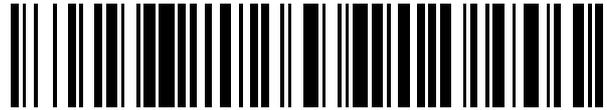


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 981**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2010 PCT/EP2010/004727**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.02.2011 WO11015333**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2010 E 10745136 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2461832**

54 Título: **Selección como diana de neovascularización de médula ósea**

30 Prioridad:

05.08.2009 US 231564 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2017

73 Titular/es:

**PHILOGEN S.P.A. (100.0%)
Loc. Bellaria 35
53018 Sovicille (SI) , IT**

72 Inventor/es:

**KASPAR, MANUELA;
SCHLIEMANN, CHRISTOPH y
NERI, DARIO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 640 981 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

Selección como diana de neovasculatura de médula ósea

5 Descripción

La presente invención se refiere al uso de anticuerpos que seleccionan como diana un antígeno expresado en la neovasculatura de médula ósea, en particular al uso de tales anticuerpos para tratar o diagnosticar leucemia mieloide aguda (LMA).

10 Las estructuras neovasculares de médula ósea son rasgo característico de varias enfermedades, incluyendo leucemias, síndromes mielodisplásicos (en ocasiones denominados preleucemias) y mieloma múltiple.

15 La leucemia es un cáncer de la sangre y la médula ósea que se caracteriza por una proliferación anómala de células sanguíneas. Las células sanguíneas se producen en la médula ósea donde se desarrollan a partir de células madre. La primera fase en el desarrollo de las células sanguíneas es la diferenciación de las células madre para dar células madre mieloides o células madre linfoides. En los individuos sanos, las células madre mieloides continúan entonces diferenciándose en uno de tres tipos de células sanguíneas maduras: glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, mientras que las células madre linfoides se diferencian en otro tipo de glóbulos blancos, denominados linfocitos. 20 Cualquiera de estos dos linajes celulares puede resultar afectado por la leucemia. Dependiendo del linaje celular afectado, las leucemias se denominan o bien como leucemia mieloide (o alternativamente como mielocítica, mielógena, mieloblástica o no linfocítica) o bien como leucemia linfocítica (o alternativamente como linfoblástica o linfógena).

25 Además, las leucemias también se diferencian basándose en si la enfermedad es aguda o crónica. Como su nombre implica, las leucemias agudas avanzan rápidamente mientras que la leucemia crónica avanza lentamente y se desarrolla a lo largo de muchos años. En las formas agudas de la enfermedad, la médula ósea afectada libera grandes números de glóbulos blancos inmaduros, denominados blastocitos, que no pueden llevar a cabo las funciones normales de los glóbulos blancos. Si no se tratan, las leucemias agudas conducen a muerte en un plazo de semanas. 30

La forma más común de leucemia aguda en adultos, y la segunda leucemia más común en niños, es la leucemia mieloide aguda (LMA). La LMA, como su nombre implica, afecta a los glóbulos blancos mieloides en lugar de a los linfocíticos y por tanto en ocasiones se denomina leucemia no linfocítica (LNLA). 35

Las leucemias difieren de la mayoría de otros cánceres en que normalmente no forman tumores estáticos. Las raras excepciones incluyen tumores sólidos compuestos por blastocitos que se producen fuera de la médula ósea en pacientes con LMA. Estos tumores se denominan tumores mieloides extramedulares (o alternativamente cloroma, sarcoma granulocítico o sarcoma mieloide) y la enfermedad se denomina entonces LMA extramedular. 40

Las formas agudas de leucemia se tratan habitualmente usando quimioterapia. Por ejemplo, los regímenes de tratamiento comunes para la LMA incluyen citarabina administrada o bien sola o, más comúnmente, en combinación con una antraciclina tal como daunorubicina o idarubicina. Sin embargo, pese a la disponibilidad de regímenes de quimioterapia de múltiples agentes agresivos, sólo el 20-30% de los pacientes con LMA se curan actualmente. El motivo de esta baja tasa de éxito es la aparición de subclones de células de leucemia resistentes a la radiación y a múltiples fármacos, dominantes. La naturaleza insidiosa de la LMA también está relacionada con el hecho de que, aunque todos los blastocitos circulantes en la sangre y la mayoría de los blastocitos en regiones de la médula ósea de fácil acceso se eliminan rápidamente por regímenes quimioterápicos basados en citarabina, algunos blastocitos en zonas resguardadas de la médula ósea sobreviven a la quimioterapia y crecen de nuevo al final del tratamiento, produciendo recidiva. Cualquier tratamiento que permita que se erradiquen estos blastocitos resistentes, preferiblemente sin producir toxicidad adicional importante a la médula ósea, representaría un avance importante en el tratamiento de la leucemia. 45 50

Los presentes inventores han descubierto que determinados antígenos se expresan en la neovasculatura de médula ósea, tal como la neovasculatura encontrada en la médula ósea de pacientes con leucemia. 55

Específicamente, los presentes inventores han demostrado que tenascina-C y la isoforma con dominio extra A (ED-A) de fibronectina, se expresan en estructuras neovasculares presentes en biopsias de médula ósea obtenidas de pacientes con LMA. 60

Se ha notificado previamente que se produce un aumento en la angiogénesis en la médula ósea de pacientes con LMA (Padro *et al.*, 2000). Sin embargo, se desconocía que existen antígenos que se expresan específicamente en las estructuras neovasculares en la médula ósea de estos pacientes. 65

El descubrimiento de estos antígenos abre nuevas vías para el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades caracterizadas por la presencia de neovasculatura de médula ósea, incluyendo todas las mencionadas en el

presente documento, tal como leucemia, síndromes mielodisplásicos y mieloma múltiple.

Por ejemplo, los tratamientos quimioterápicos convencionales para la leucemia no discriminan entre tejidos enfermos y sanos. Por consiguiente, tienen que administrarse grandes dosis de fármacos al paciente para alcanzar concentraciones terapéuticamente relevantes, lo que conduce a efectos secundarios tales como toxicidades en tejidos sanos. En contraposición, anticuerpos que se unen a la neovasculatura de médula ósea en pacientes con leucemia permiten que los agentes terapéuticos se administren directamente a los tejidos afectados, evitando o reduciendo así las desventajas asociadas con los tratamientos quimioterápicos convencionales. Además, perfiles de toxicidad favorables de agentes terapéuticos específicos de sitio también pueden abrir nuevas vías en la terapia de enfermedades caracterizadas por la presencia de neovasculatura de médula ósea, permitiendo la administración sistémica de agentes altamente potentes y prometedores, que actualmente o bien se administran a dosis subóptimas o cuya aplicación clínica se ha impedido hasta la fecha por toxicidades inaceptables cuando se aplican de forma no modificada.

Por tanto un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad caracterizada por neovasculatura de médula ósea, concretamente LMA, en el que el anticuerpo se une a un antígeno de la neovasculatura de médula ósea en pacientes que padecen dicha enfermedad, en el que el antígeno es la isoforma con dominio extra A (ED-A) de fibronectina. Los individuos o pacientes a los que se hace referencia en el presente documento son preferiblemente humanos.

El método puede comprender administrar el anticuerpo y un compuesto anticanceroso a un individuo que lo necesita.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a un antígeno de la neovasculatura de médula ósea en pacientes que padecen una enfermedad caracterizada por neovasculatura de médula ósea, concretamente LMA, para su uso en un método de diagnóstico de dicha enfermedad, en el que el antígeno es la isoforma con dominio extra A (ED-A) de fibronectina.

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo que se une a la isoforma con dominio extra A (ED-A) de fibronectina en la neovasculatura de médula ósea en pacientes que padecen LMA para la detección o el diagnóstico *in vitro* de dicha enfermedad.

Puede proporcionarse un anticuerpo que se une a la isoforma con dominio extra A (ED-A) de fibronectina para su uso en un método de detección o diagnóstico de una enfermedad caracterizada por neovasculatura de médula ósea, concretamente LMA, en un individuo, en el que el método comprende:

administrar el anticuerpo al individuo; y

detectar la unión del anticuerpo a la neovasculatura de médula ósea en el individuo.

Puede proporcionarse un anticuerpo que se une a la isoforma con dominio extra A (ED-A) de fibronectina para su uso en un método de detección o diagnóstico de una enfermedad caracterizada por neovasculatura de médula ósea, concretamente LMA, en un individuo, en el que el método comprende:

administrar el anticuerpo al individuo; y

determinar la presencia o ausencia del anticuerpo en la médula ósea del individuo,

en el que la presencia del anticuerpo en la neovasculatura de médula ósea del individuo indica que el individuo tiene dicha enfermedad.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método de detección o diagnóstico *in vitro* de una enfermedad caracterizada por neovasculatura de médula ósea, concretamente LMA, en un individuo, en el que el método comprende:

aplicar un anticuerpo que se une a la isoforma con dominio extra A (ED-A) de fibronectina en la neovasculatura de médula ósea en dichos pacientes a una muestra de médula ósea obtenida del individuo; y

detectar la unión del anticuerpo en la muestra,

en el que la unión del anticuerpo a la neovasculatura de médula ósea en la muestra indica que el individuo tiene dicha enfermedad.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método de selección como diana de neovasculatura de médula ósea *in vitro*, que comprende el uso de un anticuerpo que se une a la isoforma con dominio extra A (ED-A) de fibronectina.

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo que se une a la isoforma con dominio extra A (ED-A) de fibronectina para seleccionar como diana neovasculatura de médula ósea *in vitro*.

5 Otro aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a la isoforma con dominio extra A (ED-A) de fibronectina para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de LMA que comprende seleccionar como diana neovasculatura de médula ósea.

10 Las enfermedades caracterizadas por la presencia de estructuras neovasculares en la médula ósea incluyen leucemia, síndromes mielodisplásicos (también denominados preleucemias) y mieloma múltiple. Las leucemias a modo de ejemplo incluyen leucemias agudas y crónicas. Por ejemplo, una leucemia tal como se hace referencia en el presente documento puede ser una leucemia mieloide o una linfocítica. Preferiblemente, una leucemia tal como se hace referencia en el presente documento es la leucemia mieloide aguda (LMA).

15 Los síndromes mielodisplásicos son trastornos de células madre de médula ósea caracterizados por producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y riesgo de transformación en leucemia mielógena aguda (LMA).

20 El mieloma múltiple también se conoce como mieloma, mieloma de células plasmáticas o enfermedad de Kahler y es un cáncer que afecta a las células plasmáticas en la médula ósea. Se sabe que todas las enfermedades anteriores se caracterizan por neovasos, o angiogénesis, en la médula ósea.

25 La neovasculatura de médula ósea, tal como se hace referencia en el presente documento, puede ser estructuras vasculares encontradas en la médula ósea de pacientes que padecen una enfermedad caracterizada por angiogénesis de médula ósea, tal como leucemia, síndromes mielodisplásicos o mieloma múltiple. Estas estructuras vasculares pueden no encontrarse en la médula ósea de individuos sanos, o pueden encontrarse en la médula ósea de individuos sanos pero en un grado menor que en individuos que padecen una enfermedad de este tipo. Por tanto, la enfermedad puede ser una enfermedad caracterizada por neovasculatura aumentada de médula ósea.

30 Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden unirse a un antígeno expresado en neovasculatura de médula ósea. La neovasculatura de médula ósea puede ser la neovasculatura presente en la médula ósea de un paciente que padece una enfermedad caracterizada por angiogénesis de médula ósea, por ejemplo leucemia, síndromes mielodisplásicos o mieloma múltiple. Preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la presente invención se une a un antígeno de la neovasculatura de médula ósea en pacientes con leucemia. Lo más preferido para su uso en la presente invención son anticuerpos que se unen a un antígeno de la neovasculatura de médula ósea en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA).

35 El antígeno se expresa de manera diferencial en neovasculatura de médula ósea en comparación con tejido normal. El antígeno es una isoforma de una proteína, en el que la isoforma se expresa de manera diferencial en neovasculatura de médula ósea en comparación con tejido normal. El tejido normal en este contexto puede ser tejidos sanos, es decir tejidos no afectados por enfermedad. El antígeno es un antígeno de la neovasculatura de médula ósea en pacientes que padecen una enfermedad caracterizada por angiogénesis de médula ósea, es decir pacientes con leucemia mieloide aguda, y puede expresarse de manera diferencial en la neovasculatura de médula ósea de estos pacientes en comparación con otros tejidos de estos pacientes. Por ejemplo, el antígeno puede expresarse de manera diferencial en la neovasculatura de médula ósea de estos pacientes en comparación con otros tejidos de médula ósea de estos pacientes, tales como otros vasos sanguíneos de médula ósea.

40 El antígeno se expresa de manera diferencial en la neovasculatura de médula ósea de pacientes con LMA en comparación con los vasos sanguíneos de médula ósea encontrados en individuos sanos.

45 Expresión diferencial en este contexto puede significar que el antígeno se expresa en neovasculatura de médula ósea y no se expresa, o no se expresa significativamente, en tejido normal. Alternativamente, expresión diferencial puede significar que la expresión del antígeno en neovasculatura de médula ósea es mayor, por ejemplo significativamente mayor, que en tejido normal. El nivel de expresión de un antígeno en un tejido relevante puede medirse usando, por ejemplo, ELISA, inmunotransferencia de tipo Western o espectrometría de masas. Todos estos métodos están bien establecidos en la técnica. "Significativamente" en el contexto de expresión de antígenos puede significar estadísticamente significativo, por ejemplo cuando se mide usando la prueba de la t de Student. Cuando se usa una prueba de la t de Student, un valor de p menor de por ejemplo 0,1, 0,05 ó 0,01 (dependiendo del umbral elegido para la significación estadística), indica que el nivel de expresión del antígeno en cuestión es significativamente diferente en los tejidos que están comparándose. Por tanto, cuando se compara el nivel de expresión de un antígeno en neovasculatura de médula ósea y tejido normal usando la prueba de la t de Student, un valor de p menor de por ejemplo 0,1, 0,05, o 0,01 indica que el nivel de expresión del antígeno difiere significativamente entre los dos tejidos. De manera similar, un antígeno no se expresa significativamente en un tejido si el nivel de expresión del antígeno en dicho tejido no es estadísticamente diferente de un control negativo. Cuando se usa una prueba de la t de Student para comparar el nivel de expresión en un tejido con un control negativo, un valor de p de 0,1 o mayor, 0,05 o mayor, o 0,01 o mayor (de nuevo dependiendo del umbral elegido para la

significación estadística), indica que el nivel de expresión del antígeno en el tejido en cuestión no difiere significativamente del control negativo, y por tanto no se expresa significativamente en dicho tejido.

5 El antígeno puede ser un antígeno de la matriz extracelular, por ejemplo la matriz extracelular subendotelial, de neovasculatura de médula ósea. El antígeno puede expresarse en células de la neovasculatura de médula ósea.

En la invención reivindicada, el antígeno es la isoforma con dominio extra A (ED-A) de fibronectina.

10 El anticuerpo puede unirse preferentemente a la isoforma con dominio extra A (ED-A) de fibronectina en comparación con otras isoformas de fibronectina. Los anticuerpos preferidos para su uso en la invención incluyen anticuerpos que se unen al dominio extra A (ED-A) de fibronectina.

15 Se describen anticuerpos monoclonales humanos específicos para la isoforma con ED-A de fibronectina en el documento WO2008/120101 y también en Villa *et al.* (2008).

Un anticuerpo para su uso en la presente invención puede competir para unirse a la isoforma con ED-A de fibronectina con un anticuerpo que comprende el dominio VH de F8 (V5L) de SEQ ID NO. 13 y el dominio VL de F8 (K18R) de SEQ ID NO. 15.

20 La competencia entre anticuerpos puede someterse a ensayo fácilmente *in vitro*, por ejemplo usando ELISA y/o etiquetando una molécula indicadora específica a un anticuerpo que puede detectarse en presencia de otro(s) anticuerpo(s) no etiquetado(s), para permitir la identificación de anticuerpos que se unen al mismo epítipo o a un epítipo solapante.

25 En un ejemplo, el anticuerpo para su uso en la invención puede unirse a la isoforma con dominio extra A de fibronectina (por ejemplo, el ED-A de fibronectina) con un valor de KD de al menos 1 μ M, 100 nM, 50 nM o 25 nM, cuando se mide usando resonancia de plasmón superficial, por ejemplo usando un instrumento BIAcore3000. Cuando se mide la afinidad, el anticuerpo puede estar en cualquier formato conveniente incluyendo inmunoproteína pequeña (SIP), scFv o formato de IgG completa. Un método adecuado para determinar la afinidad de un anticuerpo se describe, por ejemplo, en Brack *et al.* (2006).

30 Un anticuerpo para su uso en la invención puede unirse a A-FN y/o el ED-A de fibronectina con la misma afinidad que el anticuerpo F8-SIP (V5L/K18R) cuando se mide usando resonancia de plasmón superficial, por ejemplo usando un instrumento BIAcore3000, o con una afinidad que es mejor.

35 El anticuerpo F8 (V5L/K18R) tiene secuencias de aminoácidos de dominio VH y VL y CDR tal como se muestra en la lista de secuencias adjunta.

