

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 565**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)
C07K 14/245 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2004** **PCT/CA2004/001488**
87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2005** **WO05052158**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2004** **E 04761652 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017** **EP 1694845**

54 Título: **Anticuerpos anticarcinoma y sus usos**

30 Prioridad:

28.11.2003 US 525183 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
16.11.2017

73 Titular/es:

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(50.0%)
1200 Montreal Road Building M-58
Ottawa, Ontario K1A 0R6, CA y
OTTAWA HEALTH RESEARCH INSTITUTE
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**MACKENZIE, COLIN, ROGER;
ZHANG, JIANBING;
NGUYEN, THANH-DUNG;
LI, QINGGANG y
MAI, KIEN TRUNG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 642 565 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anticarcinoma y sus usos

En general se espera que la investigación proteómica facilite en gran medida el descubrimiento de nuevas dianas tumorales. Los principales avances se han realizado en la identificación de dianas para fines de diagnóstico. Sin embargo, las limitaciones de las tecnologías actuales han dificultado la identificación de nuevas dianas terapéuticas. Las técnicas comúnmente empleadas en la proteómica, tales como electroforesis en gel bidimensional, cromatografía líquida y espectrometría de masas en tandem (LC/MS/MS), ionización por desorción láser asistida por una matriz/espectrometría de masas (MALDI-MS), y el sistema de dos híbridos de levadura no han satisfecho la demanda de dianas "utilizables como fármacos", tales como marcadores de la superficie celular.

Los anticuerpos y péptidos que se dirigen a tumores se pueden aislar por medio de enfoques de presentación en genotecas (por ejemplo, Aina, 2002; Hoogenboom, 1998). Esto se logra generalmente mediante el escrutinio de una genoteca de presentación en fagos, o genotecas con otros formatos de presentación, contra antígenos purificados específicos de tumores o asociados a tumores. Sin embargo, los anticuerpos y los péptidos que se dirigen a tumores también se han aislado mediante la selección por afinidad en genotecas frente a células tumorales o tejidos tumorales sin una información previa de las dianas moleculares. Las ventajas notables de este último enfoque son:

(i) los anticuerpos/péptidos aislados se unen a formas naturales de sus antígenos/ligandos en la superficie celular, mientras que los antígenos tumorales purificados son frecuentemente de naturaleza recombinante y carecen de una modificación postraducciona, (ii) los antígenos son accesibles para los anticuerpos/péptidos aislados aunque los aislados mediante una selección por afinidad frente a antígenos puros, pueden reconocer epítopos que están hundidos de forma natural en la membrana o bloqueados por una modificación de los hidratos de carbono. Sin embargo, los anticuerpos/péptidos aislados con este método, por lo general tienen una afinidad de baja a moderada hacia sus antígenos/ligandos.

Puesto que cada partícula del fago M13 presenta cinco copias de la proteína pIII de recubrimiento menor, una partícula de fago que presenta un fragmento de anticuerpo en todas las copias de pIII, se puede considerar un anticuerpo pentavalente. Esta presentación multivalente de fragmentos de anticuerpo en los fagos aumenta en gran medida la avidez del anticuerpo y facilita tanto el escrutinio como la evaluación de los anticuerpos en fagos. Los fragmentos de anticuerpo aislados (scFv o sdAbs) o los péptidos se unen a antígeno con mucha menos eficacia ya que están presentes principalmente en una forma monovalente y carecen de avidez.

