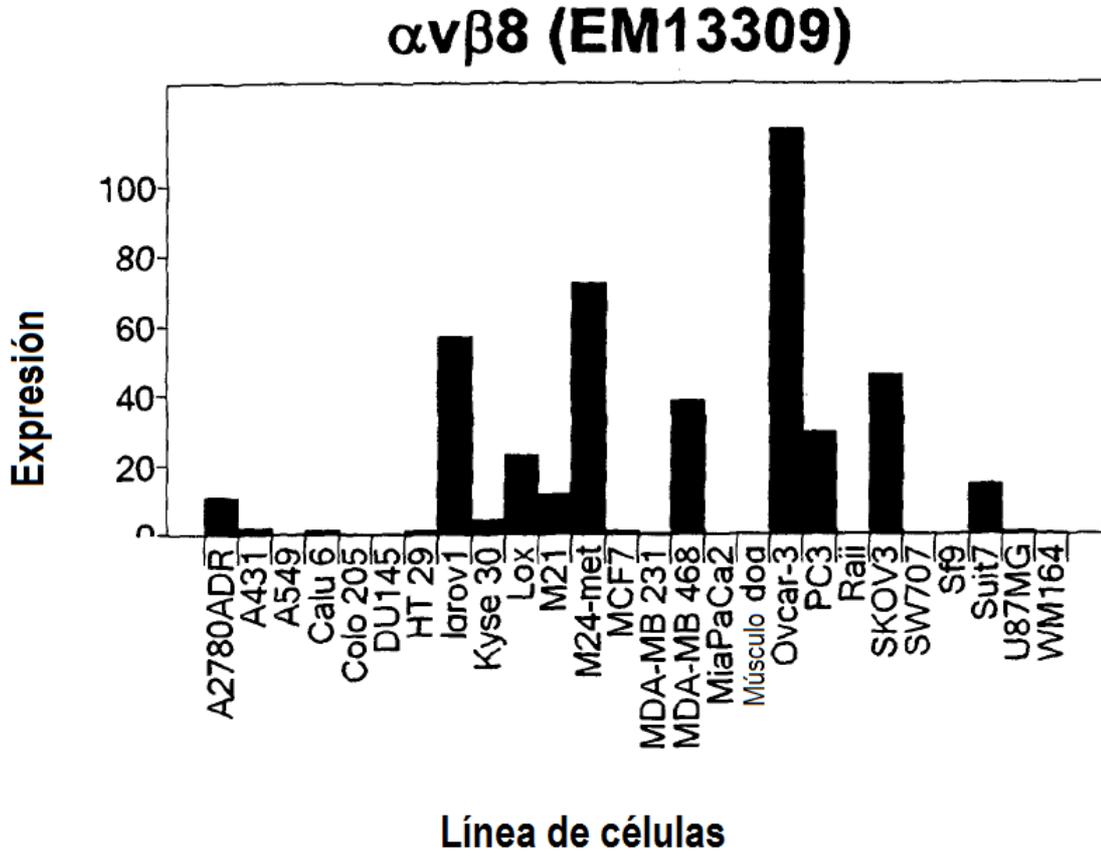


Figura 26

$\alpha\nu\beta 8$ (EM13309)