40 Un anticuerpo adecuado para su uso en la presente invención puede comprender un sitio de unión anticuerpo-antígeno que comprende un dominio VH y un dominio VL,

comprendiendo el dominio VH una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 17 y una CDR3 de VH de SEQ ID NO: 18;

45 comprendiendo el dominio VL una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 19, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 20 y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 21.

50 En algunas realizaciones preferidas, el anticuerpo para su uso en la presente invención puede comprender un sitio de unión anticuerpo-antígeno que comprende el dominio VH de F8 (V5L) de SEQ ID NO: 13 y el dominio VL de F8 (K18R) de SEQ ID NO: 15.

Se conocen varios formatos de molécula de anticuerpo y puede usarse cualquier formato adecuado para un anticuerpo para su uso en la invención.

55 En algunas realizaciones, un anticuerpo para su uso en la invención puede ser o puede comprender un Fv de cadena sencilla (scFv), que comprende un dominio VH y un dominio VL unidos a través de un ligador peptídico. El experto puede seleccionar una longitud y secuencia de ligador apropiadas, por ejemplo desde al menos 5 o al menos 10 aminoácidos de longitud, hasta aproximadamente 15, hasta aproximadamente 20 o hasta aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, el ligador puede tener la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 22.

60 En algunas realizaciones, un anticuerpo para su uso en la presente invención puede ser una mini-inmunoglobulina o inmunoproteína pequeña (SIP) que comprende un Fv de cadena sencilla (scFv), por ejemplo tal como se describe en (Li *et al.*, 1997). Una SIP puede comprender una molécula de scFv fusionada al dominio CH4 de la isoforma secretora de IgE humana, IgE-S2 (ϵ_{S2} -CH4; Batista *et al.*, 1996) formando una molécula de anticuerpo de mini-inmunoglobulina homodimérica. El dominio CH4 puede tener la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:

24 y puede unirse al dominio VL a través de un ligador peptídico. Un ligador peptídico adecuado se muestra en SEQ ID NO: 23.

5 En algunas realizaciones, un anticuerpo para su uso en la presente invención puede ser una molécula de anticuerpo IgG completa, por ejemplo una molécula de anticuerpo IgG1 completa.

10 También pueden emplearse variantes de los dominios VH y VL y CDR descritos en el presente documento en anticuerpos para su uso en la presente invención. Pueden obtenerse variantes adecuadas por medio de métodos de alteración o mutación de secuencia y examen.

15 Las variantes particulares para su uso tal como se describe en el presente documento pueden incluir una o más alteraciones de secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido), que pueden ser menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de aproximadamente 10 alteraciones o menos de aproximadamente 5 alteraciones, 4, 3, 2 ó 1. Las alteraciones pueden realizarse en una o más regiones de entramado y/o una o más CDR. En particular, las alteraciones pueden realizarse en CDR1 de VH, CDR2 de VH y/o CDR3 de VH, especialmente en CDR3 de VH.

20 En algunas realizaciones preferidas, un anticuerpo para su uso en la presente divulgación se conjuga con una molécula bioactiva, tal como una citocina (por ejemplo IL2), un agente citotóxico, un fotosensibilizador o un radioisótopo terapéutico.

25 Se ha demostrado previamente que las inmunocitocinas que contienen IL-2 pueden erradicar tumores y linfomas en modelos de cáncer de ratón cuando se usan solas o en combinación con otros agentes terapéuticos tales como quimioterapia o anticuerpos intactos (Schliemann *et al.*, 2009; Marlind, *et al.*, 2008; Menrad *et al.*, 2005; y Carnemolla *et al.*, 2002).

30 Por tanto, en algunas realizaciones, un anticuerpo para su uso en la presente invención puede conjugarse con una citocina, por ejemplo interleucina 2 (IL2), para formar un conjugado anticuerpo-citocina. El principal atractivo de usar tales inmunocitocinas es la activación de las células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales [NK]) lo que puede permitir que se erradiquen los últimos blastocitos supervivientes, marcando así la diferencia entre un paciente que padece recidivas tras el tratamiento y una cura.

35 Puesto que las células NK son responsables principalmente de la acción terapéutica de los conjugados anticuerpo-IL2, puede estudiarse la actividad de tales moléculas en ratones inmunocomprometidos que portan tumores. Por ejemplo, pueden usarse modelos de ratón de leucemia humana para estudiar el potencial de la selección como diana *in vivo* y la actividad terapéutica de los conjugados anticuerpo-IL2 en el tratamiento de la leucemia. Un modelo de ratón adecuado para la leucemia humana emplea la línea celular de leucemia HL-60 en ratones atímicos, tal como se da a conocer en Potter *et al.* (1984).

40 La interleucina-2 (IL2) es una citocina secretada que está implicada en la inmunoregulación y la proliferación de linfocitos T y B. Se ha demostrado que la IL2 tiene un efecto citotóxico sobre células tumorales y que la IL2 humana recombinante (aldesleucina: Proleukin™) tiene la aprobación de la FDA para el tratamiento del carcinoma renal metastásico y el melanoma metastásico. La secuencia de la IL2 humana se expone en SEQ ID NO: 27 y está disponible al público con la referencia NP_000577.2 GI: 28178861 de la base de datos de secuencias.

45 En algunas realizaciones preferidas, el resto de IL2 del conjugado anticuerpo-IL2 comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, una identidad de secuencia de al menos el 95% o una identidad de secuencia de al menos el 98% con la secuencia de IL2 humana madura expuesta en SEQ ID NO: 27.

50 La identidad de secuencia se define comúnmente con referencia al algoritmo GAP (paquete Wisconsin GCG, Accelrys Inc., San Diego, EE.UU.). GAP usa el algoritmo Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximiza el número de apareamientos y minimiza el número de huecos. Generalmente, se usan parámetros por defecto, con una penalización por creación de hueco = 12 y una penalización por extensión de hueco = 4. Puede preferirse el uso de GAP, pero pueden usarse otros algoritmos, por ejemplo BLAST (que usa el método de Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (que usa el método de Pearson y Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197), o el programa TBLASTN de Altschul *et al.* (1990) citado anteriormente, que emplea generalmente parámetros por defecto. En particular, puede usarse el algoritmo psi-Blast (Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402).

60 En algunas realizaciones especialmente preferidas, el resto de IL2 del conjugado anticuerpo-IL2 comprende la secuencia de IL2 humana madura expuesta en SEQ ID NO: 27.

65 El resto de IL2 puede fusionarse en el sentido de 5' (extremo N-terminal) o en el sentido de 3' (extremo C-terminal) del anticuerpo o componente polipeptídico del mismo.

El resto de IL2 puede conectarse o unirse al resto de anticuerpo del conjugado anticuerpo-IL2 mediante cualquier

medio covalente o no covalente adecuado. En realizaciones preferidas, el conjugado anticuerpo-IL2 puede ser una proteína de fusión que comprende IL2 y el anticuerpo o un componente polipeptídico del mismo (por ejemplo, una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de cadena múltiple, tal como un Fab. Por tanto, por ejemplo, el resto de IL2 puede fusionarse a un dominio VH o dominio VL del anticuerpo.

5 Normalmente, el anticuerpo, o componente del mismo, y el resto de IL2 se unen a través de un ligador peptídico, por ejemplo un péptido de aproximadamente 5-25 residuos, por ejemplo 10-20 residuos, de manera preferible aproximadamente 15 residuos. Se conocen bien en la técnica ejemplos adecuados de ligadores peptídicos. En algunas realizaciones, un ligador puede tener una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 28.

10 Normalmente, el ligador tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una o más repeticiones en tándem de un motivo. Normalmente, el motivo es una secuencia de cinco residuos, y preferiblemente al menos 4 de los residuos son Gly o Ser. Cuando cuatro de los cinco residuos son Gly o Ser, el otro residuo puede ser Ala. Más preferiblemente cada uno de los cinco residuos es Gly o Ser. Motivos preferidos son GGGGS (SEQ ID NO: 33), SSSSG (SEQ ID NO: 34), GSGSA (SEQ ID NO: 35) y GSGGG (SEQ ID NO: 36). Preferiblemente, los motivos son adyacentes en la secuencia, sin nucleótidos intermedios entre las repeticiones. La secuencia del ligador puede comprender o consistir en entre una y cinco, preferiblemente tres o cuatro, repeticiones del motivo. Por ejemplo, un

15 ligador con tres repeticiones en tándem puede tener una de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOs. 29 a 32.

Se sabe que los conjugados anticuerpo-fármaco son útiles para administrar selectivamente un agente citotóxico a una diana tal como un antígeno asociado con tumor (Carter *et al.*, 2008). Tales conjugados permiten la administración de agentes citotóxicos directamente a los tejidos afectados, evitando de ese modo las desventajas asociadas con la quimioterapia convencional. Por ejemplo, se ha demostrado previamente que anticuerpos tales como F16 o F8 pueden acoplarse a fármacos citotóxicos y pueden localizar con eficacia y selectividad extraordinarias alrededor de vasos sanguíneos tumorales. Por tanto, en algunas realizaciones, puede conjugarse un

20 anticuerpo para su uso en la invención con un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos a modo de ejemplo incluyen agentes citotóxicos que son adecuados para tratar el cáncer. Por ejemplo, un agente citotóxico puede ser adecuado para tratar una enfermedad caracterizada por neovascularización de médula ósea, tal como síndromes mielodisplásicos de leucemia o mieloma múltiple, por ejemplo LMA.

Un agente citotóxico preferido incluye un agente citotóxico potente de estructura química relativamente sencilla para facilitar la fabricación. Se prefiere el uso de agentes citotóxicos potentes debido a la diferencia en el peso molecular entre anticuerpos y agentes citotóxicos (Carter *et al.*, 2008). Un agente citotóxico potente puede ser un agente citotóxico que puede eliminar células tumorales a concentraciones sub-nanomolares. Los agentes citotóxicos adecuados que pueden conjugarse con un anticuerpo para su uso en la presente invención incluyen dolastatinas,

25 vinblastinas, epotilonas, tubulisininas, y derivados y análogos de las mismas.

Las dolastatinas son una familia de péptidos antiproliferativos que inhiben el crecimiento y la reproducción de células diana e inducen apoptosis en una variedad de tipos de células malignas. Las dolastatinas a modo de ejemplo incluyen dolastatina-10 y dolastatina-15, y sus derivados, que se ha demostrado que tienen actividad antiproliferativa particularmente fuerte (de Arruda *et al.*, 1995). Un derivado de dolastatina preferido es cemadotina que es un análogo de dolastatina-15. En realizaciones preferidas, el conjugado anticuerpo-dolastatina puede ser una proteína de fusión que comprende la dolastatina y el anticuerpo o un componente polipeptídico del mismo (por ejemplo, una

30 cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de cadena múltiple, tal como un Fab. Por tanto, por ejemplo, el resto de dolastatina puede fusionarse a un dominio VH o dominio VL del anticuerpo.

La vinblastina es un análogo químico de la vincristina que se usa en varios regímenes quimioterápicos incluyendo el tratamiento para el linfoma de Hodgkin. Se describen análogos potentes de vinblastina en Barnett *et al.* (1978) e incluyen monohidrazida de 4-desacetil-3-vinblastina.

Tanto la monohidrazida de 4-desacetil-3-vinblastina como la cemadotina actúan sobre los microtúbulos con un mecanismo de acción similar y pueden eliminar células endoteliales y células tumorales diana en el intervalo de concentración picomolar (de Arruda *et al.*, 1995; Barnett *et al.*, 1978; Reddy *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2007; y Leamon *et al.*, 2007).

Las epotilonas son una clase de moléculas citotóxicas que han demostrado tener actividad antitumoral. Las epotilonas a modo de ejemplo incluyen ixabepilona, epotilona B y epotilona D.

Las tubulisininas son otra familia de agentes antiproliferativos que son candidatos principales para el desarrollo de agentes anticancerosos. Las tubulisininas a modo de ejemplo incluyen tubulislina A y tubulislina D. Se describen derivados de tubulislina a modo de ejemplo en Neri *et al.* (2006), Sani *et al.* (2007) y Patterson *et al.* (2007).

En algunas realizaciones, el anticuerpo para su uso en la invención puede conjugarse con un agente citotóxico que comprende un grupo maleimido terminal. Los grupos maleimido pueden usarse para la conjugación de fármacos específica de sitio con residuos de cisteína reactivos únicos presentes en los anticuerpos descritos en el presente documento (Borsi *et al.*, 2002; Berndorff *et al.*, 2006). Lo más preferiblemente, está presente un ligador escindible entre el agente citotóxico y el resto maleimido.

Se ha demostrado previamente cómo la coagulación sanguínea intraluminal en neovasculatura tumoral, producida por la administración mediada por anticuerpos de factores procoagulantes tales como una versión truncada de factor tisular, puede conducir a una muerte de células tumorales rápida. Por tanto, en algunas realizaciones, puede conjugarse un anticuerpo para su uso en la invención con un factor procoagulante tal como una versión truncada de factor tisular. Tales conjugados se han descrito previamente en Nilsson *et al.* (2001).

También se ha demostrado previamente que anticuerpos de direccionamiento vascular son adecuados para depositar fotosensibilizadores alrededor de la neovasculatura de tumores *in vivo*, mediando así el daño de células endoteliales y la coagulación sanguínea intraluminal tras la irradiación, seguido por muerte de células tumorales (Birchler *et al.*, 1999; Fabbrini *et al.*, 2006). Específicamente, se ha demostrado que los fotosensibilizadores pueden generar eficazmente oxígeno singlete fuera de las células endoteliales y eliminar las células tumorales indirectamente. Antes de estos experimentos, se creía generalmente que era necesario que las células diana internalizaran los conjugados anticuerpo-fotosensibilizador con el fin de mediar un efecto tóxico tras la irradiación.

Por tanto, en algunas realizaciones, puede conjugarse un anticuerpo para su uso tal como se da a conocer con un fotosensibilizador. Se describen en detalle fotosensibilizadores a modo de ejemplo que pueden conjugarse con un anticuerpo para su uso en la presente invención en el documento WO01/62800 e incluyen cloruro de estaño (IV) e6 y derivados del mismo.

También se ha demostrado previamente que los anticuerpos conjugados con radionúclidos terapéuticos son eficaces en el tratamiento del cáncer (Tjink *et al.*, J Nucl Med. 47(7):1070-4, 2006). Por tanto, en algunas realizaciones, puede conjugarse un anticuerpo para su uso en la presente invención con un radionúclido terapéutico. Los radionúclidos terapéuticos a modo de ejemplo incluyen ^{131}I , ^{90}Y , ^{124}I , ^{211}At , ^{77}Br y ^{76}Br . Preferiblemente, el radionúclido terapéutico es ^{131}I o ^{90}Y .

La molécula bioactiva puede conectarse o unirse al resto de anticuerpo mediante cualquier medio covalente o no covalente. En realizaciones preferidas, la molécula bioactiva se conjuga con el anticuerpo mediante un ligador escindible, permitiendo de ese modo que se libere molécula bioactiva. Por ejemplo, el ligador puede permitir la liberación de la molécula bioactiva al interior de la matriz extracelular subendotelial presente en la médula ósea de un paciente que padece una enfermedad caracterizada por neovasculatura de médula ósea, permitiendo de ese modo que el fármaco difunda a la neovasculatura de médula ósea y, cuando la enfermedad es leucemia, potencialmente también a sus blastocitos próximos.

Los ligadores escindibles adecuados incluyen bases de Schiff, ligadores peptídicos escindibles por proteasas y ésteres estabilizados. Todos estos ligadores se conocen bien en la técnica. Se describen ligadores de bases de Schiff a modo de ejemplo, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5633351. Los ligadores escindibles preferidos muestran semividas de reacción en el intervalo de 5-20 horas.

Un anticuerpo o conjugado de anticuerpo para su uso en la presente invención puede administrarse a un individuo que lo necesita junto con un compuesto anticanceroso, por ejemplo un compuesto anti-leucemia.

Los compuestos anticancerosos son compuestos citotóxicos que inhiben el crecimiento, la división y/o la proliferación de células cancerosas. Los compuestos anticancerosos pueden tener, en algunas circunstancias, un efecto sobre células no cancerosas normales en un paciente. Un compuesto anticanceroso puede ser, por ejemplo, un compuesto adecuado para tratar la leucemia. Cuando el paciente es un paciente con leucemia mieloide aguda, el compuesto puede ser un compuesto adecuado para tratar la leucemia mieloide aguda.

En algunas realizaciones de la invención, el compuesto anticanceroso puede seleccionarse del grupo de: agentes alquilantes, antimetabolitos, terpenoides y alcaloides de plantas, inhibidores de topoisomerasa, antibióticos antitumorales, anticuerpos monoclonales y corticosteroides. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen ciclofosfamida, cisplatino, clorambucilo, carboplatino y oxaliplatino. Los ejemplos de antimetabolitos incluyen metotrexato, análogos de purina tales como cladribina, fludarabina, tioguanina y pentostatina, y análogos de pirimidina tales como citarabina, 5-fluorouracilo y floxuridina. Los ejemplos de terpenoides y alcaloides de plantas incluyen alcaloides de la vinca, tales como vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina; agentes quimioterápicos derivados de podofilotoxina tales como fosfato de etopósido y tenipósido-taxanos; y taxanos, que incluyen paclitaxel y docetaxel. Los ejemplos de inhibidores de topoisomerasa incluyen inhibidores de topoisomerasa de tipo I tales como camptotecinas e inhibidores de topoisomerasa de tipo II tales como amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido. Los ejemplos de antibióticos antitumorales incluyen antraciclinas, tales como doxorubicina y epirubicina, actinomicinas y bleomicina. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales incluyen rituximab, y los ejemplos de corticosteroides incluyen prednisona y prednisolona.