Una estrategia de oligomerización de fragmentos de anticuerpo que permite una pentavalencia como en la presentación en fagos con pIII, es el objeto del documento PCT/CA02/01829 (MacKenzie y Zhang). La fusión de un anticuerpo de dominio único (sdAb) con el dominio de homopentamerización de la subunidad B de verotoxina (VT1 B) da como resultado la pentamerización simultánea del sdAb. Los sdAbs pentavalentes, denominados pentacuerpos, se unen con mucha más fuerza al antígeno inmovilizado que sus homólogos monoméricos. En el caso de un sdAb que se unía a una hormona peptídica, la pentamerización daba como resultado una mejora de 10^3 a 10^4 veces en la unión al antígeno inmovilizado. El documento WO0052054 da a conocer un scFv contra las células A459. Un objeto de la invención es proporcionar un anticuerpo de dominio único con afinidad hacia el carcinoma de pulmón.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Se proporciona en el presente documento un nuevo anticuerpo de dominio único AFAI y fragmentos del mismo que tiene afinidad específica por la unión a un carcinoma, y especialmente al carcinoma de pulmón. Este anticuerpo, y porciones del mismo, se pueden utilizar, entre otras cosas en el diagnóstico y el tratamiento de un carcinoma. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **FIGURA 1** es una representación de AFAI monomérico y pentamérico. (a) Secuencia de AFAI (SEQ ID NO. 1) con CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas; (b) representación esquemática de las estructuras primarias de la proteína monomérica (AFAI) y pentamérica (ES1); (c) secuencia de ES1 (SEQ ID NO. 2) con AFAI subrayado; (d) SDS-PAGE de ES1 purificado (carril 1) y AFAI (carril 2).

La **FIGURA 2** es una representación ilustrada de una tinción inmunocitoquímica de las células A549 con el anticuerpo AFAI en fagos. Las células se expusieron al fago con AFAI como primer anticuerpo, a IgG de ratón anti-M13 como segundo anticuerpo y a IgG de cabra anti-ratón marcada con Alexa Fluor 546 como tercer anticuerpo. DAPI y DIOC₅(3) se utilizaron para teñir los núcleos celulares y el retículo endoplasmático, respectivamente.

La **FIGURA 3** es una representación ilustrada de una tinción inmunocitoquímica de A549 con AFAI y ES1. Las células A549 se expusieron a ES1 (A) o AFAI (D) como primer anticuerpo, a IgG monoclonal anti-c-myc como segundo anticuerpo y a IgG anti-ratón marcada con Alexa Fluor 546 (rojo) como tercer anticuerpo. La tinción con DAPI de (A) y (D) se muestra en (B) y (E), respectivamente. Superposiciones de A, B y D, E se muestran en C y F, respectivamente.

La **FIGURA 4** es una representación ilustrada de una tinción inmunohistoquímica que muestra que ES1 se une fuertemente a un adenocarcinoma de pulmón diferenciado y no se une a la mayoría de los adenocarcinomas de colon o al tejido pulmonar normal. (A) Tinción fuerte positiva de un adenocarcinoma de pulmón, (B) vista ampliada del área en el recuadro en (A), (C) tinción negativa de un adenocarcinoma de colon y (D) tinción negativa de tejido pulmonar normal.

La **FIGURA 5** es una representación de un carcinoma bronquioloalveolar de tipo mucinoso: (A) inmunotinción con ES1 que muestra una inmunorreactividad moderada difusa, principalmente a lo largo de los límites luminales; (B) gran aumento de un área en A; (C) inmunotinción con TTF1 (DAKO) que muestra una inmunorreactividad negativa.

La **FIGURA 6** es una representación de un adenocarcinoma de pulmón metastásico poco diferenciado: (A) inmunotinción con ES1 que muestra una inmunorreactividad fuerte difusa; (B) gran aumento de un área en A; (C) inmunotinción con TTF1 que muestra una inmunorreactividad negativa.

La **FIGURA 7** es una representación de un adenocarcinoma de pulmón moderadamente diferenciado: (A) inmunotinción con ES1 que muestra una fuerte inmunorreactividad en una zona focal adyacente a un área que muestra una tinción focal débil; (B) gran aumento de un área en A. (C) Inmunotinción con MIB1 (DAKO) que muestra un aumento notable de la inmunorreactividad en una zona con fuerte inmunorreactividad con ES1.

La **FIGURA 8** es una representación de un adenocarcinoma de pulmón poco diferenciado: (A) inmunotinción con ES1 que muestra una inmunorreactividad moderada y extensa; (B, C) gran aumento de un área en A. Obsérvese la inmunotinción negativa en el epitelio bronquial normal.

La **FIGURA 9** es una representación de un carcinoma de pulmón adenoescamoso: (A) inmunotinción con ES1 que muestra una inmunorreactividad focal; (B, C) gran aumento de un área en A que muestra una inmunorreactividad focal.