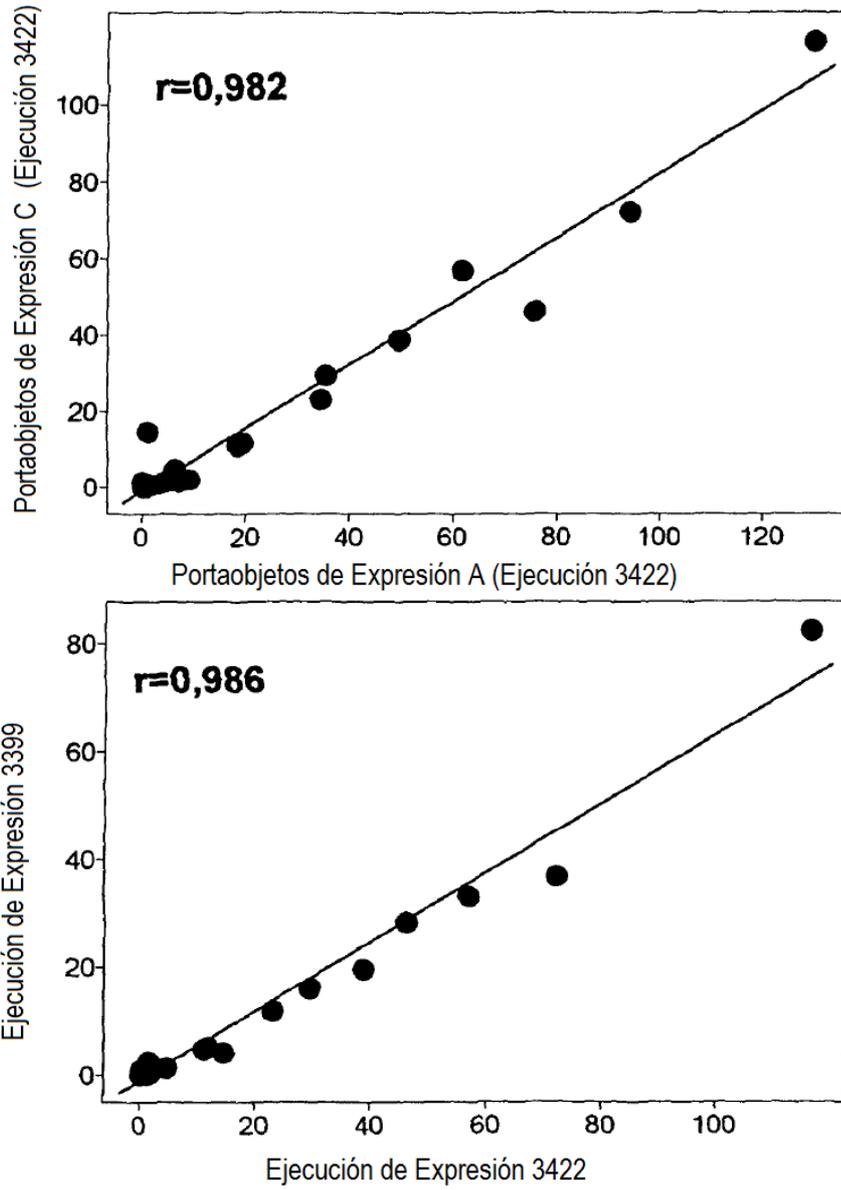


Figura 27

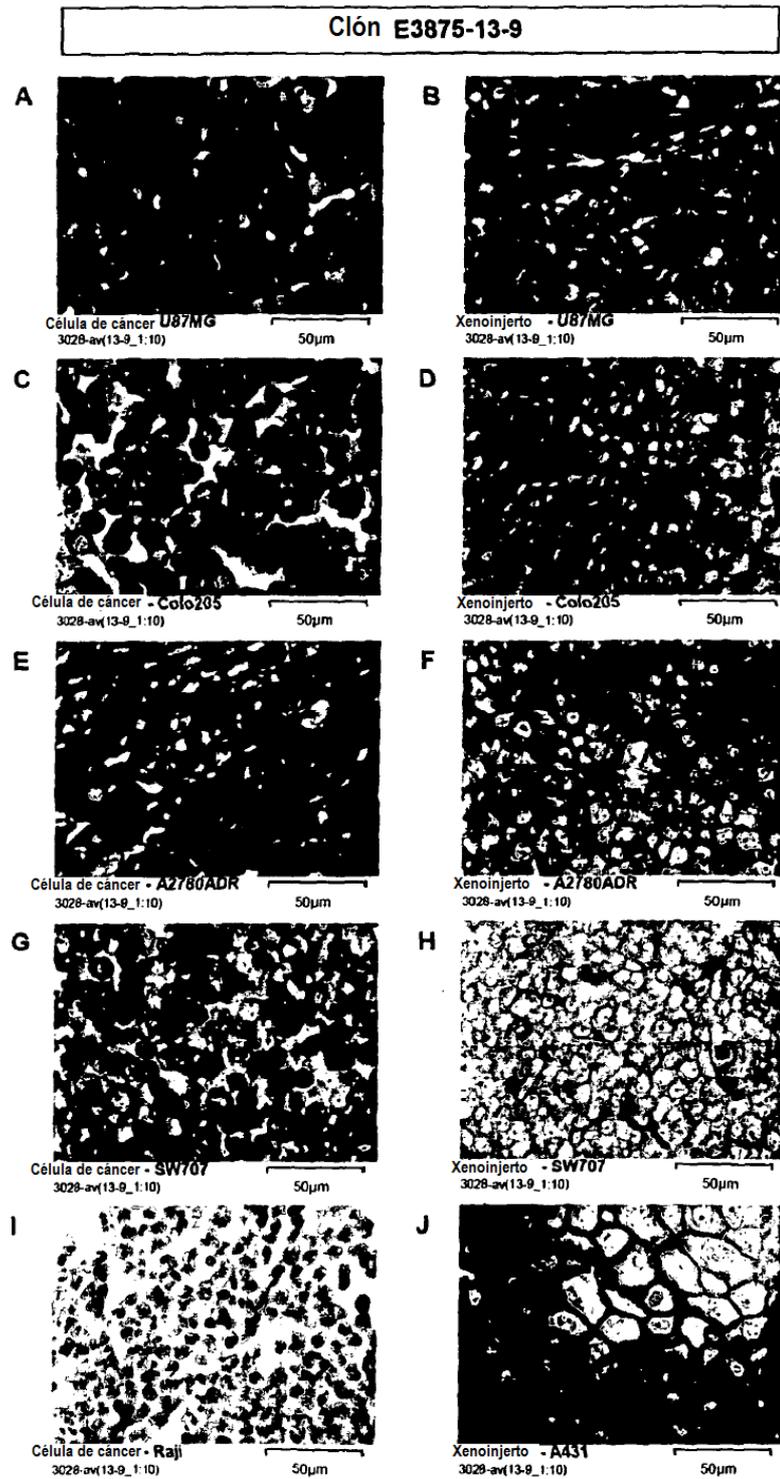


Figura 28

Inmunohistoquímica con el anticuerpo	av (E3875-13-9)
Experimento: CAX08	Instrumento: MIRAXSCAN
Tejido: Líneas de células de cáncer in vitro (FFPE)	