Los compuestos anticancerosos a modo de ejemplo adecuados para tratar la leucemia incluyen: antraciclinas, citarabina, vincristina, L-asparaginasa, ciclofosfamida, metotrexato y 6-mercaptopurina, clorambucilo, ciclofosfamida, corticosteroides, tales como prednisona y prednisolona, imatinib, cladribina, pentostatina, rituximab, clorambucilo y doxorubicina.

Los compuestos anticancerosos preferidos incluyen antraciclinas y citarabina. Estos compuestos anticancerosos son adecuados para tratar la LMA.

5 Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, puede administrarse un anticuerpo o conjugado de anticuerpo (por ejemplo un conjugado anticuerpo-citocina) a un individuo que lo necesita en combinación con quimioterapia o inmunoterapia basada en IgG. Por ejemplo, actualmente están investigándose los anticuerpos anti-CD33 para el tratamiento de la LMA en ensayos clínicos de fase IIb. Se describen anticuerpos anti-CD33 adecuados, por ejemplo en Feldman *et al.* (2003), Feldman *et al.* (2005) y Kobayashi *et al.* (2009). Además, también están investigándose los anticuerpos anti-CD123 basados en IgG en el tratamiento de la LMA (Jin *et al.*, 2009). Por tanto, en un ejemplo, la inmunoterapia basada en IgG puede implicar el tratamiento con un anticuerpo anti-CD33 o anti-CD123.

10 En algunas realizaciones, puede marcarse un anticuerpo para su uso en la invención con un marcador detectable o funcional. Los anticuerpos marcados con un marcador detectable pueden usarse para el diagnóstico *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, y/o para la terapia.

15 Un marcador detectable puede ser cualquier molécula que produzca o que pueda inducirse a producir una señal, incluyendo pero no limitándose a agentes que fluorescen, radiomarcadores, enzimas, agentes quimioluminiscentes o fotosensibilizadores. Por tanto, la unión puede detectarse y/o medirse detectando fluorescencia o luminiscencia, radioactividad, actividad enzimática o absorbancia de luz. Los marcadores detectables pueden unirse a anticuerpos para su uso en la invención usando química convencional conocida en la técnica.

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

25 La administración de un anticuerpo, conjugado de anticuerpo, compuesto anticanceroso y composiciones que comprenden una o más de estas moléculas es preferiblemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio en un paciente. Tal beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la tasa y el transcurso de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que va a tratarse. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos de familia y otros médicos.

30 La dosis precisa dependerá de varios factores, del tamaño y de la ubicación de la zona que va a tratarse, de la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo anticuerpo completo, fragmento o diacuerpo). Una dosis típica de anticuerpo, o conjugado de anticuerpo, estará en el intervalo de 0,5 mg a 100 g para aplicaciones sistémicas, y de 10 µg a 1 mg para aplicaciones locales. El anticuerpo, o resto de anticuerpo del conjugado, puede ser un scFv, SIP o anticuerpo completo. Cuando el anticuerpo o resto de anticuerpo es un anticuerpo completo, es preferiblemente el isotipo IgG, por ejemplo IgG1. Se trata de una dosis para un tratamiento individual de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños y lactantes, y también puede ajustarse para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Se conocen bien en la técnica las dosis y los regímenes apropiados para compuestos anticancerosos.

35 Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, de dos veces por semana, semanales o mensuales, según el criterio del médico.

40 Cuando un anticuerpo (o conjugado de anticuerpo) y un compuesto anticanceroso se administran a un paciente, pueden administrarse de manera secuencial o simultánea según cualquier régimen adecuado.

45 Un anticuerpo, conjugado de anticuerpo o compuesto anticanceroso puede administrarse a un individuo en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del compuesto activo. Cuando se administra a un paciente tanto un anticuerpo (o conjugado de anticuerpo) como un compuesto anticanceroso, estos pueden formularse en composiciones farmacéuticas independientes o, cuando sea apropiado, en la misma composición farmacéutica.

50 Los componentes adecuados incluyen un excipiente, portador, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o mediante inyección, por ejemplo intravenosa.

55 Además de los anticuerpos, hay otros tipos de elementos de unión que también son adecuados para su uso en la presente invención. Por tanto, en un ejemplo, puede usarse un elemento de unión distinto de anticuerpos en una realización de la presente invención en lugar de un anticuerpo. Elementos de unión distintos de anticuerpos adecuados para su uso en la presente invención pueden comprender un sitio de unión a antígeno, normalmente proporcionado por una o más CDR, por ejemplo un conjunto de CDR, en una estructura de soporte de proteínas

distintas de anticuerpos, tal como se describe en más detalle a continuación.

Terminología

5 *Anticuerpo*

Esto describe una inmunoglobulina ya esté producida de manera natural o parcial o completamente sintética. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión anticuerpo-antígeno. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión anticuerpo-antígeno incluyen, pero no se limitan a, moléculas tales como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb y Fd. Se han obtenido mediante ingeniería genética otras moléculas de anticuerpo diversas incluyendo uno o más sitios de unión anticuerpo-antígeno, incluyendo por ejemplo Fab₂, Fab₃, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos e inmunoproteínas pequeñas (SIP). Las moléculas de anticuerpo y los métodos para su construcción y uso se describen en Holliger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 2005.

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

Puesto que los anticuerpos pueden modificarse en diversas formas, debe interpretarse que el término "molécula de anticuerpo" abarca cualquier sustancia o elemento de unión que tenga un sitio de unión anticuerpo-antígeno con la especificidad y/o unión requerida al antígeno. Por tanto, este término abarca fragmentos y derivados de anticuerpo, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión anticuerpo-antígeno, ya sea natural o parcial o completamente sintético. Por tanto se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión anticuerpo-antígeno, o equivalente, fusionado a otro polipéptido (por ejemplo derivado de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo). La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y en una gran cantidad de bibliografía posterior.

Preferiblemente, las moléculas de anticuerpo usadas en la invención son moléculas de anticuerpo humanas o humanizadas.

Se ha demostrado que fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989); McCafferty *et al.* (1990) Nature, 348, 552-554; Holt *et al.* (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490), que consiste en un dominio VH o uno VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), donde un dominio VH y un dominio VL están unidos mediante un ligador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird *et al.*, Science, 242, 423-426, 1988; Huston *et al.*, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (viii) dímeros Fv de cadena sencilla biespecíficos (documento PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos mediante fusión génica (documento WO94/13804; Holliger, P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993). Las moléculas de Fv, scFv o diacuerpo pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter, Y. *et al.*, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996). Un Fv de cadena sencilla (scFv) puede estar comprendido dentro de una mini-inmunoglobulina o inmunoproteína pequeña (SIP), por ejemplo tal como se describe en (Li *et al.*, 1997). Una SIP puede comprender una molécula de scFv fusionada al dominio CH4 de la isoforma secretora de IgE humana, IgE-S2 ((ε_{S2}-CH4; Batista *et al.*, 1996) formando una molécula de anticuerpo de mini-inmunoglobulina homodimérica. Además, también pueden obtenerse minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (Hu, S. *et al.*, Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996). Otros ejemplos de fragmentos de unión son Fab', que difiere de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo, y Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el que el(los) residuo(s) de cisteína del dominio constante porta(n) un grupo tiol libre.

Qui *et al.*, Nat. Biotechnol. 25:921-929 (2007) describieron moléculas de anticuerpo que contenían sólo dos CDR unidas mediante una región de entramado. La CDR3 del dominio VH o VL se unió al bucle de CDR1 o CDR2 del otro dominio. La unión se realizó a través del extremo C-terminal de la CDR1 o CDR2 seleccionada al extremo N-terminal de la CDR3, a través de una región FR. Qui *et al.* seleccionaron la región FR que tenía la menor cantidad de parches hidrófobos. Se encontró que la mejor combinación para el anticuerpo sometido a prueba era CDR1 de VL unida mediante FR2 de VH a CDR3 de VH (CDR1 de VH-FR2 de VH-CDR3 de VL). A un peso molecular de aproximadamente 3 kDa, estas moléculas de anticuerpo ofrecen ventajas en lo que se refiere a penetración tisular mejorada en comparación con inmunoglobulinas completas (aproximadamente 150 kDa) o scFv (aproximadamente

28 kDa).

Los fragmentos de anticuerpo de la invención pueden obtenerse partiendo de una molécula de anticuerpo parental mediante métodos tales como digestión por enzimas por ejemplo, pepsina o papaína y/o mediante escisión de los puentes disulfuro por reducción química. De otro modo, los fragmentos de anticuerpo comprendidos en la presente invención pueden obtenerse mediante técnicas de recombinación genética, conocidas asimismo por el experto en la técnica o también mediante síntesis de péptidos por medio de, por ejemplo, sintetizadores de péptidos automáticos, tales como los suministrados por la empresa Applied Biosystems, etc., o mediante síntesis y expresión de ácidos nucleicos. Los fragmentos de anticuerpo funcionales según la presente invención incluyen cualquier fragmento funcional cuya semivida se aumente mediante una modificación química, especialmente mediante pegilación, o mediante la incorporación en un liposoma.

Un dAb (anticuerpo con un solo dominio) es un fragmento de unión a antígeno monomérico pequeño de un anticuerpo, concretamente la región variable de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo (Holt *et al.* (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490). Los dAb de VH se producen de manera natural en camélidos (por ejemplo camello, llama) y pueden producirse inmunizando un camélido con un antígeno diana, aislando las células B específicas de antígeno y clonando directamente genes de dAb procedentes de células B individuales. Los dAb también pueden producirse en cultivo celular. Su pequeño tamaño, buena solubilidad y estabilidad frente a la temperatura los hacen particularmente útiles desde el punto de vista fisiológico y adecuados para la selección y maduración de la afinidad. Se han desarrollado dAb de VH de camélidos para uso terapéutico con el nombre "nanobodies™". Una molécula de anticuerpo de la presente invención puede ser un dAb. La molécula de anticuerpo comprende un dominio VH o VL sustancialmente tal como se expone en el presente documento, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente tal como se expone en el presente documento.

Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales forman una segunda generación de anticuerpos monoclonales en los que se combinan dos regiones variables diferentes en la misma molécula (Holliger y Bohlen, Cancer and metastasis rev. 18: 411-419, 1999). Se ha demostrado su uso tanto en el campo diagnóstico como en el campo terapéutico a partir de su capacidad para reclutar nuevas funciones efectoras o para seleccionar como diana varias moléculas sobre la superficie de células tumorales. Cuando van a usarse anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden fabricarse en una diversidad de formas (Holliger, P. y Winter G. Current Opinion Biotechnol 4, 446-449, 1993), por ejemplo pueden prepararse químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecífico mencionados anteriormente. Estos anticuerpos pueden obtenerse mediante métodos químicos (Glennie M J *et al.*, 1987 J. Immunol. 139, 2367-2375; Repp R. *et al.*, 1995 J. Hemat. 377-382) o métodos somáticos (Staerz U. D. y Bevan M. J. 1986 PNAS 83; Suresh M. R. *et al.*, 1986 Method Enzymol. 121: 210-228) pero también y preferiblemente mediante técnicas de ingeniería genética que permiten que se fuerce la heterodimerización y por tanto facilitan el procedimiento de purificación del anticuerpo buscado (Merchand *et al.*, 1998 Nature Biotech. 16:677-681). Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen los de la tecnología BiTE™ en la que pueden usarse los dominios de unión de dos anticuerpos con especificidad diferente y unirse directamente a través de péptidos flexibles cortos. Esto combina dos anticuerpos en una sola cadena polipeptídica corta. Pueden construirse diacuerpos y scFv sin una región Fc usando sólo dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de una reacción antiidiotípica.

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

Los diacuerpos biespecíficos, al contrario que los anticuerpos completos biespecíficos, también pueden ser particularmente útiles porque pueden construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Pueden seleccionarse fácilmente diacuerpos (y cualquier otro polipéptido, tal como fragmentos de anticuerpo) con especificidades de unión apropiadas usando presentación en fagos (documento WO94/13804) a partir de bibliotecas. Si va a mantenerse constante un brazo del diacuerpo, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el antígeno de la neovascularización tumoral, entonces puede obtenerse una biblioteca donde se varía el otro brazo y se selecciona un anticuerpo de especificidad apropiada. Los anticuerpos completos biespecíficos pueden obtenerse mediante métodos de ingeniería genética alternativos tal como se describe en Ridgeway *et al.*, 1996 (Ridgeway, J. B. B. *et al.*, Protein Eng., 9, 616-621, 1996).

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

En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible hacer referencia a técnicas que se describen en particular en el manual "Antibodies" (Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) o a la técnica de preparación de hibridomas descrita por Köhler y Milstein (Köhler y Milstein, Nature, 256:495-497, 1975).

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales, por ejemplo, a partir de una célula animal inmunizada contra el

antígeno diana o uno de sus fragmentos que contienen el epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales. En el presente documento se describen fragmentos y péptidos o polipéptidos adecuados que los comprenden, y pueden usarse para inmunizar animales para generar anticuerpos contra un antígeno diana. Dicho antígeno, o uno de sus fragmentos, puede producirse especialmente según los métodos de trabajo habituales, mediante recombinación genética partiendo de una secuencia de ácido nucleico contenida en la secuencia de ADNc que codifica para el antígeno o fragmento del mismo, mediante síntesis de péptidos partiendo de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia peptídica del antígeno y/o fragmento del mismo.

Los anticuerpos monoclonales pueden purificarse, por ejemplo, en una columna de afinidad en la que el antígeno o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales se ha inmovilizado previamente. Más particularmente, los anticuerpos monoclonales pueden purificarse mediante cromatografía en proteína A y/o G, seguido o no seguido por cromatografía de intercambio iónico dirigida a eliminar los contaminantes proteicos residuales así como el ADN y los LPS, por sí mismos, seguido o no seguido por cromatografía de exclusión en gel de Sepharose con el fin de eliminar posibles agregados debido a la presencia de dímeros o de otros multímeros. En una realización, puede usarse la totalidad de estas técnicas de manera simultánea o sucesiva.

Además de secuencias de anticuerpo y/o un sitio de unión a antígeno, un anticuerpo para su uso en la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo formando un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para conferir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad para unirse al antígeno. Los anticuerpos para su uso en la invención pueden portar un marcador detectable, o pueden conjugarse con una toxina o un resto de direccionamiento o enzima (por ejemplo, a través de un enlace peptídico o ligador). Por ejemplo, un anticuerpo puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático) así como un sitio de unión a antígeno, en el que el sitio de unión a antígeno se une al antígeno y por tanto selecciona como diana el sitio catalítico para el antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo mediante escisión.

Regiones determinantes de complementariedad

Las estructuras y ubicaciones de dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse haciendo referencia a Kabat 1987, y actualizaciones del mismo. Se dispone de varios recursos académicos y comerciales en línea para consultar esta base de datos. Por ejemplo, véase Martin (1996) y el recurso en línea asociado, actualmente en la dirección web de <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>.

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

Entre las seis secuencias de CDR cortas, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad debido esencialmente a los mecanismos de disposición de los genes que dan lugar a ella). Puede ser de tan solo 2 aminoácidos, aunque el tamaño más largo conocido es de 26. La longitud de la CDR también puede variar según la longitud que puede albergar la región de entramado subyacente particular. Desde el punto de vista funcional, HCDR3 desempeña un papel en parte de la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal 1974; Amit 1986; Chothia 1987; Chothia 1989; Caton 1990; Sharon 1990a; Sharon 1990b; Kabat *et al.*, 1991 b).

Dominio de unión a antígeno

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

El documento WO2006/072620 describe la obtención por ingeniería genética de sitios de unión a antígeno en bucles estructurales (distintos de CDR) que se extienden entre hebras beta de dominios de inmunoglobulina. Un sitio de unión a antígeno puede obtenerse mediante ingeniería genética en una región de una molécula de anticuerpo separada de la ubicación natural de las CDR, por ejemplo en una región de entramado de un dominio VH o VL, o en un dominio constante de anticuerpo por ejemplo CH1 y/o CH3. Un sitio de unión a antígeno obtenido mediante ingeniería genética en una región estructural puede ser adicional a, o estar en lugar de, un sitio de unión a antígeno formado por conjuntos de CDR de un dominio VH y VL. Cuando están presentes múltiples sitios de unión a antígeno en una molécula de anticuerpo, pueden unirse al mismo antígeno (antígeno diana), aumentando de ese modo la

valencia de la molécula de anticuerpo. Alternativamente, múltiples sitios de unión a antígeno pueden unirse a antígenos diferentes (el antígeno diana y uno o más de otro antígeno), y esto puede usarse para añadir funciones efectoras, prolongar la semivida o mejorar la administración *in vivo* de la molécula de anticuerpo.