La **FIGURA 10** es una representación de una hiperplasia adenomatosa típica del pulmón: (A) inmunotinción con ES1 que muestra una inmunorreactividad focal débil, (B, C) gran aumento de un área en A que muestra una inmunorreactividad débil.

La **FIGURA 11** es una representación de un adenocarcinoma colónico metastásico moderadamente diferenciado en el cerebro: (A) inmunotinción con ES1 que muestra una inmunorreactividad focal en unas pocas células aisladas; (B) gran aumento de un área en A.

La **FIGURA 12** es una representación de carcinoma ductal infiltrante de la mama: (A) inmunotinción con ES1 que muestra una inmunorreactividad moderada focal; (B) gran aumento de un área en A; (C) inmunorreactividad focal fuerte en algunos ácinos en el tejido mamario normal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La investigación proteómica ha proporcionado muchas dianas tumorales novedosas. Sin embargo, debido a algunas limitaciones, ha sido difícil identificar dianas que sean más accesibles para la aplicación de fármacos. Una nueva plataforma de descubrimiento de antígenos tumorales basada en el escrutinio de una genoteca de anticuerpos de dominio único (sdAb) frente a células tumorales y, posteriormente, la identificación de los antígenos correspondientes de los anticuerpos aislados, se describe en el presente documento. Un sdAb específico, AFAI, específico de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (línea celular A549) se aisló a partir de una genoteca de fagos obtenida a partir del repertorio de anticuerpos de cadena pesada de una llama, tal y como se describe en el Ejemplo 1. La propiedad de homopentamerización de una subunidad B de verotoxina no tóxica fue explotada para preparar el pentacuerpo ES1, las formas pentaméricas de AFAI. La pentamerización mejoró enormemente la unión del AFAI a las células A549. Una tinción inmunohistoquímica mostró que ES1 es altamente específico para el carcinoma de pulmón.

De cara a la descripción en el presente documento, es posible sintetizar químicamente el gen completo de ES1 y expresarlo en *E. coli* o en otro organismo apropiado de acuerdo con técnicas convencionales. El gen de AFAI se puede sintetizar a partir de ES1, que es la entidad que se une a su antígeno. De cara a la descripción en el presente documento, es posible preparar formas diméricas, triméricas, tetraméricas, pentaméricas y otras formas multivalentes de AFAI. Tales productos pueden ser útiles en métodos y composiciones que se relacionan con la presente invención, al igual que el ADN y el material clonado pueden proporcionar variantes de tales productos que proporcionan una unión específica a un tejido maligno o a células de interés, como se describe en el presente documento.

ES1, AFAI y/o variantes de los mismos que muestran una especificidad de unión similar ("variantes adecuadas") son útiles en el diagnóstico y el tratamiento del carcinoma de pulmón. Los métodos de diagnóstico con los que se pueden emplear ES1, AFAI y/o variantes adecuadas de los mismos incluyen: métodos de inmunohistoquímica; marcado de la(s) molécula(s) (ES1, AFAI, variantes) con radioisótopos y detección con herramientas de formación de imágenes de tumores, tales como la tomografía por emisión de positrones e IRM; análisis de muestras de sangre (y detectar la unión usando técnicas convencionales).

Se contemplan específicamente kits de diagnóstico que comprenden ES1, AFAI y/o una variante adecuada de los mismos y las instrucciones para su uso.

Los métodos terapéuticos y las composiciones relacionadas con ES1 y AFAI incluyen emplear AFAI, ES1 o una variante adecuada de los mismos y, por ejemplo: marcarlos con radioisótopos y aplicar las moléculas a un paciente; conjugarlos con uno o varios agentes terapéuticos convencionales y aplicar el conjugado a un paciente; conjugarlos con una o varias toxinas y aplicar los conjugados a pacientes; expresar moléculas de ácido nucleico que codifican ES1, AFAI y/o una variante adecuada de los mismos en un vector de terapia génica y aplicar los vectores a pacientes.