		1	2	3	4	5	6
			24 A431 oes ca escamosas	18 SUIT7 ca páncreas	12 C8161 melanoma		
			23 MDA-MB-231 ca mama	17 MiaPaCa2 ca páncreas	11 A2780.ADR ca ovario	5 Calu6 adeno de pulmón	
		28 Raji linfoma de Burkitt	22 MDA-MB468 ca mama	16 M24-mel melanoma	10 Ovcar-3 ca ovario	4 SW620 ca colon	
		27 SF-9 célula de insecto	21 MCF7 ca mama	15 M21 melanoma	9 SKOV3 ca ovario	3 HT29 ca colon	
		26 Igrov1 ca ovario	20 PC3 próstata 3	14 Lox melanoma	8 U87MG glioblastoma	2 Colo-205 ca colon	
		25 Kyse 30 ca escamosas	19 DU145 ca próstata	13 WM164 melanoma	7 A549 ca pulmón	1 HCT116 ca colon	
				M*	M*	M*	

M* = Músculo de corazón de perro para propósitos de orientación

Mapa de arreglo, M: músculo de corazón de perro

CAX08, visión general

Imunohistoquímica con el anticuerpo	av (E3875-13-9)
Experimento: CAX08	Instrumento: MIRAXSCAN
	Tejido: Líneas de células de cáncer in vitro (FFPE)