5 *Específico*

Esto puede usarse para hacer referencia a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su(s) pareja(s) de unión específica(s). Por ejemplo, un anticuerpo específico para la isoforma con EDA de fibronectina puede mostrar poca o ninguna unión a otras isoformas de fibronectina. Un anticuerpo específico para el dominio ED-A de fibronectina puede mostrar poca o ninguna unión a otros dominios de fibronectina.

El término también puede aplicarse cuando, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular que es portado por varios antígenos, en cuyo caso el elemento de unión específico que porta el dominio de unión a antígeno podrá unirse a los diversos antígenos que portan el epítipo.

Comprender

Esto se usa generalmente en el sentido de incluir, es decir, permitir la presencia de una o más características o componentes.

Por "sustancialmente tal como se expone" quiere decirse que la CDR o el dominio VH o VL relevante de la invención será o bien idéntico o altamente similar a las regiones especificadas cuya secuencia se expone en el presente documento. Por "altamente similar" se contempla que pueden realizarse desde 1 hasta 5, preferiblemente desde 1 hasta 4 tal como de 1 a 3, o 1 ó 2, o 3 ó 4, sustituciones en la CDR y/o el dominio VH y/o VL.

La estructura para llevar a cabo una CDR de la invención será generalmente la de la secuencia de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o parte sustancial de la misma en que se ubica la CDR en una ubicación correspondiente a la CDR de los dominios variables de anticuerpo VH y VL que se producen de manera natural codificados por los genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y las ubicaciones de las CDR y los dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse haciendo referencia a (Kabat, E.A. *et al*, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4.^a Edición. Departamento de salud y servicios humanos de los EE.UU., 1987, y actualizaciones del mismo, disponible ahora en Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu>)).

35 *Fibronectina*

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

La fibronectina se somete a corte y empalme alternativo, y se conocen varias isoformas alternativas de fibronectina. El dominio extra-A (EDA o ED-A) también se conoce como ED, repetición A de tipo III extra (EIIIA) o EDI. La secuencia de EDA humana se ha publicado por Kornblihtt *et al.* (1984), Nucleic Acids Res. 12, 5853-5868 y Paoletta *et al.* (1988), Nucleic Acids Res. 16, 3545-3557. La secuencia de ED-A humana (SEQ ID NO: 39) también está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1631-1720 (fibronectina tipo III 12; dominio extra 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de registro P02751. La secuencia de ED-A de ratón está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1721-1810 (fibronectina tipo III 13; dominio extra 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de registro P11276.

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

El ED-A es una secuencia de 90 aminoácidos que se inserta en la fibronectina (FN) mediante corte y empalme alternativo y se ubica entre los dominios 11 y 12 de FN (Borsi *et al.*, 1987, J. Cell Biol., 104, 595-600). El ED-A está ausente principalmente en la forma plasmática de FN pero es abundante durante la embriogénesis, remodelación tisular, fibrosis, trasplante cardíaco y crecimiento de tumores sólidos.

"Y/o", cuando se usa en el presente documento, ha de considerarse como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" ha de considerarse como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si se expone cada uno individualmente en el presente documento.

A menos que el contexto indique otra cosa, las descripciones y definiciones de las características expuestas anteriormente no se limitan a ningún aspecto o realización particular de la invención y se aplican por igual a todos los aspectos y realizaciones que se describen.

5

Ahora se mostrarán determinados aspectos y realizaciones de la invención a modo de ejemplo.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y B muestran los resultados de análisis inmunohistoquímicos de biopsias de médula ósea de un paciente con LMA, teñidas con el anticuerpo o bien F8-SIP (V5L/K18R) (F8) o bien 4A1-F16-SIP (F16), tal como se indica. El control negativo en cada caso es una biopsia de médula ósea del mismo paciente teñida sólo con complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina biotinilada. 4A1-F16-SIP tiñó fuertemente los vasos sanguíneos presentes en la biopsia de médula ósea. La tinción con F8-SIP (V5L/K18R) también fue visible, aunque el nivel de tinción fue más débil que el observado con 4A1-F16-SIP. No se observó tinción en el control negativo. El tamaño de la barra de escala mostrada en la figura 1A es de 100 μm .

15

Las figuras 2A y B muestran análisis inmunohistoquímicos de biopsias de médula ósea de dos pacientes con LMA extramedular, teñidas con el anticuerpo o bien F8-SIP (V5L/K18R) (F8) o bien 4A1-F16-SIP (F16), tal como se indica. El control negativo en cada caso es una biopsia de médula ósea del mismo paciente teñida sólo con complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina biotinilada. 4A1-F16-SIP tiñó fuertemente los vasos sanguíneos presentes en las biopsias de médula ósea. La tinción con F8-SIP (V5L/K18R) también fue visible y fue o bien similar o bien ligeramente más débil que el nivel de tinción observado con 4A1-F16-SIP. No se observó tinción en el control negativo.

20

La figura 3A muestra análisis inmunohistoquímicos de tumores HL-60 obtenidos de un modelo de ratón de leucemia humana teñidos con el anticuerpo o bien F8-SIP (V5L/K18R) (F8) o bien 4A1-F16-SIP (F16), tal como se indica. La figura 3B muestra análisis inmunohistoquímicos de biopsias de médula ósea obtenidas de los mismos ratones que en A y también teñidas con el anticuerpo o bien F8-SIP (V5L/K18R) (F8) o bien 4A1-F16-SIP (F16), tal como se indica. Ambos anticuerpos tiñeron fuertemente los vasos de los cortes de tumor HL-60, mientras que no fue visible tinción con ningún anticuerpo en los cortes de médula ósea sana. El tamaño de la barra de escala mostrada en las figuras 4 A y B es de 100 μm .

25

30

Experimentos

35

Los experimentos a continuación muestran que antígenos específicos, tales como tenascina-C y la isoforma con ED-A de fibronectina, se expresan en neovasculatura de médula ósea, por ejemplo la neovasculatura presente en la médula ósea de pacientes con leucemia, en particular aquellos con LMA.

40

Materiales y métodos

Anticuerpos

4A1-F16-SIP es una mini-inmunoglobulina monoclonal humana específica para el dominio A1 de tenascina-C. La secuencia del anticuerpo 4A1-F16-SIP se muestra en SEQ ID NO: 25.

45

F8-SIP (V5UK18R) es una mini-inmunoglobulina monoclonal humana específica para el dominio EDA de fibronectina sometido a corte y empalme alternativamente. La secuencia del anticuerpo F8-SIP (V5L/K18R) se muestra en SEQ ID NO: 26.

50

Biopsias de médula ósea

Se realizaron análisis de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en biopsias recién congeladas de médula ósea de pacientes con leucemia mieloide aguda.

55

Inmunohistoquímica

Para la inmunohistoquímica, se usaron anticuerpos biotinilados en formato de inmunoproteína pequeña (SIP) en condiciones idénticas (2 $\mu\text{g/ml}$). Se prepararon alícuotas de un solo lote de anticuerpos, se congelaron y se usaron sólo una vez para garantizar la reproducibilidad de las tinciones inmunohistoquímicas. Las muestras de tejido congelado se almacenaron a -80°C . Se fijaron cortes de 10 μm de grosor en acetona helada, se rehidrataron en tampón TBS (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, aprotinina al 0,001%, pH 7,4) y se bloquearon con suero bovino fetal al 20% en TBS. Se añadieron los anticuerpos sobre los cortes en una concentración final de 2 $\mu\text{g/ml}$ en disolución al 3% de albúmina sérica bovina (BSA)/TBS y se incubaron durante una hora. Tras lavar en TBS, se detectaron los anticuerpos unidos con complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina biotinilada (Biospa, Milán, Italia) en TBS-BSA al

60

65

3% + MgCl₂ 2 mM. Se usó el sustrato Fast Red (Sigma) para la detección de la actividad fosfatasa. Se contratiñeron los cortes con hematoxilina de Gill n.º 2 (Sigma) y se montaron con medio de montaje Glycergel (Dako, Glostrup, Dinamarca).

5 *Estudios de inmunofluorescencia multicolor*

Se usaron anticuerpos biotinilados en un formato de inmunoproteína pequeña (SIP) en condiciones idénticas (2 µg/ml). Se prepararon alícuotas a partir de un solo lote de anticuerpos, se congelaron y se usaron sólo una vez para garantizar la reproducibilidad de las tinciones inmunohistoquímicas.

10 Se fijaron cortes de 10 µm de grosor en acetona helada y se bloquearon con suero bovino fetal al 20% en PBS. Se añadieron F8-SIP (V5L/K18R) y 4A1-F16-SIP biotinilados sobre los cortes en una concentración final de 2 µg/ml en disolución al 3% de albúmina sérica bovina (BSA)/PBS y se incubaron durante una hora. Se usó anticuerpo de ratón anti-vWF (factor de von Willebrandt factor) humano para perfilar las células endoteliales. Tras lavar en PBS, se detectaron anticuerpos primarios unidos con estreptavidina-Alexa Fluor 488 y se usaron anticuerpos anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 594 (Invitrogen) como anticuerpos secundarios. Se contratiñeron los núcleos con DAPI y se capturaron las imágenes en un microscopio Axioskop 2 Mot plus equipado con una cámara AxioCam MRc (Zeiss).

20 Modelo de ratón de leucemia humana

El modelo de ratón para leucemia humana usado en este caso se describió previamente en Potter *et al.* (1984). Específicamente, se sometieron a xenoinjerto ratones atímicos con células de la línea celular de leucemia HL-60 y, tras el desarrollo de tumores HL-60 (sarcomas granulocíticos), se obtuvieron muestras tanto de dichos tumores como de la médula ósea de los ratones. Entonces se realizaron estudios de inmunohistoquímica tal como se describe en "inmunohistoquímica" anteriormente.

Resultados

30 El análisis de inmunohistoquímica mostró que el anticuerpo 4A1-F16-SIP podía teñir la inmensa mayoría de los vasos sanguíneos en la médula ósea de pacientes con LMA. El anticuerpo F8-SIP (V5L/K18R) también tiñó una gran proporción de estos vasos sanguíneos pero menos de los observados con el anticuerpo 4A1-F16-SIP. Estos resultados se muestran en las figuras 1A y B.

35 Se obtuvieron resultados similares cuando se sometieron biopsias de médula ósea de dos pacientes con LMA extramedular a análisis de inmunohistoquímica. El anticuerpo 4A1-F16-SIP tiñó fuertemente los vasos sanguíneos presentes en las biopsias de médula ósea en ambos casos. El nivel de tinción observado con el anticuerpo F8-SIP (V5L/K18R) fue similar al observado usando el anticuerpo 4A1-F16-SIP en una biopsia (figura 2B) pero más débil en el otro (figura 2A).

40 Las diferencias en el nivel de tinción observado con los anticuerpos F8-SIP (V5L/K18R) y 4A1-F16-SIP puede deberse a diferencias en el nivel de expresión del dominio A1 de tenascina-C en relación con la isoforma con ED-A de fibronectina en los vasos sanguíneos de médula ósea de pacientes con LMA.

45 Estudios de inmunofluorescencia multicolor de zonas de médula ósea de pacientes con LMA con altas densidades de blastocitos mostraron adicionalmente una co-ubicación excelente del anticuerpo 4A1-F16-SIP con anticuerpos específicos para el factor de von Willebrand (vWF).

50 Los anticuerpos 4A1-F16 SIP y F8-SIP (V5L/K18R) también tiñeron cortes de tumores HL-60 obtenidos de un modelo de ratón de leucemia humana. Específicamente, ambos anticuerpos tiñeron fuertemente los vasos presentes en los cortes de tumor HL-60 (sarcoma granulocítico), mientras que no fue visible ninguna tinción en los cortes de médula ósea sana obtenidos de los mismos ratones (figura 3).

55 Estos resultados muestran por primera vez que existen antígenos que se expresan de manera diferencial en la neovasculatura de médula ósea, en particular, la neovasculatura de médula ósea de pacientes con leucemia, en comparación con tejidos normales. Los resultados también muestran que los mismos antígenos también se expresan de manera diferencial en la neovasculatura de tumores formados por células leucémicas, tales como sarcomas granulocíticos, en comparación con tejidos normales. Por tanto, estos antígenos representan dianas atractivas para el desarrollo de estrategias de administración farmacológica selectivas y eficaces en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por neovasculatura de médula ósea, tales como leucemia. En particular, como los agentes administrados por vía sistémica tienen a menudo un acceso más fácil a las dianas presentes en la vasculatura desde el torrente circulatorio, se supera el problema del acceso y se permite una administración eficaz del compuesto al sitio de enfermedad.

65 Por ejemplo, los antígenos expresados en neovasculatura de médula ósea, tal como la neovasculatura de médula ósea de pacientes con leucemia, pueden seleccionarse como diana usando anticuerpos que pueden unirse a dichos antígenos. Conjugando agentes bioactivos con dichos anticuerpos, los agentes bioactivos pueden administrarse

directamente a la neovasculatura de médula ósea. La selección como diana selectiva del agente bioactivo al sitio de enfermedad dará como resultado en última instancia un aumento de la concentración local en su sitio de acción, reduciendo o eliminando así la exposición de tejidos normales a cualquier efecto tóxico del agente bioactivo usado. Una administración dirigida puede mejorar el índice terapéutico del agente bioactivo administrado proporcionando una mayor eficacia con efectos secundarios minimizados. Además, el perfil de toxicidad favorable de agentes terapéuticos específicos de sitio puede abrir nuevas vías en la terapia de enfermedades caracterizadas por neovasculatura de médula ósea, tales como leucemia, permitiendo la administración sistémica de agentes altamente potentes y prometedores, que actualmente o bien se administran a dosis subóptimas o cuya aplicación clínica se ha impedido hasta la fecha por toxicidades inaceptables cuando se aplican en forma no modificada.

Secuencias – Anticuerpo 4A1-F16

SEQ ID NO: 1. secuencia de nucleótidos del dominio VH de 4A1-F16

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

SEQ ID NO: 2 secuencia de aminoácidos del dominio VH de 4A1-F16

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYGMSWVRQA PGKGLEWWSA
 ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKAH
 NAFDYWGQGT LVTVSR

SEQ ID NO: 3 secuencia de nucleótidos del dominio VL de 4A1-F16

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

SEQ ID NO: 4 secuencia de aminoácidos del dominio VL de 4A1-F16

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDR
 FSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCNSSVYTMPVVFVGGGKLTVL

SEQ ID NO: 5 secuencia de aminoácidos de CDR1 de VH de 4A1-F16

RYGMS

SEQ ID NO: 6 secuencia de aminoácidos de CDR2 de VH de 4A1-F16

AISGSGGSTYYADSVKKG

ES 2 640 981 T3

SEQ ID NO: 7 secuencia de aminoácidos de CDR3 de VH de 4A1-F16

AHNAFDY

5 SEQ ID NO: 8 secuencia de aminoácidos de CDR1 de VL de 4A1-F16

QGDSLRSYYAS

SEQ ID NO: 9 secuencia de aminoácidos de CDR2 de VL de 4A1-F16

10 GKNNRPS

SEQ ID NO: 10 secuencia de aminoácidos de CDR3 de VL de 4A1-F16

15 NSSVYTMPPW

SEQ ID NO: 11 secuencia de aminoácidos del ligador peptídico de los dominios VH y VL de 4A1-F16

GGGSGGGSGG

20 Secuencias – Anticuerpo F8 (V5L/K18R)

SEQ ID NO: 12 secuencia de nucleótidos del dominio VH de F8 (V5L)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCCTGTTTACGATGAGCTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCAC
ATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC
25 ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGC

SEQ ID NO: 13 secuencia de aminoácidos del dominio VH de F8 (V5L)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWQQGLTVSS

30 SEQ ID NO: 14 secuencia de nucleótidos del dominio VL de F8 (K18R)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCA
CCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCATGCCGTTTTTAGCCTGGTACCAGCA
GAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGG
CATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
AGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGATGCGTGGTCCGGCCGC
CGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA

35 SEQ ID NO: 15 secuencia de aminoácidos del dominio VL de F8 (K18R)

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD
RFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIK

40 SEQ ID NO: 16 secuencia de aminoácidos de CDR1 de VH de F8 (V5L)

LFT

SEQ ID NO: 17 secuencia de aminoácidos de CDR2 de VH de F8 (V5L)

SGSGGS

SEQ ID NO: 18 secuencia de aminoácidos de CDR3 de VH de F8 (V5L)

5

STHLYL

SEQ ID NO: 19 secuencia de aminoácidos de CDR1 de VL de F8 (K18R)

10

MPF

SEQ ID NO: 20 secuencia de aminoácidos de CDR2 de VL de F8 (K18R)

15

GASSRAT

SEQ ID NO: 21 secuencia de aminoácidos de CDR3 de VL de F8 (K18R)

MRGRPP

20

SEQ ID NO: 22 secuencia de aminoácidos del ligador peptídico de los dominios VH y VL de F8 (V5UK18R)

GGGSGGGSGGGG

25

SEQ ID NO: 23 secuencia de aminoácidos del ligador peptídico de los dominios VL y CH4 de 4A1-F16-SIP y F8-SIP (V5L/K18R)

SG

30

SEQ ID NO: 24 secuencia de aminoácidos del dominio de dimerización CH4 de 4A1-F16-SIP y F8-SIP (V5L/K18R)

GSGGPRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHNEVQLPDARHSTTQ
PRKTKGSGFFVFSRLEVTRAWEQKDEFICRAVHEAASPSQTVQRAVSVNPRESSRRGGC

SEQ ID NO: 25 secuencia de aminoácidos de 4A1-F16-SIP

35

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHNAFDYWGQGLVTVSRGGG
SGGSGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNR
PSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCNSSVYTMPPVFGGGTKLTVLSGGSGG
PRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHNEVQLPDARHSTTQPRKT
KGSGFFVFSRLEVTRAWEQKDEFICRAVHEAASPSQTVQRAVSVNPRESSRRGGC

SEQ ID NO: 26 secuencia de aminoácidos de F8-SIP (V5UK18R)

40

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGLVTVSSGG
GGSGGGSGGGGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRL
LIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGGQTKVEIKS
GGSGGPRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHNEVQLPDARHSTT
QPRKTKGSGFFVFSRLEVTRAWEQKDEFICRAVHEAASPSQTVQRAVSVNPRESSRRGGC

Secuencias - Interleucina 2

SEQ ID NO: 27 secuencia del precursor de hIL2 (hIL2 madura: residuos 7-150)

MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML
TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISININ VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT

SEQ ID NO: 28 secuencia del ligador de IL-2

5 GGGGSGGGGSGGGG

SEQ ID NO: 29 secuencia del ligador de IL-2

10 GGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 30 secuencia del ligador de IL-2

SSSSGSSSSGSSSSG

15 SEQ ID NO: 31 secuencia del ligador de IL-2

GSGSAGSGSAGSGSA

SEQ ID NO: 32 secuencia del ligador de IL-2

20 GGSAGGGGSGGGGSGG

Bibliografía

25 Amit *et al.* (1986), *Science*, 233:747-753.

Barnett, C.J., *et al.*, *J Med Chem*, 1978. 21(1): págs. 88-96.