Resultados

Ejemplo 1:

Cultivo celular

La línea celular de carcinoma de pulmón de células no pequeñas, A549, se adquirió en la ATCC (Manassas, VA) y se conservó en DMEM (Gibco, Rockville, MA) complementado con 5% de FBS (Gibco) y 1% de antibiótico antimicótico (Gibco). Las células de fibroblastos dérmicos humanos primarios fueron amablemente proporcionadas por el Dr. J. Xu (Apotex Research Inc. Ottawa, ON). El antisuero policlonal de conejo anti-verotoxina fue proporcionado amablemente por el Dr. Clifford Lingwood (Univ. de Toronto).

Aislamiento del sdAb AFAI que se une a la línea celular de carcinoma de pulmón de células no pequeñas A549

Una genoteca de anticuerpos de dominio único de llama sin tratamiento previo (Tanha et al., 2002) sirvió como fuente de un fragmento de anticuerpo específico de las células tumorales, en este caso la línea celular de carcinoma de pulmón de células no pequeñas A549. El aislamiento de los anticuerpos en fagos que se unían a las células A549, denominado selección celular por afinidad, se llevó a cabo con células A549 con una adsorción previa de la genoteca sobre fibroblastos humanos en cada ronda de selección por afinidad.

Una genoteca de presentación en fagos de sdAb (Tanha et al., 2002) se seleccionó por afinidad con A549 como células diana y fibroblastos dérmicos humanos como células de sustracción. La selección por afinidad se realizó como se describe en Becerril et al. (1999) con ligeras modificaciones. Para la primera ronda de selección por afinidad, se incubaron 10^{13} pfu con las células de sustracción de fibroblastos para eliminar fagos que se unían a fibroblastos. Las partículas de fagos restantes en el material sobrenadante se incubaron con células A549 cultivadas en una placa de Petri de 5 cm a temperatura ambiente durante 1 h. Las células A549 se lavaron 5 veces, 1 minuto cada vez, con PBS y 5 veces, 10 minutos cada vez, con tampón de extracción (glicina 50 mM, pH 2,8, NaCl 0,5 M, urea 2 M, 2% de polivinilpirrolidona) y después se lisaron con trietilamina 100 mM. El lisado celular se neutralizó mediante la adición de 100 μ l de Tris 1 M (pH 7,0). Los fagos en el lisado celular neutralizado se amplificaron en células TG1 de *E. coli*. La subgenoteca amplificada se sometió a la siguiente ronda de selección por afinidad empleando el mismo método. Los clones de fagos individuales se seleccionaron después de cuatro rondas de selección por afinidad y se determinaron las secuencias de ADN que codificaban los anticuerpos presentados.

Los clones de fagos individuales se aislaron después de cuatro rondas de selección por afinidad y las actividades de unión a las células de los clones de fagos se examinaron mediante ELISA. De 94 clones, 25 clones dieron positivo. El análisis de la secuencia de los clones de fagos positivos con ELISA, mostraba que los 25 clones de fagos positivos mostraban el mismo sdAb. Este anticuerpo se designó AFAI porque la región CDR3 del anticuerpo es el tetrapéptido Ala-Phe-Ala-Ile (Figura 1).

Ejemplo 2

Tinción celular Parte A: Tinción de las células con AFAI presentado en fagos

Cuando las células A549 se inmunotifieron con el fago con AFAI como primer anticuerpo, seguido por un anticuerpo monoclonal anti-M13 e IgG de cabra anti-ratón marcada con Fluor 546, se observó que unas señales fluorescentes muy intensas estaban asociadas con una subpoblación celular (Fig. 2). El patrón de la tinción de las células A549 positivas sugería que AFAI se une a un antígeno de membrana abundante.

Para investigar si la unión del fago con AFAI a las células A549 es específica del tipo celular, una línea celular humana de epitelio bronquial, HBE4, una línea celular humana de próstata, PREP y una línea celular humana de fibroblastos primarios se eligieron como controles para la tinción inmunocitoquímica. Con las mismas condiciones empleadas para la inmunocitoquímica de A549, no se observó ninguna tinción con fibroblastos humanos y solo se observó una tinción muy débil con HBE4 y PREP.