HT28



U87MG



Colo205



Raji

Figura 29

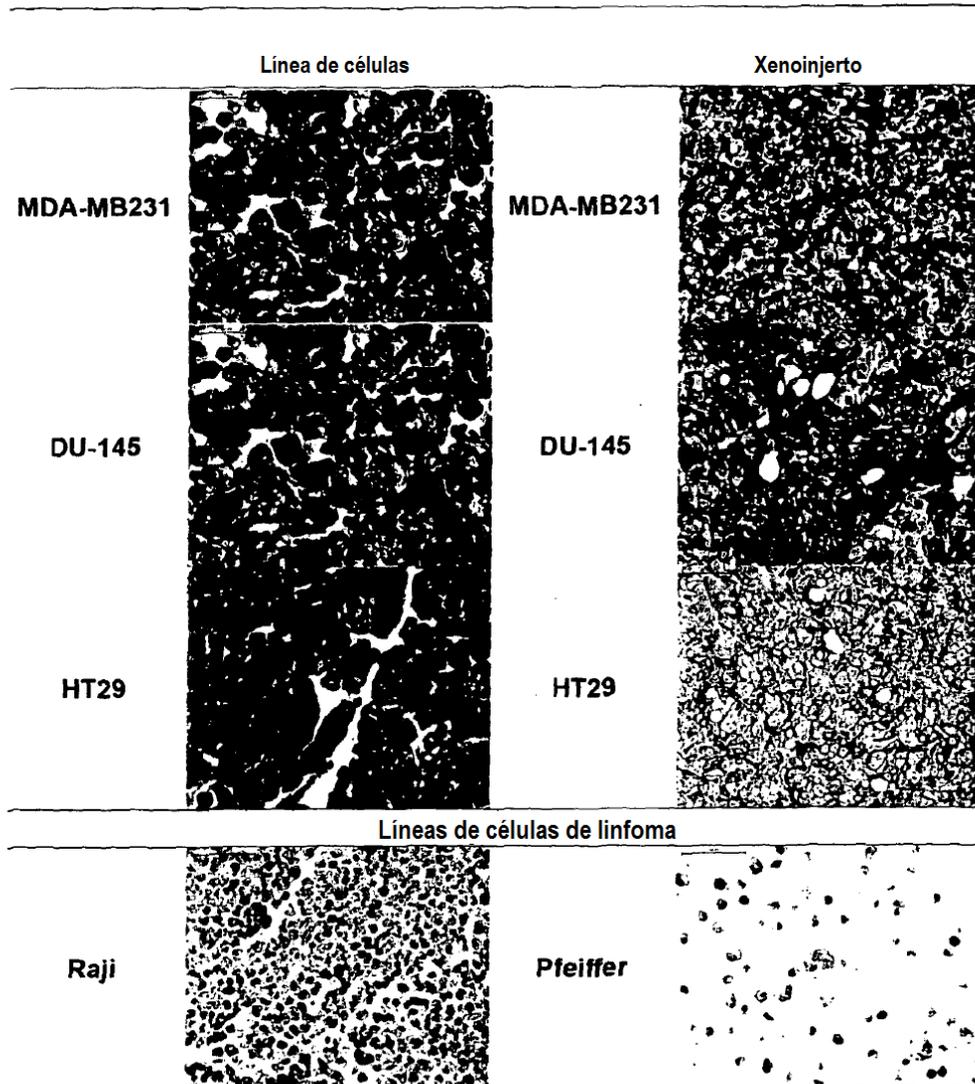


Figura 30