30 Berndorff, D., *et al.*, *J Nucl Med*, 2006. 47(10): págs. 1707-16.

Birchler, M., *et al.*, *Nat Biotechnol*, 1999. 17(10): págs. 984-8.

Borsi *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 1987. 104, 595-600.

35 Borsi, L., *et al.*, *Int J Cancer*, 2002. 102(1): págs. 75-85.

Brack *et al.* *Clin Cancer Res*, 2006. 12(10): 3200-3208.

40 Carnemolla, B., *et al.*, *Blood*, 2002. 99(5): págs. 1659-65.

Carter, P.J. y P.D. Senter,. *Cancer J*, 2008. 14(3): págs. 154-69.

Caton *et al.* (1990), *J. Immunol.*, 144:1965-1968.

45 Chothia *et al.* (1987), *J. Mol. Biol.*, 196:901-917.

Chothia *et al.* (1989), *Nature*, 342:877- 883.

de Arruda, M., *et al.*, *Cancer Res*, 1995. 55(14): págs. 3085-92.

50 Fabbrini, M., *et al.*, *Int J Cancer*, 2006. 118(7): págs. 1805-13.

Feldman *et al.*, 2003, *Leukemia*, 17, 314-318.

55 Feldman *et al.*, 2005, *J Clin Oncol*, 23, 4110-4116.

Haan *et al.* (2004), *BioCentury*, 12(5): A1-A6.

Jin *et al.*, *Cell Stem cell*, 2 de julio de 2009;5(1):31-42.

60 Kabat *et al.* (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4.^a Edición. Departamento de salud y servicios humanos de los EE.UU.

Kabat *et al.* (1991 a), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Edición. Departamento de salud y servicios humanos de los EE.UU., Public Service, NIH, Washington.

- 5 Kabat *et al.* (1991 b), J. Immunol., 147:1709-1719.
Kobayashi *et al.*, Int. J Hematol, 2009, 89, 460-469.
- 10 Koide *et al.* (1998), Journal of Molecular Biology, 284: 1141-1151.
Leamon, C.P., *et al.*, Int J Cancer, 2007. 121(7): págs. 1585-92.
Marlind, *et al.*, Clin Cancer Res, 2008. 14(20): págs. 6515-24.
- 15 Martin, A.C.R. Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 25 (1996), 130-133
Menrad, A. y H.D. Menssen, 2005. 9(3): págs. 491-500.
- 20 Neri, D., G. Fossati, y M. Zanda, ChemMedChem, 2006. 1(2): págs. 175-80.
Nilsson, F., *et al.*, Cancer Res, 2001. 61(2): págs. 711-6.
Nygren *et al.* (1997), Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469.
- 25 Padro, T., *et al.*, Blood, 2000. 95(8): págs. 2637-44.
Paganelli G *et al.*, Eur J Nucl Med 21:314-321 1994
- 30 Patterson, A.W. *et al.*, Chemistry, 2007. 13(34): págs. 9534-41.
Potter *et al.*, Am J Pathol., 1984, 114, 360-366
- 35 Ray, A., *et al.*, Cancer Res, 2007. 67(8): págs. 3767-76.
Reardon DA *et al.* J Clin Oncol 20:1389-1397 2002
Reddy, J.A., *et al.*, Cancer Res, 2007. 67(9): págs. 4434-42.
- 40 Riva P *et al.* Int J Cancer; 51:7-13 1992
Riva P *et al.* Cancer Res 55:5952s-5956s 1995
- 45 Rybak, J.N., *et al.*, Nat Methods, 2005. 2(4): págs. 291-8.
Sani, M., *et al.*, Angew Chem Int Ed Engl, 2007. 46(19): págs. 3526-9.
Sharon *et al.* (1990a), PNAS, 87:4814-4817.
- 50 Sharon *et al.* (1990b), J. Immunol., 144:4863-4869.
Schliemann *et al.*, Blood, 2009. 113(10): págs. 2275-83.
Segal *et al.* (1974), PNAS, 71:4298-4302.
- 55 Villa A *et al.* Int. J. Cancer. 1 de junio de 2008;122(11):2405-13.
Wess In: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004

60 **Lista de secuencias**

- <110> Philogen SpA
Kaspar, Manuela
Schliemann, Christoph
65 Neri, Dario

ES 2 640 981 T3

<120> Selección como diana de neovasculatura de médula ósea

<130> HMK/FP6704019

5 <150> Documento US 61/231.564
<151> 05-08-2009

<160> 42

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 348

<212> ADN

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

gagggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc cggtatggta tgagctgggt ccgccagget 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagcgcac 300

aatgcttttg actactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tgtcgaga 348

20

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 2

ES 2 640 981 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Arg
 115

<210> 3

<211> 324

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 640 981 T3

tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
 acatgccaaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120
 caggccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
 ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcaactggggc tcaggcggaa 240
 gatgaggctg actattactg taactcctct gtttatacta tgccgcccgt ggtattcggc 300
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

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

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

10

ES 2 640 981 T3

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 5
<211> 5
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 5

Arg Tyr Gly Met Ser
1 5

10
<210> 6
<211> 17
<212> PRT
15 <213> *Homo sapiens*
<400> 6

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

20 Gly
<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
25 <400> 7

Ala His Asn Ala Phe Asp Tyr
1 5

30 <210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
35 <400> 8

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser

1 5 10

5 <210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser

10 **1 5**

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
15 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val Val

20 **1 5 10**

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del ligador peptídico de los dominios VH y VL de 4A1-F16

<400> 11

30 **Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly**

1 5 10

<210> 12
<211> 275
35 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagacte 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc ctgtttacga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

40 **ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggc 275**

<210> 13
<211> 118
<212> PRT
45 <213> *Homo sapiens*

ES 2 640 981 T3

<400> 13

5
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe
20 25 30

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10
 <210> 14
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

ES 2 640 981 T3

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgtttagc atgccgtttt tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagatgcgtg gtcggccgcc gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaa 324

5 <210> 15
<211> 108
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 15

<400> 17

Ser Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

5 <210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 18

Ser Thr His Leu Tyr Leu

1 5

15 <210> 19
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 19

Met Pro Phe

1

25 <210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

30 <210> 21
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 21

Met Arg Gly Arg Pro Pro

1 5

40 <210> 22
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del ligador peptídico de los dominios VH y VL de F8 (V5L/K18R)

50 <400> 22

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

1 5 10

55 <210> 23
 <211> 2

ES 2 640 981 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del ligador peptídico de los dominios VL y CH4 de 4A1-F16-SIP y F8-SIP (V5L/K18R)

<400> 23

Ser Gly

1

10

<210> 24
<211> 119
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio de dimerización CH4 de 4A1-F16-SIP y F8-SIP (V5L/K18R)

<400> 24

Gly Ser Gly Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr
1 5 10 15

Pro Glu Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile
20 25 30

Gln Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu
35 40 45

Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr
50 55 60

ES 2 640 981 T3

Lys Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala
 65 70 75 80

Glu Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala
 85 90 95

Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Glu
 100 105 110

Ser Ser Arg Arg Gly Gly Cys
 115

<210> 25
 <211> 355
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de 4A1-F16-SIP

10 <400> 25

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

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

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

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

ES 2 640 981 T3

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

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

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

Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser
 115 120 125

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

Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp
 145 150 155 160

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys
 165 170 175

Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
 180 185 190

Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu
 195 200 205

Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Val Tyr Thr Met Pro Pro Val Val
 210 215 220

ES 2 640 981 T3

<210> 26

<211> 361

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de F8-SIP (V5L/K18R)

10 <400> 26

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125

ES 2 640 981 T3

Gly Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 130 135 140

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

Val Ser Met Pro Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 180 185 190

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 195 200 205

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met
 210 215 220

Arg Gly Arg Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe
 245 250 255

Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys
 260 265 270

Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His
 275 280 285

ES 2 640 981 T3

Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg
290 295 300

Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr
305 310 315 320

Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His
325 330 335

Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn
340 345 350

Pro Glu Ser Ser Arg Arg Gly Gly Cys
355 360

<210> 27

<211> 153

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

5 <210> 28
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia del ligador de IL-2
 <400> 28

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

15 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia del ligador de IL-2
 <400> 29

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

1 5 10 15

5 <210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia del ligador de IL-2
 10 <400> 30

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

1 5 10 15

15 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Secuencia sintética: secuencia del ligador de IL-2
 <400> 31

Gly Ser Gly Ser Ala Gly Ser Gly Ser Ala Gly Ser Gly Ser Ala

1 5 10 15

25 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia del ligador de IL-2
 <400> 32

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

1 5 10 15

40 <210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Secuencia sintética: Motivo de ligador
 <400> 33

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

50 <210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Secuencia sintética: Motivo de ligador

<400> 34

Ser Ser Ser Ser Gly
1 5

5

<210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Secuencia sintética: Motivo de ligador

<400> 35

15

Gly Ser Gly Ser Ala
1 5

<210> 36
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia sintética: Motivo de ligador

25

<400> 36

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

30

<210> 37
 <211> 2201
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35

<400> 37

Met Gly Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val Phe Leu Ala Phe Leu
1 5 10 15

Ala Leu Ala Thr Glu Gly Gly Val Leu Lys Lys Val Ile Arg His Lys
20 25 30

ES 2 640 981 T3

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

Val Phe Asn His Val Tyr Asn Ile Lys Leu Pro Val Gly Ser Gln Cys
 50 55 60

Ser Val Asp Leu Glu Ser Ala Ser Gly Glu Lys Asp Leu Ala Pro Pro
 65 70 75 80

Ser Glu Pro Ser Glu Ser Phe Gln Glu His Thr Val Asp Gly Glu Asn
 85 90 95

Gln Ile Val Phe Thr His Arg Ile Asn Ile Pro Arg Arg Ala Cys Gly
 100 105 110

Cys Ala Ala Ala Pro Asp Val Lys Glu Leu Leu Ser Arg Leu Glu Glu
 115 120 125

Leu Glu Asn Leu Val Ser Ser Leu Arg Glu Gln Cys Thr Ala Gly Ala
 130 135 140

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

Cys Ser Gly Arg Gly Asn Phe Ser Thr Glu Gly Cys Gly Cys Val Cys
 165 170 175

Glu Pro Gly Trp Lys Gly Pro Asn Cys Ser Glu Pro Glu Cys Pro Gly
 180 185 190

ES 2 640 981 T3

Asn Cys His Leu Arg Gly Arg Cys Ile Asp Gly Gln Cys Ile Cys Asp
 195 200 205

Asp Gly Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Gln Leu Ala Cys Pro Ser Asp
 210 215 220

Cys Asn Asp Gln Gly Lys Cys Val Asn Gly Val Cys Ile Cys Phe Glu
 225 230 235 240

Gly Tyr Ala Gly Ala Asp Cys Ser Arg Glu Ile Cys Pro Val Pro Cys
 245 250 255

Ser Glu Glu His Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Cys Val Cys His Asp
 260 265 270

Gly Phe Ala Gly Asp Asp Cys Asn Lys Pro Leu Cys Leu Asn Asn Cys
 275 280 285

Tyr Asn Arg Gly Arg Cys Val Glu Asn Glu Cys Val Cys Asp Glu Gly
 290 295 300

Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Leu Ile Cys Pro Asn Asp Cys Phe
 305 310 315 320

Asp Arg Gly Arg Cys Ile Asn Gly Thr Cys Tyr Cys Glu Glu Gly Phe
 325 330 335

Thr Gly Glu Asp Cys Gly Lys Pro Thr Cys Pro His Ala Cys His Thr
 340 345 350

ES 2 640 981 T3

Gln Gly Arg Cys Glu Glu Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Ala
 355 360 365

Gly Leu Asp Cys Ser Glu Lys Arg Cys Pro Ala Asp Cys His Asn Arg
 370 375 380

Gly Arg Cys Val Asp Gly Arg Cys Glu Cys Asp Asp Gly Phe Thr Gly
 385 390 395 400

Ala Asp Cys Gly Glu Leu Lys Cys Pro Asn Gly Cys Ser Gly His Gly
 405 410 415

Arg Cys Val Asn Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Thr Gly Glu
 420 425 430

Asp Cys Ser Gln Leu Arg Cys Pro Asn Asp Cys His Ser Arg Gly Arg
 435 440 445

Cys Val Glu Gly Lys Cys Val Cys Glu Gln Gly Phe Lys Gly Tyr Asp
 450 455 460

Cys Ser Asp Met Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gln His Gly Arg Cys
 465 470 475 480

Val Asn Gly Met Cys Val Cys Asp Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Asp Cys
 485 490 495

Arg Asp Arg Gln Cys Pro Arg Asp Cys Ser Asn Arg Gly Leu Cys Val
 500 505 510

ES 2 640 981 T3

Asp Gly Gln Cys Val Cys Glu Asp Gly Phe Thr Gly Pro Asp Cys Ala
 515 520 525

Glu Leu Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asn
 530 535 540

Gly Gln Cys Val Cys His Glu Gly Phe Met Gly Lys Asp Cys Lys Glu
 545 550 555 560

Gln Arg Cys Pro Ser Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asp Gly
 565 570 575

Gln Cys Ile Cys His Glu Gly Phe Thr Gly Leu Asp Cys Gly Gln His
 580 585 590

Ser Cys Pro Ser Asp Cys Asn Asn Leu Gly Gln Cys Val Ser Gly Arg
 595 600 605

Cys Ile Cys Asn Glu Gly Tyr Ser Gly Glu Asp Cys Ser Glu Val Ser
 610 615 620

Pro Pro Lys Asp Leu Val Val Thr Glu Val Thr Glu Glu Thr Val Asn
 625 630 635 640

Leu Ala Trp Asp Asn Glu Met Arg Val Thr Glu Tyr Leu Val Val Tyr
 645 650 655

Thr Pro Thr His Glu Gly Gly Leu Glu Met Gln Phe Arg Val Pro Gly
 660 665 670

ES 2 640 981 T3

Asp Gln Thr Ser Thr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Pro Gly Val Glu Tyr
 675 680 685

Phe Ile Arg Val Phe Ala Ile Leu Glu Asn Lys Lys Ser Ile Pro Val
 690 695 700

Ser Ala Arg Val Ala Thr Tyr Leu Pro Ala Pro Glu Gly Leu Lys Phe
 705 710 715 720

Lys Ser Ile Lys Glu Thr Ser Val Glu Val Glu Trp Asp Pro Leu Asp
 725 730 735

Ile Ala Phe Glu Thr Trp Glu Ile Ile Phe Arg Asn Met Asn Lys Glu
 740 745 750

Asp Glu Gly Glu Ile Thr Lys Ser Leu Arg Arg Pro Glu Thr Ser Tyr
 755 760 765

Arg Gln Thr Gly Leu Ala Pro Gly Gln Glu Tyr Glu Ile Ser Leu His
 770 775 780

Ile Val Lys Asn Asn Thr Arg Gly Pro Gly Leu Lys Arg Val Thr Thr
 785 790 795 800

Thr Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp
 805 810 815

Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly
 820 825 830

ES 2 640 981 T3

Ile Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr
 835 840 845

Ile Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys
 850 855 860

Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met
 865 870 875 880

Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Leu Asp Ala Pro
 885 890 895