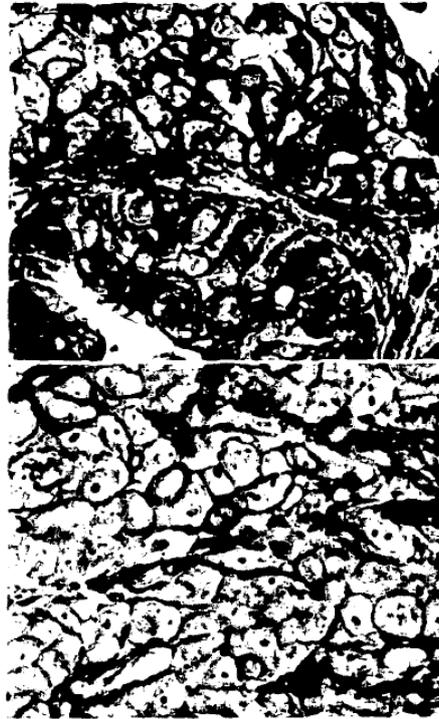


Figura 31

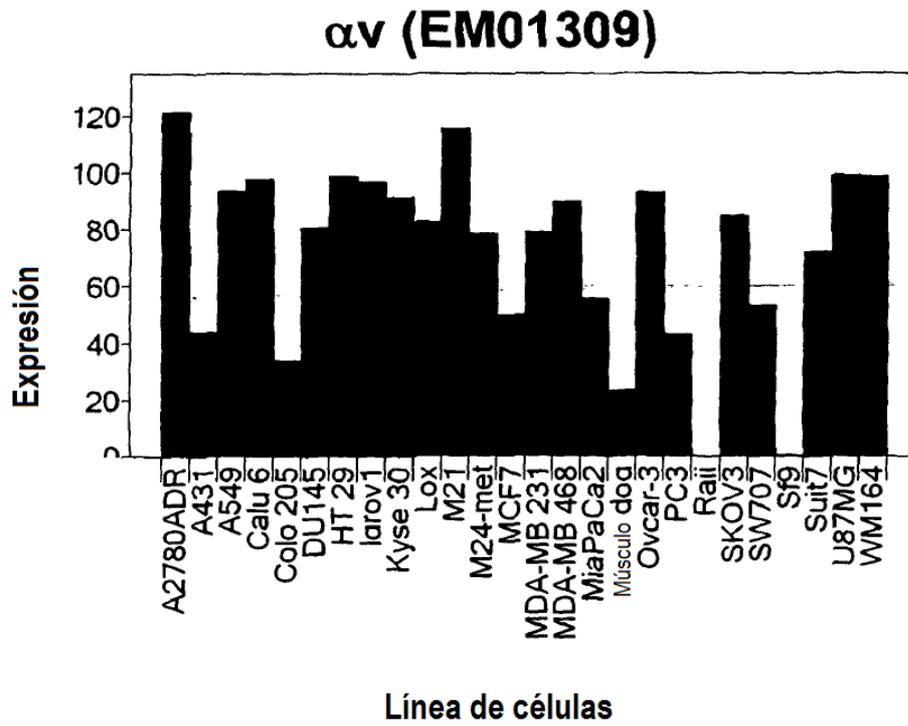


Figura 32

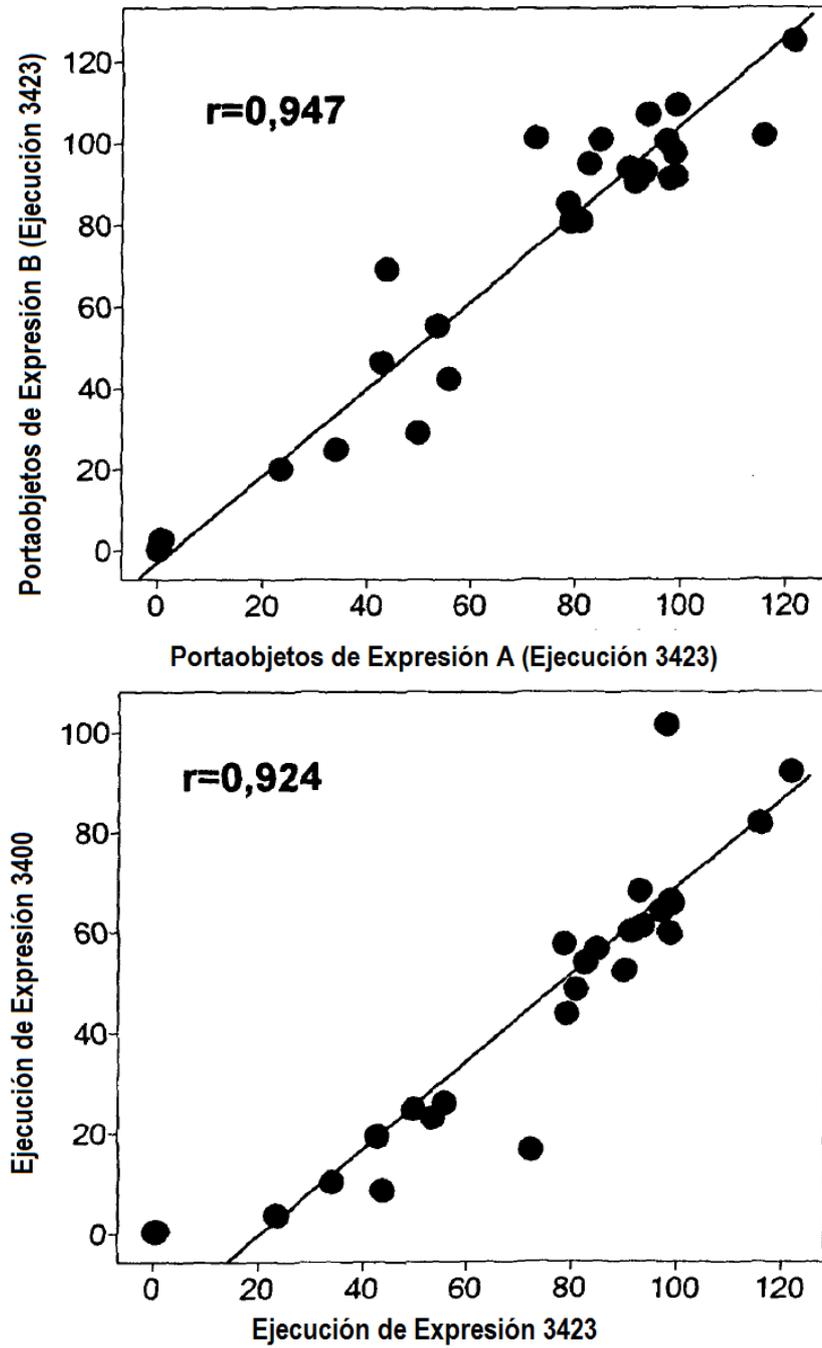


Figura 33

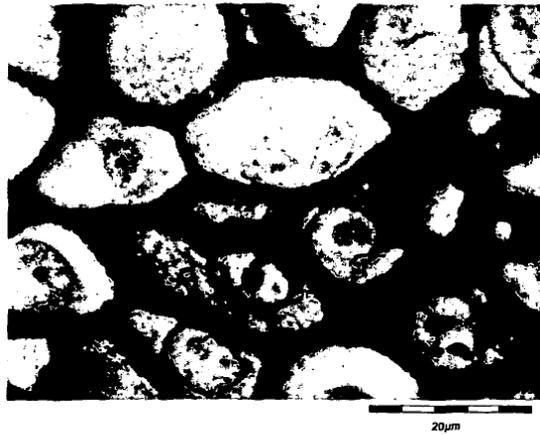


Figura 34

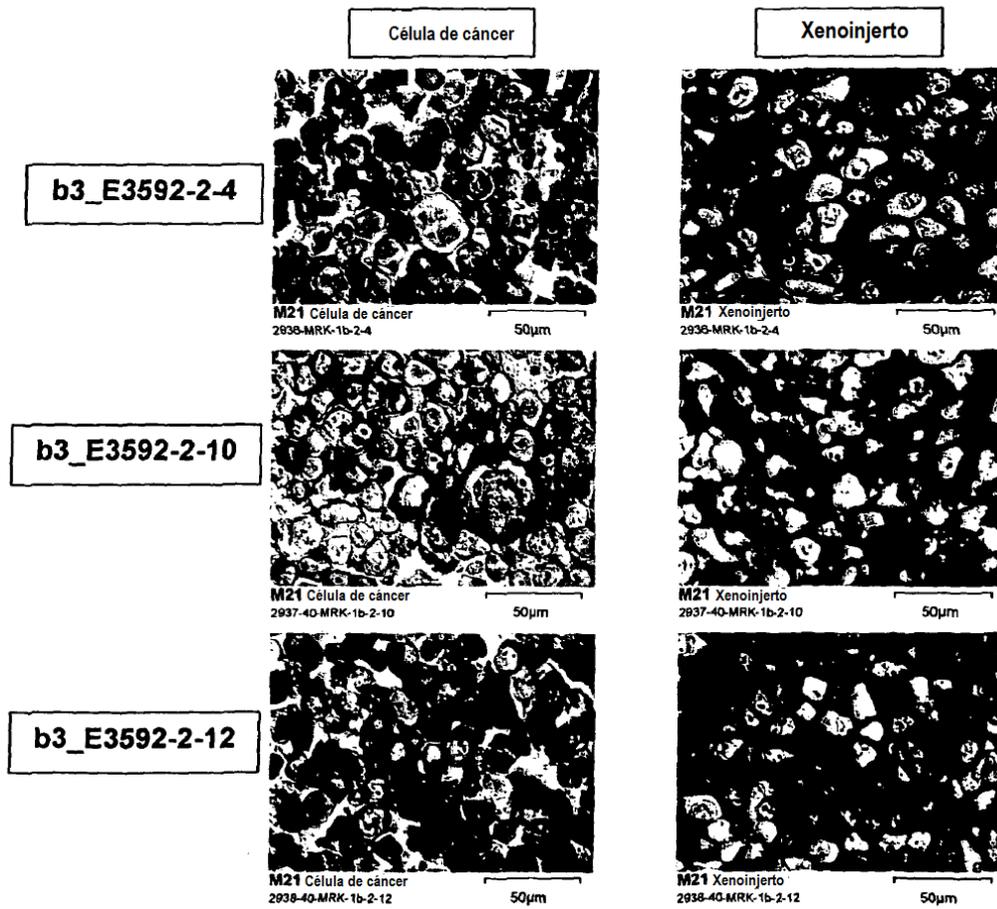