Arg Asn Leu Arg Arg Val Ser Gln Thr Asp Asn Ser Ile Thr Leu Glu
 900 905 910

Trp Arg Asn Gly Lys Ala Ala Ile Asp Ser Tyr Arg Ile Lys Tyr Ala
 915 920 925

Pro Ile Ser Gly Gly Asp His Ala Glu Val Asp Val Pro Lys Ser Gln
 930 935 940

Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Leu Thr Gly Leu Arg Pro Gly Thr Glu
 945 950 955 960

Tyr Gly Ile Gly Val Ser Ala Val Lys Glu Asp Lys Glu Ser Asn Pro
 965 970 975

Ala Thr Ile Asn Ala Ala Thr Glu Leu Asp Thr Pro Lys Asp Leu Gln
 980 985 990

ES 2 640 981 T3

Val Ser Glu Thr Ala Glu Thr Ser Leu Thr Leu Leu Trp Lys Thr Pro
 995 1000 1005

Leu Ala Lys Phe Asp Arg Tyr Arg Leu Asn Tyr Ser Leu Pro Thr
 1010 1015 1020

Gly Gln Trp Val Gly Val Gln Leu Pro Arg Asn Thr Thr Ser Tyr
 1025 1030 1035

Val Leu Arg Gly Leu Glu Pro Gly Gln Glu Tyr Asn Val Leu Leu
 1040 1045 1050

Thr Ala Glu Lys Gly Arg His Lys Ser Lys Pro Ala Arg Val Lys
 1055 1060 1065

Ala Ser Thr Glu Gln Ala Pro Glu Leu Glu Asn Leu Thr Val Thr
 1070 1075 1080

Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr Ala Ala Asp
 1085 1090 1095

Gln Ala Tyr Glu His Phe Ile Ile Gln Val Gln Glu Ala Asn Lys
 1100 1105 1110

Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu Arg Ala
 1115 1120 1125

Val Asp Ile Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr Pro Tyr Thr Val Ser
 1130 1135 1140

ES 2 640 981 T3

Ile Tyr Gly Val Ile Gln Gly Tyr Arg Thr Pro Val Leu Ser Ala
 1145 1150 1155

Glu Ala Ser Thr Gly Glu Thr Pro Asn Leu Gly Glu Val Val Val
 1160 1165 1170

Ala Glu Val Gly Trp Asp Ala Leu Lys Leu Asn Trp Thr Ala Pro
 1175 1180 1185

Glu Gly Ala Tyr Glu Tyr Phe Phe Ile Gln Val Gln Glu Ala Asp
 1190 1195 1200

Thr Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Val Pro Gly Gly Leu Arg
 1205 1210 1215

Ser Thr Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr His Tyr Thr Ile
 1220 1225 1230

Thr Ile Arg Gly Val Thr Gln Asp Phe Ser Thr Thr Pro Leu Ser
 1235 1240 1245

Val Glu Val Leu Thr Glu Glu Val Pro Asp Met Gly Asn Leu Thr
 1250 1255 1260

Val Thr Glu Val Ser Trp Asp Ala Leu Arg Leu Asn Trp Thr Thr
 1265 1270 1275

Pro Asp Gly Thr Tyr Asp Gln Phe Thr Ile Gln Val Gln Glu Ala
 1280 1285 1290

ES 2 640 981 T3

Asp Gln Val Glu Glu Ala His Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu
 1295 1300 1305

Arg Ser Met Glu Ile Pro Gly Leu Arg Ala Gly Thr Pro Tyr Thr
 1310 1315 1320

Val Thr Leu His Gly Glu Val Arg Gly His Ser Thr Arg Pro Leu
 1325 1330 1335

Ala Val Glu Val Val Thr Glu Asp Leu Pro Gln Leu Gly Asp Leu
 1340 1345 1350

Ala Val Ser Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr
 1355 1360 1365

Ala Ala Asp Asn Ala Tyr Glu His Phe Val Ile Gln Val Gln Glu
 1370 1375 1380

Val Asn Lys Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Leu Pro Gly Ser
 1385 1390 1395

Leu Arg Ala Val Asp Ile Pro Gly Leu Glu Ala Ala Thr Pro Tyr
 1400 1405 1410

Arg Val Ser Ile Tyr Gly Val Ile Arg Gly Tyr Arg Thr Pro Val
 1415 1420 1425

Leu Ser Ala Glu Ala Ser Thr Ala Lys Glu Pro Glu Ile Gly Asn
 1430 1435 1440

ES 2 640 981 T3

Leu Asn Val Ser Asp Ile Thr Pro Glu Ser Phe Asn Leu Ser Trp
 1445 1450 1455

Met Ala Thr Asp Gly Ile Phe Glu Thr Phe Thr Ile Glu Ile Ile
 1460 1465 1470

Asp Ser Asn Arg Leu Leu Glu Thr Val Glu Tyr Asn Ile Ser Gly
 1475 1480 1485

Ala Glu Arg Thr Ala His Ile Ser Gly Leu Pro Pro Ser Thr Asp
 1490 1495 1500

Phe Ile Val Tyr Leu Ser Gly Leu Ala Pro Ser Ile Arg Thr Lys
 1505 1510 1515

Thr Ile Ser Ala Thr Ala Thr Thr Glu Ala Leu Pro Leu Leu Glu
 1520 1525 1530

Asn Leu Thr Ile Ser Asp Ile Asn Pro Tyr Gly Phe Thr Val Ser
 1535 1540 1545

Trp Met Ala Ser Glu Asn Ala Phe Asp Ser Phe Leu Val Thr Val
 1550 1555 1560

Val Asp Ser Gly Lys Leu Leu Asp Pro Gln Glu Phe Thr Leu Ser
 1565 1570 1575

Gly Thr Gln Arg Lys Leu Glu Leu Arg Gly Leu Ile Thr Gly Ile
 1580 1585 1590

ES 2 640 981 T3

Gly Tyr Glu Val Met Val Ser Gly Phe Thr Gln Gly His Gln Thr
 1595 1600 1605

Lys Pro Leu Arg Ala Glu Ile Val Thr Glu Ala Glu Pro Glu Val
 1610 1615 1620

Asp Asn Leu Leu Val Ser Asp Ala Thr Pro Asp Gly Phe Arg Leu
 1625 1630 1635

Ser Trp Thr Ala Asp Glu Gly Val Phe Asp Asn Phe Val Leu Lys
 1640 1645 1650

Ile Arg Asp Thr Lys Lys Gln Ser Glu Pro Leu Glu Ile Thr Leu
 1655 1660 1665

Leu Ala Pro Glu Arg Thr Arg Asp Leu Thr Gly Leu Arg Glu Ala
 1670 1675 1680

Thr Glu Tyr Glu Ile Glu Leu Tyr Gly Ile Ser Lys Gly Arg Arg
 1685 1690 1695

Ser Gln Thr Val Ser Ala Ile Ala Thr Thr Ala Met Gly Ser Pro
 1700 1705 1710

Lys Glu Val Ile Phe Ser Asp Ile Thr Glu Asn Ser Ala Thr Val
 1715 1720 1725

Ser Trp Arg Ala Pro Thr Ala Gln Val Glu Ser Phe Arg Ile Thr
 1730 1735 1740

ES 2 640 981 T3

Tyr Val Pro Ile Thr Gly Gly Thr Pro Ser Met Val Thr Val Asp
 1745 1750 1755

Gly Thr Lys Thr Gln Thr Arg Leu Val Lys Leu Ile Pro Gly Val
 1760 1765 1770

Glu Tyr Leu Val Ser Ile Ile Ala Met Lys Gly Phe Glu Glu Ser
 1775 1780 1785

Glu Pro Val Ser Gly Ser Phe Thr Thr Ala Leu Asp Gly Pro Ser
 1790 1795 1800

Gly Leu Val Thr Ala Asn Ile Thr Asp Ser Glu Ala Leu Ala Arg
 1805 1810 1815

Trp Gln Pro Ala Ile Ala Thr Val Asp Ser Tyr Val Ile Ser Tyr
 1820 1825 1830

Thr Gly Glu Lys Val Pro Glu Ile Thr Arg Thr Val Ser Gly Asn
 1835 1840 1845

Thr Val Glu Tyr Ala Leu Thr Asp Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr
 1850 1855 1860

Thr Leu Arg Ile Phe Ala Glu Lys Gly Pro Gln Lys Ser Ser Thr
 1865 1870 1875

Ile Thr Ala Lys Phe Thr Thr Asp Leu Asp Ser Pro Arg Asp Leu
 1880 1885 1890

ES 2 640 981 T3

Thr Ala Thr Glu Val Gln Ser Glu Thr Ala Leu Leu Thr Trp Arg
 1895 1900 1905

Pro Pro Arg Ala Ser Val Thr Gly Tyr Leu Leu Val Tyr Glu Ser
 1910 1915 1920

Val Asp Gly Thr Val Lys Glu Val Ile Val Gly Pro Asp Thr Thr
 1925 1930 1935

Ser Tyr Ser Leu Ala Asp Leu Ser Pro Ser Thr His Tyr Thr Ala
 1940 1945 1950

Lys Ile Gln Ala Leu Asn Gly Pro Leu Arg Ser Asn Met Ile Gln
 1955 1960 1965

Thr Ile Phe Thr Thr Ile Gly Leu Leu Tyr Pro Phe Pro Lys Asp
 1970 1975 1980

Cys Ser Gln Ala Met Leu Asn Gly Asp Thr Thr Ser Gly Leu Tyr
 1985 1990 1995

Thr Ile Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Ala Gln Ala Leu Glu Val Phe
 2000 2005 2010

Cys Asp Met Thr Ser Asp Gly Gly Gly Trp Ile Val Phe Leu Arg
 2015 2020 2025

Arg Lys Asn Gly Arg Glu Asn Phe Tyr Gln Asn Trp Lys Ala Tyr
 2030 2035 2040

ES 2 640 981 T3

Ala Ala Gly Phe Gly Asp Arg Arg Glu Glu Phe Trp Leu Gly Leu
 2045 2050 2055

Asp Asn Leu Asn Lys Ile Thr Ala Gln Gly Gln Tyr Glu Leu Arg
 2060 2065 2070

Val Asp Leu Arg Asp His Gly Glu Thr Ala Phe Ala Val Tyr Asp
 2075 2080 2085

Lys Phe Ser Val Gly Asp Ala Lys Thr Arg Tyr Lys Leu Lys Val
 2090 2095 2100

Glu Gly Tyr Ser Gly Thr Ala Gly Asp Ser Met Ala Tyr His Asn
 2105 2110 2115

Gly Arg Ser Phe Ser Thr Phe Asp Lys Asp Thr Asp Ser Ala Ile
 2120 2125 2130

Thr Asn Cys Ala Leu Ser Tyr Lys Gly Ala Phe Trp Tyr Arg Asn
 2135 2140 2145

Cys His Arg Val Asn Leu Met Gly Arg Tyr Gly Asp Asn Asn His
 2150 2155 2160

Ser Gln Gly Val Asn Trp Phe His Trp Lys Gly His Glu His Ser
 2165 2170 2175

Ile Gln Phe Ala Glu Met Lys Leu Arg Pro Ser Asn Phe Arg Asn
 2180 2185 2190

ES 2 640 981 T3

Leu Glu Gly Arg Arg Lys Arg Ala
 2195 2200

5 <210> 38
 <211> 7560
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

accggccaca gcctgcctac tgtcaccgcg ctctcccgcg cgcagatata cgccccgcg 60
 tccgtgggca caaaggcagc gctgctgggg aactcggggg aacgcgcacg tgggaaccgc 120
 cgcagctcca cactccaggt acttcttcca aggacctagg tctctcgccc atcggaaaga 180
 aaataattct ttcaagaaga tcagggacaa ctgatttgaa gtctactctg tgcttctaaa 240
 tccccaatc tgctgaaagt gaatccctag agccctagag cccagcagc acccagccaa 300
 acccacctcc accatggggg ccatgactca gctgttgcca ggtgtctttc ttgctttcct 360
 tgcctcgcct accgaagggt gggctctcaa gaaagtcac cggcacaagc gacagagtgg 420
 ggtgaacgcc accctgccag aagagaacca gccagtggtg ttaaccacg ttacaacat 480
 caagctgcca gtgggatccc agtggttcggt ggatctggag tcagccagtg gggagaaaga 540
 cctggcaccg ccttcagagc ccagcgaaag ctttcaggag cacacagtag atggggaaaa 600
 ccagattgtc ttcacacatc gcatcaacat cccccgccg gcctgtggct gtgccgcagc 660
 ccctgatggt aaggagctgc tgagcagact ggaggagctg gagaacctgg tgtcttcct 720
 gagggagcaa tgtactgcag gagcaggctg ctgtctccag cctgccacag gccgcttgg 780
 caccaggccc ttctgtagcg gtcggggcaa cttcagcact gaaggatgtg gctgtgtctg 840
 cgaacctggc tggaaaggcc ccaactgctc tgagcccgaa tgtccaggca actgtcacct 900
 10 tcgaggccgg tgcattgatg ggcagtgcac ctgtgacgac ggcttcacgg gcgaggactg 960

ES 2 640 981 T3

cagccagctg gcttgcccca gcgactgcaa tgaccagggc aagtgcgtga atggagtctg 1020
 catctgtttc gaaggctacg ccggggctga ctgcagccgt gaaatctgcc cagtgccttg 1080
 cagtgaggag cacggcacat gtgtagatgg cttgtgtgtg tgccacgatg gctttgcagg 1140
 cgatgactgc aacaagcctc tgtgtctcaa caattgctac aaccgtggac gatgcgtgga 1200
 gaatgagtgc gtgtgtgatg agggtttcac gggcgaagac tgcagtgagc tcatctgccc 1260
 caatgactgc ttcgaccggg gccgctgcat caatggcacc tgctactgcg aagaaggctt 1320
 cacaggtgaa gactgcggga aaccacctg cccacatgcc tgccacaccc agggccggtg 1380
 tgaggagggg cagtgtgtat gtgatgaggg ctttgccggt ttggactgca gcgagaagag 1440
 gtgtcctgct gactgtcaca atcgtggccg ctgtgtagac gggcgggtgtg agtgtgatga 1500
 tggtttcact ggagctgact gtggggagct caagtgtccc aatggctgca gtggccatgg 1560
 ccgctgtgtc aatgggcagt gtgtgtgtga tgagggctat actggggagg actgcagcca 1620
 gctacgggtgc cccaatgact gtcacagtcg gggccgctgt gtcgagggca aatgtgtatg 1680
 tgagcaaggc ttcaagggt atgactgcag tgacatgagc tgccctaata actgtcacca 1740
 gcacggccgc tgtgtgaatg gcatgtgtgt ttgtgatgac ggctacacag ggggaagactg 1800
 ccgggatcgc caatgcccc aaggactgcag caacaggggc ctctgtgtgg acggacagtg 1860
 cgtctgtgag gacggcttca ccggccctga ctgtgcagaa ctctcctgtc caaatgactg 1920
 ccatggccag ggtcgtctgt tgaatgggca gtgcgtgtgc catgaaggat ttatgggcaa 1980
 agactgcaag gagcaaagat gtcccagtga ctgtcatggc cagggccgct gcgtggacgg 2040
 ccagtgcate tgccacgagg gcttcacagg cctggactgt ggccagcact cctgccccag 2100
 tgactgcaac aacttaggac aatgcgtctc gggccgctgc atctgcaacg agggctacag 2160
 cggagaagac tgctcagagg tgtctcctcc caaagacctc gttgtgacag aagtgacgga 2220

ES 2 640 981 T3

agagacggtc aacctggcct gggacaatga gatgcggggtc acagagtacc ttgtcgtgta 2280
 cacgcccacc cacgaggggtg gtctggaaat gcagttccgt gtgcctgggg accagacgtc 2340
 caccatcatc caggagctgg agcctgggtgt ggagtacttt atccgtgtat ttgccatcct 2400
 ggagaacaag aagagcattc ctgtcagcgc cagggtggcc acgtacttac ctgcacctga 2460
 aggctgaaa ttcaagtcca tcaaggagac atctgtggaa gtggagtggg atcctctaga 2520
 cattgctttt gaaacctggg agatcatctt ccggaatatg aataaagaag atgagggaga 2580
 gatcaccaaa agcctgagga ggccagagac ctcttaccgg caaactggtc tagctcctgg 2640
 gcaagagtat gagatatctc tgcacatagt gaaaaacaat acccggggcc ctggcctgaa 2700
 gagggtgacc accacacgct tggatgcccc cagccagatc gaggtgaaag atgtcacaga 2760
 caccactgcc ttgatcacct ggttcaagcc cctggctgag atcgatggca ttgagctgac 2820
 ctacggcatc aaagacgtgc caggagaccg taccaccatc gatctcacag aggacgagaa 2880
 ccagtactcc atcggaacc tgaagcctga cactgagtac gaggtgtccc tcattctccc 2940
 cagaggtgac atgtcaagca acccagccaa agagaccttc acaacaggcc tccatgctcc 3000
 caggaatctt cgacgtgttt cccagacaga taacagcatc accctggaat ggaggaatgg 3060
 caaggcagct attgacagtt acagaattaa gtatgcccc atctctggag gggaccacgc 3120
 tgaggttgat gttccaaaga gccacaagc cacaaccaa accacactca caggtctgag 3180
 gccgggaact gaatatggga ttggagtttc tgctgtgaag gaagacaagg agagcaatcc 3240
 agcgaccatc aacgcagcca cagagttgga cacgcccag gaccttcagg tttctgaaac 3300
 tgcagagacc agcctgacct tgctctgga gacaccgttg gccaaattg accgctaccg 3360
 cctcaattac agtctcccca caggccagtg ggtgggagtg cagcttccaa gaaacaccac 3420
 ttctatgtc ctgagaggcc tggaaccagg acaggagtac aatgtcctcc tgacagccga 3480