Figura 35

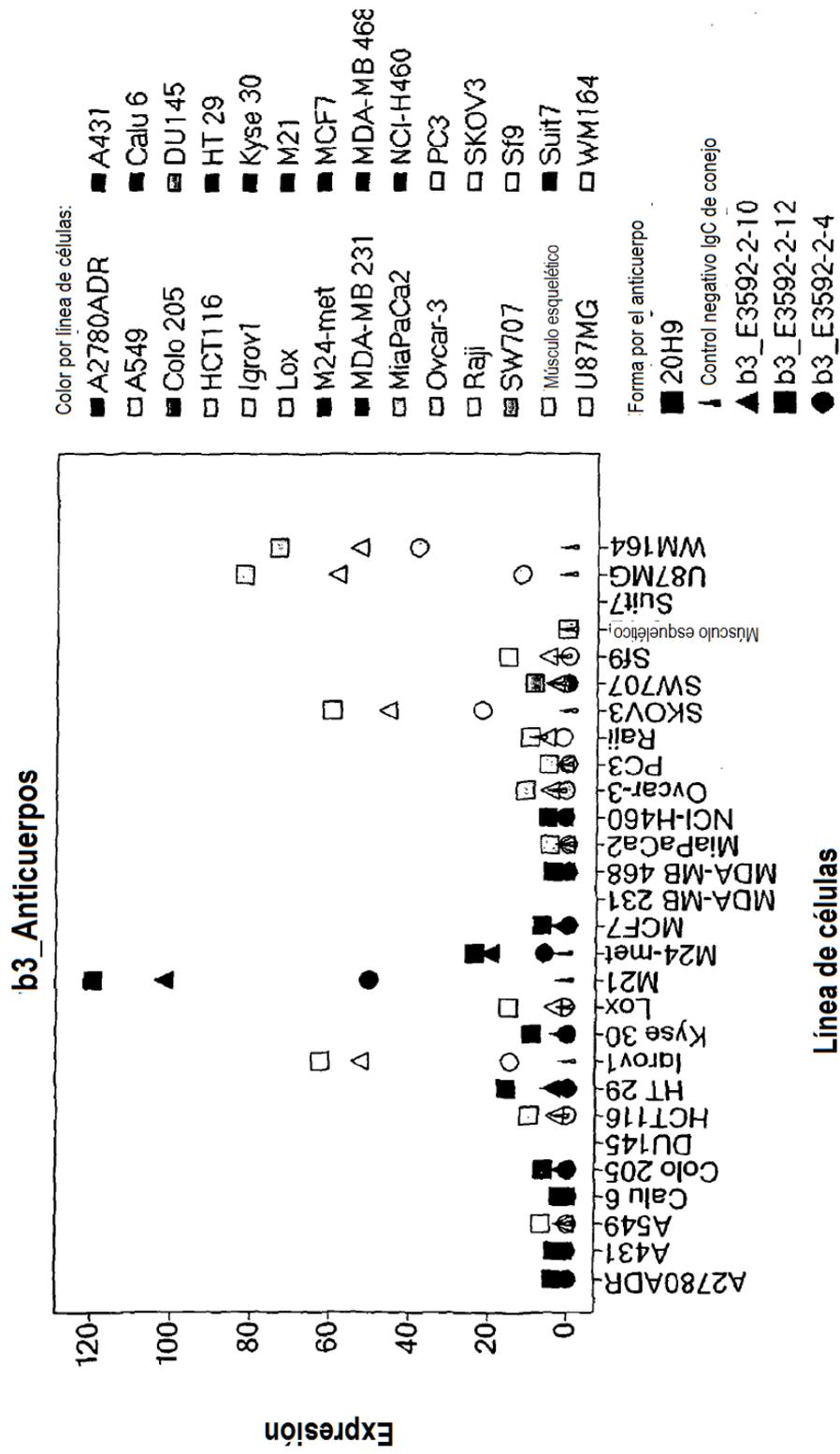


Figura 36

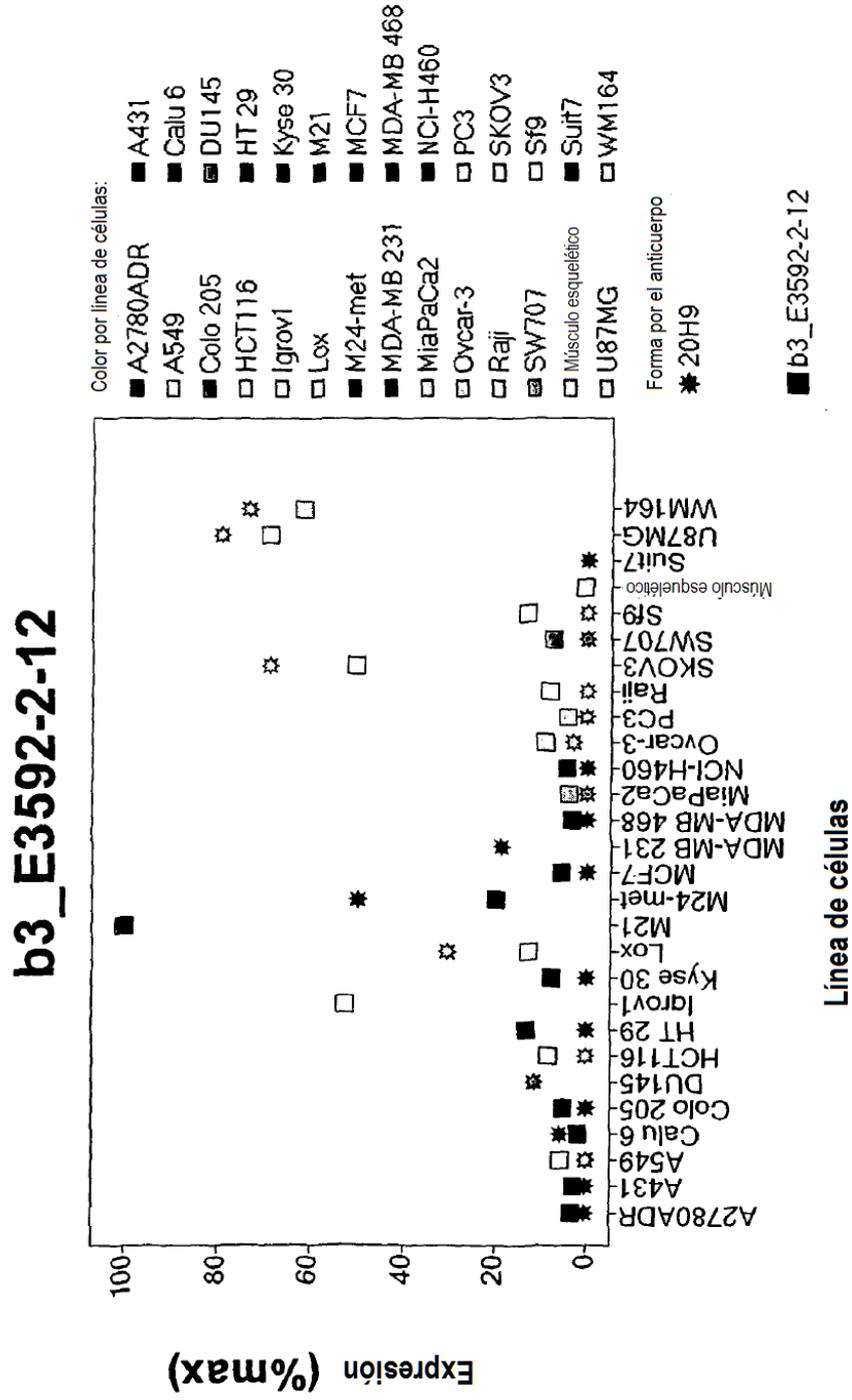