ES 2 640 981 T3

gaaaggcaga cacaagagca agcccgcacg tgtgaaggca tccactgaac aagcccctga 3540
 gctggaaaac ctcaccgtga ctgaggttgg ctgggatgga ctcagactca actggaccgc 3600
 ggctgaccag gcctatgagc actttatcat tcaggtgcag gaggccaaca aggtggaggg 3660
 agctcggaac ctcaccgtgc ctggcagcct tcgggctgtg gacataccgg gcctcaaggg 3720
 tgctacgcct tatacagtct ccatctatgg ggtgatccag ggctatagaa caccagtgtc 3780
 ctctgctgag gcctccacag gggaaactcc caatttggga gaggtcgtgg tggccgaggt 3840
 gggctgggat gccctcaaac tcaactggac tgctccagaa ggggcctatg agtacttttt 3900
 cattcaggtg caggaggctg acacagtaga ggcagcccag aacctaccg tcccaggagg 3960
 actgaggtcc acagacctgc ctgggctcaa agcagccact cattatacca tcaccatccg 4020
 cggggtcact caggacttca gcacaacccc tctctctgtt gaagtcttga cagaggaggt 4080
 tccagatatg ggaaacctca cagtgaccga ggttagctgg gatgctctca gactgaactg 4140
 gaccacgcca gatggaacct atgaccagtt tactattcag gtccaggagg ctgaccaggt 4200
 ggaagaggct cacaatctca cggttcctgg cagcctgcgt tccatggaaa tcccaggcct 4260
 cagggtggtc actccttaca cagtcaccct gcacggcgag gtcagggggc acagcactcg 4320
 accccttget gtagaggteg tcacagagga tctcccacag ctgggagatt tagccgtgtc 4380
 tgaggttggc tgggatggcc tcagactcaa ctggaccgca gctgacaatg cctatgagca 4440
 ctttgtcatt cagggtgcag aggtcaacaa agtggaggca gcccagaacc tcacgttgcc 4500
 tggcagcctc agggctgtgg acatcccggg cctcgaggct gccacgcctt atagagtctc 4560
 catctatggg gtgatccggg gctatagaac accagtactc tctgctgagg cctccacagc 4620
 caaagaacct gaaattggaa acttaaattgt ttctgacata actcccgaga gcttcaatct 4680
 ctccctggatg gctaccgatg ggatcttcga gacctttacc attgaaatta ttgattccaa 4740

ES 2 640 981 T3

taggttgctg gagactgtgg aatataatat ctctggtgct gaacgaactg cccatatctc 4800
 agggetaccc cctagtactg attttattgt ctacctctct ggacttgctc ccagcatccg 4860
 gacaaaaacc atcagtgcc aagccacgac agaggccctg cccttctgg aaaacctaac 4920
 catttccgac attaatccct acgggttca acgtttcctg atggcatcgg agaatgcctt 4980
 tgacagcttt ctagtaacgg tggtggttc tgggaagctg ctggaccccc aggaattcac 5040
 actttcagga acccagagga agctggagct tagaggcctc ataactggca ttggctatga 5100
 ggttatggtc tctggcttca cccaagggca tcaaaccaag cccttgaggg ctgagattgt 5160
 tacagaagcc gaaccggaag ttgacaacct tctggtttca gatgccacc cagacggttt 5220
 ccgtctgtcc tggacagctg atgaaggggt ctctgacaat ttgtttctca aaatcagaga 5280
 taccaaaaag cagtctgagc cactggaat aaccctactt gccccgaac gtaccagga 5340
 cttaacaggt ctgagagagg ctactgaata cgaaattgaa ctctatggaa taagcaaagg 5400
 aaggcgatcc cagacagtca gtgctatagc aacaacagcc atgggctccc caaaggaagt 5460
 cattttctca gacatcactg aaaattcggc tactgtcagc tggagggcac ccacggccca 5520
 agtggagagc ttccggatta cctatgtgcc cattacagga ggtacaccct ccatggtaac 5580
 tgtggacgga accaagactc agaccaggct ggtgaaactc atacctggcg tggagtacct 5640
 tgtcagcatc atcgccatga agggctttga ggaaagtgaa cctgtctcag ggtcattcac 5700
 cacagctctg gatggcccat ctggcctggt gacagccaac atcactgact cagaagcctt 5760
 ggccaggtgg cagccagcca ttgccactgt ggacagttat gtcattctct acacaggcga 5820
 gaaagtgcc aaaattacac gcacggtgtc cgggaacaca gtggagtatg ctctgaccga 5880
 cctcgagcct gccacggaat acacactgag aatctttgca gagaaagggc cccagaagag 5940
 ctcaaccatc actgccaagt tcacaacaga cctcgattct ccaagagact tgactgctac 6000

ES 2 640 981 T3

tgaggttcag tgggaaactg cctccttac ctggcgacce ccccgggcat cagtcaccgg 6060
 ttacctgctg gtctatgaat cagtggatgg cacagtcaag gaagtcattg tgggtccaga 6120
 taccacctcc tacagcctgg cagacctgag cccatccacc cactacacag ccaagatcca 6180
 ggcaactcaat gggcccctga ggagcaatat gatccagacc atcttcacca caattggact 6240
 cctgtacccc ttcccgaagg actgctcca agcaatgctg aatggagaca cgacctctgg 6300
 cctctacacc atttatctga atggtgataa ggctcaggcg ctggaagtct tctgtgacat 6360
 gacctctgat gggggtggat ggattgtgtt cctgagacgc aaaaacggac gcgagaactt 6420
 ctaccaaac tggaaggcat atgctgctgg atttggggac cgagagaag aattctggct 6480
 tgggctggac aacctgaaca aatcacagc ccaggggcag tacgagctcc ggggtggacct 6540
 gcgggacat ggggagacag cctttgctgt ctatgacaag ttcagcgtgg gagatgcaa 6600
 gactcgctac aagctgaagg tggaggggta cagtgggaca gcaggtgact ccatggccta 6660
 ccacaatgac agatccttct ccaccttga caaggacaca gattcagcca tcaccaactg 6720
 tgctctgtcc taaaagggg ctttctggtg caggaactgt caccgtgtca acctgatggg 6780
 gagatatggg gacaataacc acagtcaggc cgttaactgg ttccactgga agggccacga 6840
 aactcaatc cagtttctg agatgaagct gagaccaagc aacttcagaa atcttgaagg 6900
 caggcgcaaa cgggcataaa ttggaggac cactgggtga gagaggaata aggcggccca 6960
 gagcgaggaa aggattttac caaagcatca atacaaccag cccaaccatc ggtccacacc 7020
 tgggcatttg gtgagaatca aagctgacca tggatccctg gggccaacgg caacagcatg 7080
 ggctcacct cctctgtgat ttctttcttt gcaccaaaga catcagtctc caacatgttt 7140
 ctgttttgtt gtttgattca gcaaaaatct cccagtgaca acatcgcaat agttttttac 7200
 ttctcttagg tggtctggg atgggagagg ggtaggatgt acaggggtag tttgttttag 7260

ES 2 640 981 T3

aaccagccgt attttacatg aagctgtata attaattgtc attatTTTTg ttagcaaaga 7320
 ttaaagtgt cattggaagc catccctttt tttacatttc atacaacaga aaccagaaaa 7380
 gcaatactgt ttccatttta aggatatgat taatattatt aatataataa tgatgatgat 7440
 gatgatgaaa actaaggatt tttcaagaga tctttctttc caaacattt ctggacagta 7500
 cctgattgta tttttttttt aaataaaagc acaagtactt ttgaaaaaaa accggaattc 7560

<210> 39
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 39

5

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

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

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

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

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

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

10

<210> 40
<211> 2201
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 40

ES 2 640 981 T3

Met Gly Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val Phe Leu Ala Phe Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Thr Glu Gly Gly Val Leu Lys Lys Val Ile Arg His Lys
 20 25 30

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

Val Phe Asn His Val Tyr Asn Ile Lys Leu Pro Val Gly Ser Gln Cys
 50 55 60

Ser Val Asp Leu Glu Ser Ala Ser Gly Glu Lys Asp Leu Ala Pro Pro
 65 70 75 80

Ser Glu Pro Ser Glu Ser Phe Gln Glu His Thr Val Asp Gly Glu Asn
 85 90 95

Gln Ile Val Phe Thr His Arg Ile Asn Ile Pro Arg Arg Ala Cys Gly
 100 105 110

Cys Ala Ala Ala Pro Asp Val Lys Glu Leu Leu Ser Arg Leu Glu Glu
 115 120 125

Leu Glu Asn Leu Val Ser Ser Leu Arg Glu Gln Cys Thr Ala Gly Ala
 130 135 140

ES 2 640 981 T3

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

Cys Ser Gly Arg Gly Asn Phe Ser Thr Glu Gly Cys Gly Cys Val Cys
 165 170 175

Glu Pro Gly Trp Lys Gly Pro Asn Cys Ser Glu Pro Glu Cys Pro Gly
 180 185 190

Asn Cys His Leu Arg Gly Arg Cys Ile Asp Gly Gln Cys Ile Cys Asp
 195 200 205

Asp Gly Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Gln Leu Ala Cys Pro Ser Asp
 210 215 220

Cys Asn Asp Gln Gly Lys Cys Val Asn Gly Val Cys Ile Cys Phe Glu
 225 230 235 240

Gly Tyr Ala Gly Ala Asp Cys Ser Arg Glu Ile Cys Pro Val Pro Cys
 245 250 255

Ser Glu Glu His Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Cys Val Cys His Asp
 260 265 270

Gly Phe Ala Gly Asp Asp Cys Asn Lys Pro Leu Cys Leu Asn Asn Cys
 275 280 285

Tyr Asn Arg Gly Arg Cys Val Glu Asn Glu Cys Val Cys Asp Glu Gly
 290 295 300

ES 2 640 981 T3

Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Leu Ile Cys Pro Asn Asp Cys Phe
 305 310 315 320

Asp Arg Gly Arg Cys Ile Asn Gly Thr Cys Tyr Cys Glu Glu Gly Phe
 325 330 335

Thr Gly Glu Asp Cys Gly Lys Pro Thr Cys Pro His Ala Cys His Thr
 340 345 350

Gln Gly Arg Cys Glu Glu Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Ala
 355 360 365

Gly Val Asp Cys Ser Glu Lys Arg Cys Pro Ala Asp Cys His Asn Arg
 370 375 380

Gly Arg Cys Val Asp Gly Arg Cys Glu Cys Asp Asp Gly Phe Thr Gly
 385 390 395 400

Ala Asp Cys Gly Glu Leu Lys Cys Pro Asn Gly Cys Ser Gly His Gly
 405 410 415

Arg Cys Val Asn Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Thr Gly Glu
 420 425 430

Asp Cys Ser Gln Leu Arg Cys Pro Asn Asp Cys His Ser Arg Gly Arg
 435 440 445

Cys Val Glu Gly Lys Cys Val Cys Glu Gln Gly Phe Lys Gly Tyr Asp
 450 455 460

ES 2 640 981 T3

Cys Ser Asp Met Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gln His Gly Arg Cys
 465 470 475 480

Val Asn Gly Met Cys Val Cys Asp Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Asp Cys
 485 490 495

Arg Asp Arg Gln Cys Pro Arg Asp Cys Ser Asn Arg Gly Leu Cys Val
 500 505 510

Asp Gly Gln Cys Val Cys Glu Asp Gly Phe Thr Gly Pro Asp Cys Ala
 515 520 525

Glu Leu Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asn
 530 535 540

Gly Gln Cys Val Cys His Glu Gly Phe Met Gly Lys Asp Cys Lys Glu
 545 550 555 560

Gln Arg Cys Pro Ser Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asp Gly
 565 570 575

Gln Cys Ile Cys His Glu Gly Phe Thr Gly Leu Asp Cys Gly Gln His
 580 585 590

Ser Cys Pro Ser Asp Cys Asn Asn Leu Gly Gln Cys Val Ser Gly Arg
 595 600 605

Cys Ile Cys Asn Glu Gly Tyr Ser Gly Glu Asp Cys Ser Glu Val Ser
 610 615 620

ES 2 640 981 T3

Pro Pro Lys Asp Leu Val Val Thr Glu Val Thr Glu Glu Thr Val Asn
 625 630 635 640

Leu Ala Trp Asp Asn Glu Met Arg Val Thr Glu Tyr Leu Val Val Tyr
 645 650 655

Thr Pro Thr His Glu Gly Gly Leu Glu Met Gln Phe Arg Val Pro Gly
 660 665 670

Asp Gln Thr Ser Thr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Pro Gly Val Glu Tyr
 675 680 685

Phe Ile Arg Val Phe Ala Ile Leu Glu Asn Lys Lys Ser Ile Pro Val
 690 695 700

Ser Ala Arg Val Ala Thr Tyr Leu Pro Ala Pro Glu Gly Leu Lys Phe
 705 710 715 720

Lys Ser Ile Lys Glu Thr Ser Val Glu Val Glu Trp Asp Pro Leu Asp
 725 730 735

Ile Ala Phe Glu Thr Trp Glu Ile Ile Phe Arg Asn Met Asn Lys Glu
 740 745 750

Asp Glu Gly Glu Ile Thr Lys Ser Leu Arg Arg Pro Glu Thr Ser Tyr
 755 760 765

Arg Gln Thr Gly Leu Ala Pro Gly Gln Glu Tyr Glu Ile Ser Leu His
 770 775 780

ES 2 640 981 T3

Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Leu Thr Gly Leu Arg Pro Gly Thr Glu
 945 950 955 960

Tyr Gly Ile Gly Val Ser Ala Val Lys Glu Asp Lys Glu Ser Asn Pro
 965 970 975

Ala Thr Ile Asn Ala Ala Thr Glu Leu Asp Thr Pro Lys Asp Leu Gln
 980 985 990

Val Ser Glu Thr Ala Glu Thr Ser Leu Thr Leu Leu Trp Lys Thr Pro
 995 1000 1005

Leu Ala Lys Phe Asp Arg Tyr Arg Leu Asn Tyr Ser Leu Pro Thr
 1010 1015 1020

Gly Gln Trp Val Gly Val Gln Leu Pro Arg Asn Thr Thr Ser Tyr
 1025 1030 1035

Val Leu Arg Gly Leu Glu Pro Gly Gln Glu Tyr Asn Val Leu Leu
 1040 1045 1050

Thr Ala Glu Lys Gly Arg His Lys Ser Lys Pro Ala Arg Val Lys
 1055 1060 1065

Ala Ser Thr Glu Gln Ala Pro Glu Leu Glu Asn Leu Thr Val Thr
 1070 1075 1080

Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr Ala Ala Asp
 1085 1090 1095

ES 2 640 981 T3

Gln Ala Tyr Glu His Phe Ile Ile Gln Val Gln Glu Ala Asn Lys
 1100 1105 1110

Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu Arg Ala
 1115 1120 1125

Val Asp Ile Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr Pro Tyr Thr Val Ser
 1130 1135 1140

Ile Tyr Gly Val Ile Gln Gly Tyr Arg Thr Pro Val Leu Ser Ala
 1145 1150 1155

Glu Ala Ser Thr Gly Glu Thr Pro Asn Leu Gly Glu Val Val Val
 1160 1165 1170

Ala Glu Val Gly Trp Asp Ala Leu Lys Leu Asn Trp Thr Ala Pro
 1175 1180 1185

Glu Gly Ala Tyr Glu Tyr Phe Phe Ile Gln Val Gln Glu Ala Asp
 1190 1195 1200

Thr Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Val Pro Gly Gly Leu Arg
 1205 1210 1215

Ser Thr Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr His Tyr Thr Ile
 1220 1225 1230

Thr Ile Arg Gly Val Thr Gln Asp Phe Ser Thr Thr Pro Leu Ser
 1235 1240 1245

ES 2 640 981 T3

Val Glu Val Leu Thr Glu Glu Val Pro Asp Met Gly Asn Leu Thr
 1250 1255 1260

Val Thr Glu Val Ser Trp Asp Ala Leu Arg Leu Asn Trp Thr Thr
 1265 1270 1275

Pro Asp Gly Thr Tyr Asp Gln Phe Thr Ile Gln Val Gln Glu Ala
 1280 1285 1290

Asp Gln Val Glu Glu Ala His Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu
 1295 1300 1305

Arg Ser Met Glu Ile Pro Gly Leu Arg Ala Gly Thr Pro Tyr Thr
 1310 1315 1320

Val Thr Leu His Gly Glu Val Arg Gly His Ser Thr Arg Pro Leu
 1325 1330 1335

Ala Val Glu Val Val Thr Glu Asp Leu Pro Gln Leu Gly Asp Leu
 1340 1345 1350

Ala Val Ser Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr
 1355 1360 1365

Ala Ala Asp Asn Ala Tyr Glu His Phe Val Ile Gln Val Gln Glu
 1370 1375 1380

Val Asn Lys Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Leu Pro Gly Ser
 1385 1390 1395

ES 2 640 981 T3

Leu Arg Ala Val Asp Ile Pro Gly Leu Glu Ala Ala Thr Pro Tyr
 1400 1405 1410

Arg Val Ser Ile Tyr Gly Val Ile Arg Gly Tyr Arg Thr Pro Val
 1415 1420 1425

Leu Ser Ala Glu Ala Ser Thr Ala Lys Glu Pro Glu Ile Gly Asn
 1430 1435 1440

Leu Asn Val Ser Asp Ile Thr Pro Glu Ser Phe Asn Leu Ser Trp
 1445 1450 1455

Met Ala Thr Asp Gly Ile Phe Glu Thr Phe Thr Ile Glu Ile Ile
 1460 1465 1470

Asp Ser Asn Arg Leu Leu Glu Thr Val Glu Tyr Asn Ile Ser Gly
 1475 1480 1485

Ala Glu Arg Thr Ala His Ile Ser Gly Leu Pro Pro Ser Thr Asp
 1490 1495 1500

Phe Ile Val Tyr Leu Ser Gly Leu Ala Pro Ser Ile Arg Thr Lys
 1505 1510 1515

Thr Ile Ser Ala Thr Ala Thr Thr Glu Ala Leu Pro Leu Leu Glu
 1520 1525 1530

Asn Leu Thr Ile Ser Asp Ile Asn Pro Tyr Gly Phe Thr Val Ser
 1535 1540 1545

ES 2 640 981 T3

Trp Met Ala Ser Glu Asn Ala Phe Asp Ser Phe Leu Val Thr Val
 1550 1555 1560

Val Asp Ser Gly Lys Leu Leu Asp Pro Gln Glu Phe Thr Leu Ser
 1565 1570 1575

Gly Thr Gln Arg Lys Leu Glu Leu Arg Gly Leu Ile Thr Gly Ile
 1580 1585 1590

Gly Tyr Glu Val Met Val Ser Gly Phe Thr Gln Gly His Gln Thr
 1595 1600 1605

Lys Pro Leu Arg Ala Glu Ile Val Thr Glu Ala Glu Pro Glu Val
 1610 1615 1620

Asp Asn Leu Leu Val Ser Asp Ala Thr Pro Asp Gly Phe Arg Leu
 1625 1630 1635

Ser Trp Thr Ala Asp Glu Gly Val Phe Asp Asn Phe Val Leu Lys
 1640 1645 1650

Ile Arg Asp Thr Lys Lys Gln Ser Glu Pro Leu Glu Ile Thr Leu
 1655 1660 1665

Leu Ala Pro Glu Arg Thr Arg Asp Ile Thr Gly Leu Arg Glu Ala
 1670 1675 1680

Thr Glu Tyr Glu Ile Glu Leu Tyr Gly Ile Ser Lys Gly Arg Arg
 1685 1690 1695

ES 2 640 981 T3

Ser Gln Thr Val Ser Ala Ile Ala Thr Thr Ala Met Gly Ser Pro
 1700 1705 1710

Lys Glu Val Ile Phe Ser Asp Ile Thr Glu Asn Ser Ala Thr Val
 1715 1720 1725

Ser Trp Arg Ala Pro Thr Ala Gln Val Glu Ser Phe Arg Ile Thr
 1730 1735 1740

Tyr Val Pro Ile Thr Gly Gly Thr Pro Ser Met Val Thr Val Asp
 1745 1750 1755

Gly Thr Lys Thr Gln Thr Arg Leu Val Lys Leu Ile Pro Gly Val
 1760 1765 1770

Glu Tyr Leu Val Ser Ile Ile Ala Met Lys Gly Phe Glu Glu Ser
 1775 1780 1785

Glu Pro Val Ser Gly Ser Phe Thr Thr Ala Leu Asp Gly Pro Ser
 1790 1795 1800

Gly Leu Val Thr Ala Asn Ile Thr Asp Ser Glu Ala Leu Ala Arg
 1805 1810 1815

Trp Gln Pro Ala Ile Ala Thr Val Asp Ser Tyr Val Ile Ser Tyr
 1820 1825 1830

Thr Gly Glu Lys Val Pro Glu Ile Thr Arg Thr Val Ser Gly Asn
 1835 1840 1845

ES 2 640 981 T3

Thr Val Glu Tyr Ala Leu Thr Asp Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr
 1850 1855 1860

Thr Leu Arg Ile Phe Ala Glu Lys Gly Pro Gln Lys Ser Ser Thr
 1865 1870 1875

Ile Thr Ala Lys Phe Thr Thr Asp Leu Asp Ser Pro Arg Asp Leu
 1880 1885 1890

Thr Ala Thr Glu Val Gln Ser Glu Thr Ala Leu Leu Thr Trp Arg
 1895 1900 1905

Pro Pro Arg Ala Ser Val Thr Gly Tyr Leu Leu Val Tyr Glu Ser
 1910 1915 1920

Val Asp Gly Thr Val Lys Glu Val Ile Val Gly Pro Asp Thr Thr
 1925 1930 1935

Ser Tyr Ser Leu Ala Asp Leu Ser Pro Ser Thr His Tyr Thr Ala
 1940 1945 1950

Lys Ile Gln Ala Leu Asn Gly Pro Leu Arg Ser Asn Met Ile Gln
 1955 1960 1965

Thr Ile Phe Thr Thr Ile Gly Leu Leu Tyr Pro Phe Pro Lys Asp
 1970 1975 1980

Cys Ser Gln Ala Met Leu Asn Gly Asp Thr Thr Ser Gly Leu Tyr
 1985 1990 1995

ES 2 640 981 T3

Thr Ile Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Ala Glu Ala Leu Glu Val Phe
 2000 2005 2010

Cys Asp Met Thr Ser Asp Gly Gly Gly Trp Ile Val Phe Leu Arg
 2015 2020 2025

Arg Lys Asn Gly Arg Glu Asn Phe Tyr Gln Asn Trp Lys Ala Tyr
 2030 2035 2040

Ala Ala Gly Phe Gly Asp Arg Arg Glu Glu Phe Trp Leu Gly Leu
 2045 2050 2055

Asp Asn Leu Asn Lys Ile Thr Ala Gln Gly Gln Tyr Glu Leu Arg
 2060 2065 2070

Val Asp Leu Arg Asp His Gly Glu Thr Ala Phe Ala Val Tyr Asp
 2075 2080 2085

Lys Phe Ser Val Gly Asp Ala Lys Thr Arg Tyr Lys Leu Lys Val
 2090 2095 2100

Glu Gly Tyr Ser Gly Thr Ala Gly Asp Ser Met Ala Tyr His Asn
 2105 2110 2115

Gly Arg Ser Phe Ser Thr Phe Asp Lys Asp Thr Asp Ser Ala Ile
 2120 2125 2130

Thr Asn Cys Ala Leu Ser Tyr Lys Gly Ala Phe Trp Tyr Arg Asn
 2135 2140 2145

Cys His Arg Val Asn Leu Met Gly Arg Tyr Gly Asp Asn Asn His
 2150 2155 2160

Ser Gln Gly Val Asn Trp Phe His Trp Lys Gly His Glu His Ser
 2165 2170 2175

Ile Gln Phe Ala Glu Met Lys Leu Arg Pro Ser Asn Phe Arg Asn
 2180 2185 2190

Leu Glu Gly Arg Arg Lys Arg Ala
 2195 2200

<210> 41

<211> 91

5 <212> PRT

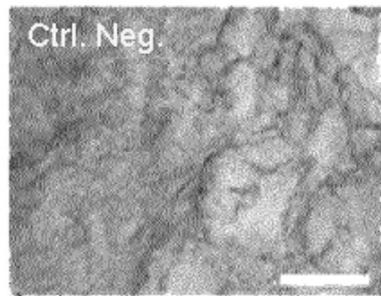
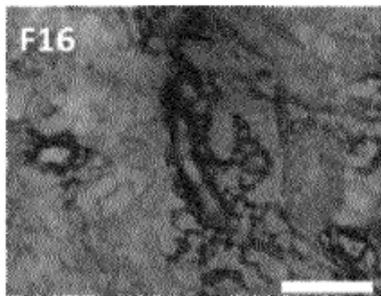
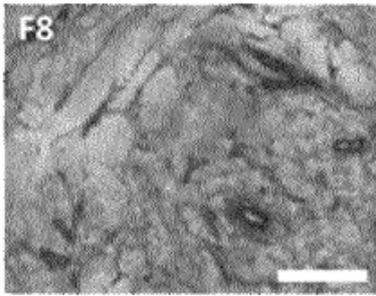
<213> *Homo sapiens*

<400> 41

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo que se une a la isoforma con dominio extra A (ED-A) de fibronectina, para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de leucemia mieloide aguda que comprende seleccionar como diana la neovasculatura de médula ósea en pacientes con leucemia mieloide aguda.
2. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es para su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda.
- 10 3. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 2, en el que el método comprende administrar el anticuerpo y un compuesto anticanceroso a un individuo que lo necesita.
- 15 4. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que el anticuerpo se conjuga con una citocina, un agente citotóxico o un radioisótopo terapéutico.
- 20 5. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo se conjuga con la citocina, el agente citotóxico o el radioisótopo terapéutico a través de un ligador escindible.
- 25 6. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es para su uso en el diagnóstico de leucemia mieloide aguda y en el que el método comprende:
 administrar el anticuerpo a un individuo; y
 detectar la unión del anticuerpo a la neovasculatura de médula ósea en el individuo.
- 30 7. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo se conjuga con un marcador detectable.
- 35 8. Anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo compite por unirse a la isoforma con ED-A de fibronectina con un anticuerpo que comprende el dominio VH de F8 (V5L) de SEQ ID NO: 13 y el dominio VL de F8 (K18R) de SEQ ID NO: 15.
- 40 9. Anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo comprende un sitio de unión anticuerpo-antígeno que comprende un dominio VH y un dominio VL,
 comprendiendo el dominio VH una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 17 y una CDR3 de VH de SEQ ID NO: 18, y comprendiendo el dominio VL una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 19, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 20 y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 21.
- 45 10. Anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo comprende un sitio de unión anticuerpo-antígeno que comprende un dominio VH y un dominio VL, en el que el dominio VH es el dominio VH de F8 (V5L) de SEQ ID NO: 13 y el dominio VL es el dominio VL de F8 (K18R) de SEQ ID NO: 15.
- 50 11. Anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es una inmunoproteína pequeña (SIP), scFv, o molécula de IgG completa.
12. Uso de un anticuerpo que se une a la isoforma con ED-A de fibronectina en la neovasculatura de médula ósea en pacientes con leucemia mieloide aguda para la detección o el diagnóstico *in vitro* de leucemia mieloide aguda.
13. Uso según la reivindicación 12, en el que el anticuerpo es un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11.

A



B

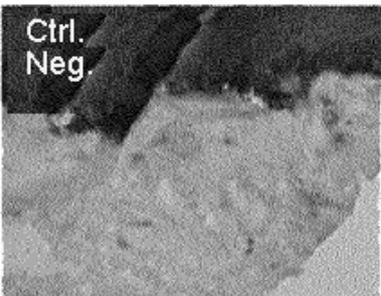
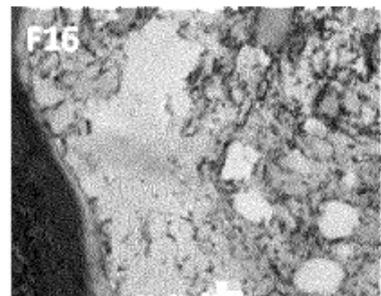
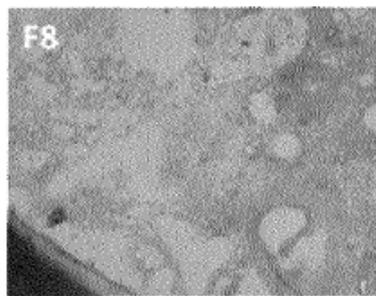
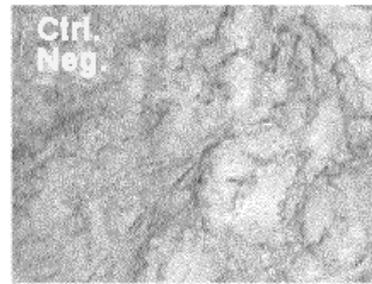
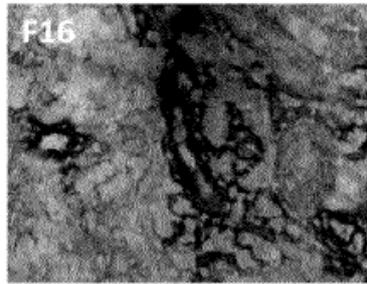
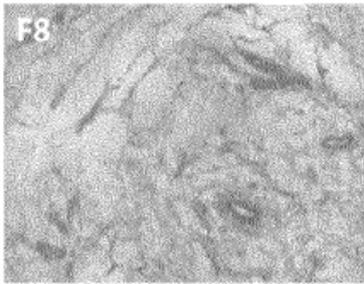


Figura 1

A



B

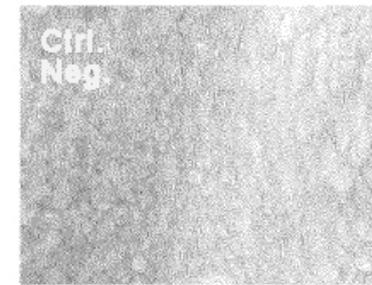
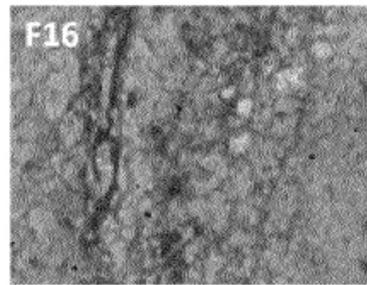
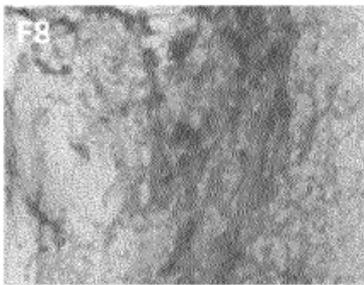
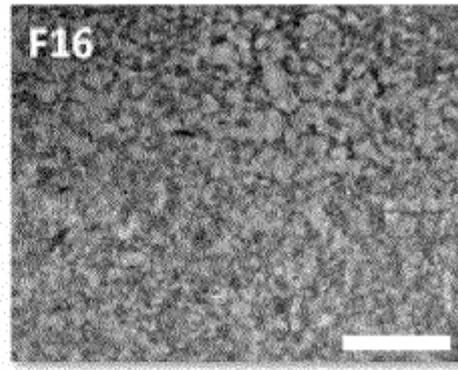
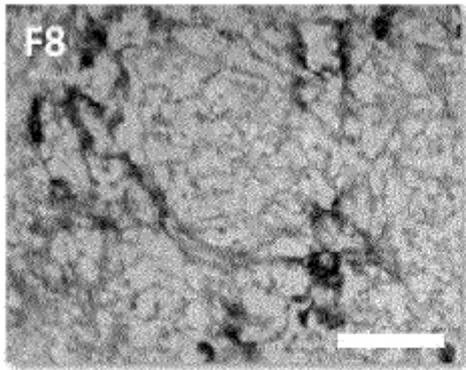


Figura 2

A



B

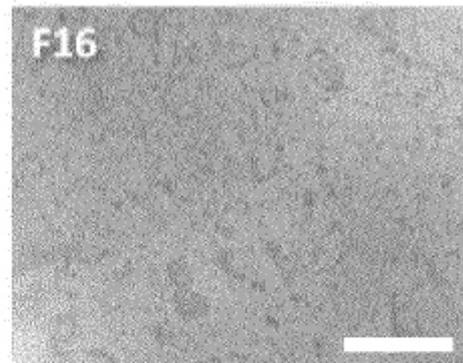
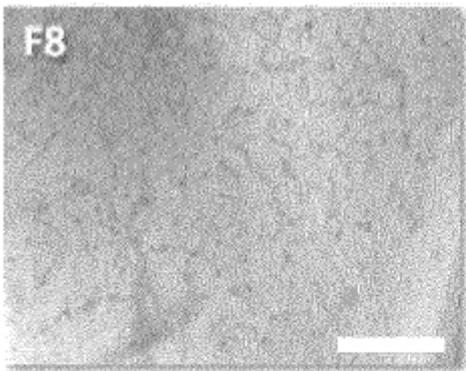


Figura 3