Figura 37

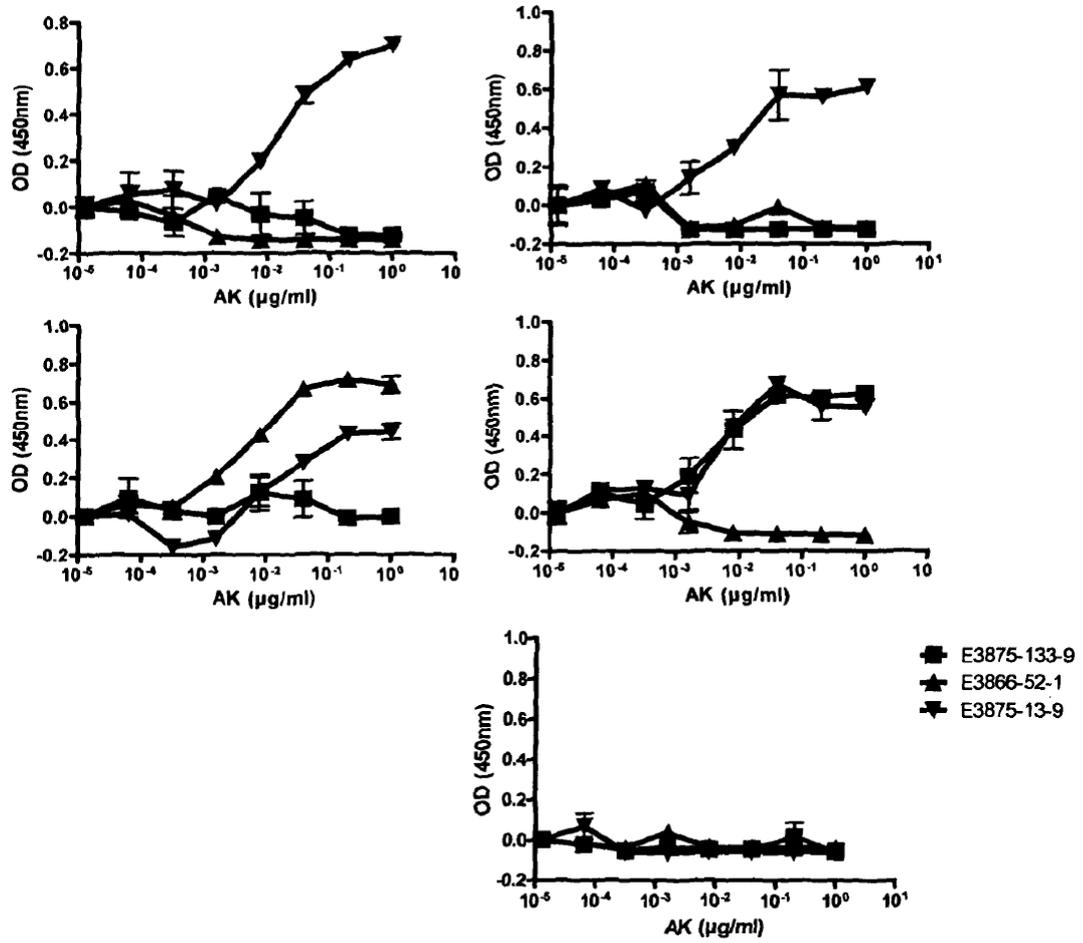


Figura 38

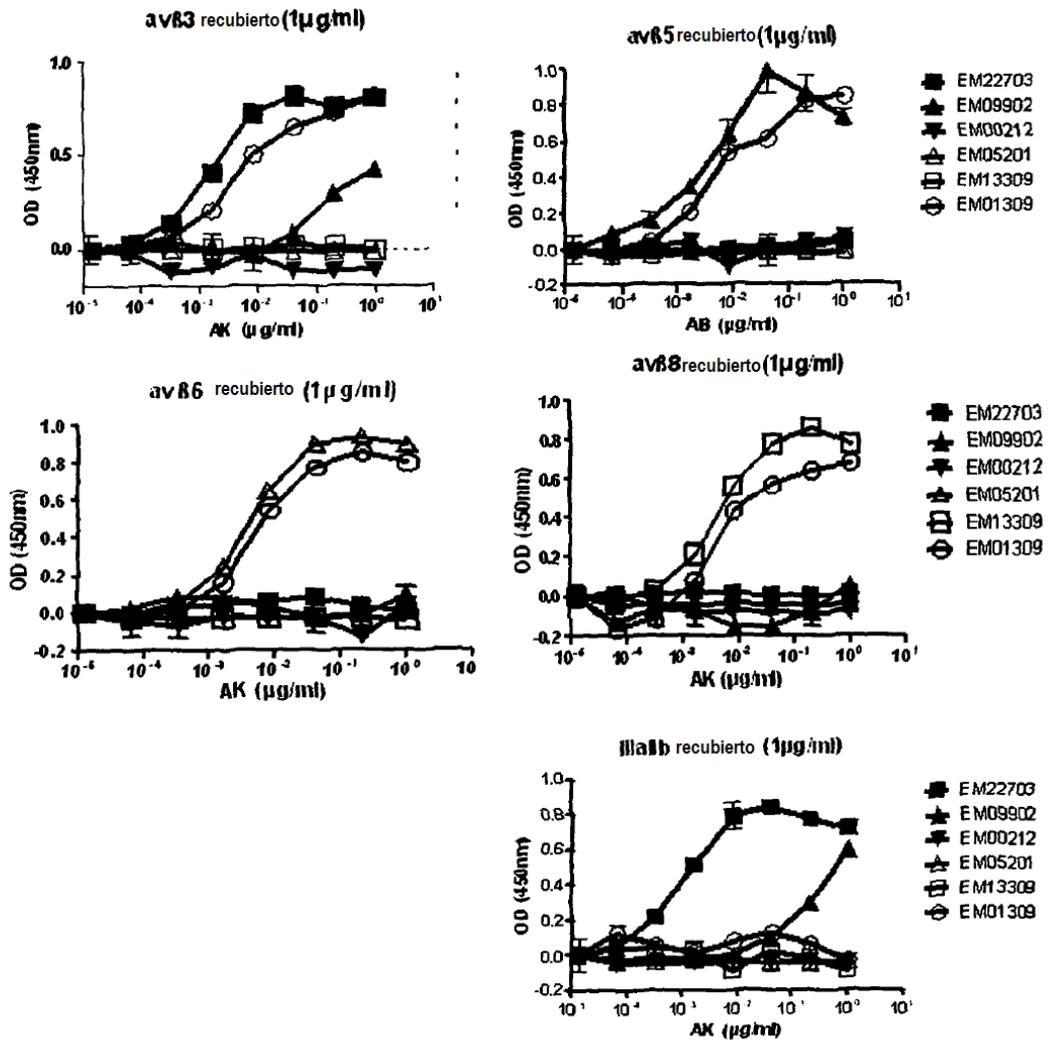


Figura . 39