Ejemplo 3

Tinción celular Parte B: Producción de sdAbs de AFAI monómeros y pentámeros y tinción celular con los sdAbs

Para una evaluación adicional y una caracterización de AFAI, AFAI monómeros y pentámeros se expresaron y se purificaron. El gen que codificaba AFAI se amplificó mediante PCR y se insertó en un vector de expresión de *E. coli*, generando el clon pAFAI (Fig. 1B). Para aprovechar el efecto de avidéz elevada de los pentacuerpos, se construyó una forma pentamérica de AFAI, denominada ES1 (Fig. 1B y Fig. 1C). Los rendimientos de AFAI y ES1 purificados (Fig. 1D) a partir de cultivos en matraces de 1 litro de *E. coli* TG1, sin optimización de la fermentación, eran 6 mg y 20 mg, respectivamente.

Brevemente, el ADN que codificaba el sdAb AFAI se clonó en los sitios BbsI/BamHI del plásmido pSJF2 (Tanha, 2003) y los sitios BbsI/ApaI del plásmido pVT2 para generar vectores de expresión para AFAI monómero y pentámero, respectivamente. Los clones de *E. coli* obtenidos se designaron pAFAI (monómero) y pES1 (pentámero). Las proteínas AFAI y ES1 se produjeron como se describe en Tanha et al. (2003), con la modificación de una extracción de las proteínas a partir de células de *E. coli* mediante lisis de las células en lugar de choque osmótico. Brevemente, los clones de pAFAI y pES1 se inocularon en 100 ml de medio M9 (0,2% de glucosa, 0,6% de Na_2HPO_4 , 0,3% de KH_2PO_4 , 0,1% de NH_4Cl , 0,05% de NaCl , MgCl_2 1 mM, CaCl_2 0,1 mM) complementado con 0,4% de casaminoácidos, 5 mg/l de vitamina B1 y 200 µg/ml de ampicilina y se agitaron durante una noche a 37°C. Treinta ml del cultivo de M9 durante una noche se transfirieron a 1 litro de medio M9 con los mismos complementos y se agitaron a 37°C durante 24 horas. La inducción de la expresión génica se inició mediante la adición de 100 ml de 10 x nutrientes TB (12% de triptona, 24% de extracto de levadura, 4% de glicerol), 2 ml de 100 mg/ml de ampicilina y 1 ml de IPTG 1 M y los cultivos se agitaron a temperatura ambiente durante 48 a 72 horas. Las células de *E. coli* se recogieron mediante centrifugación y se lisaron con un homogeneizador celular Emulsiflex® (Avestin Inc. Ottawa, ON). El lisado celular se centrifugó, el material sobrenadante claro obtenido se cargó en una columna de afinidad quelante Hi-Trap® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y las proteínas que contenían marcador His₅ se purificaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

La tinción inmunoquímica de las células A549 se realizó con ambos anticuerpos monoméricos (AFAI) y pentaméricos (ES1).

Se emplearon métodos inmunoquímicos convencionales, con ligeras modificaciones, en la tinción de las células con fago con AFAI y con AFAI monomérico y pentamérico. Las células se cultivaron en cubreobjetos de portaobjetos hasta aproximadamente 70% de confluencia y se fijaron durante 10 minutos con formaldehído al 4% en PBS. La permeabilización se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente en 0,05% de NP-40 (Bio-Rad, Hercules, CA) seguida de tres lavados con PBS que contenía 0,05% de Tween-20 (PBST). Para la tinción de las células con fago con AFAI, se incubaron 2×10^{11} pfu de fago con AFAI (en medio A549) con células fijadas durante 18 horas a 4°C y se lavaron tres veces, 5 minutos cada vez, con PBST. Para la tinción de las células con AFAI monomérico o pentamérico, se incubaron 100 µg/ml de AFAI y ES1 (en medio A549) con las células durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBST. Los anticuerpos secundarios, IgG monoclonal anti-M13 (Amersham Biosciences) para el fago M13 o la IgG 9E10 anti c-myc (ATCC) para el pentacuerpo ES1, se aplicaron con una dilución 1:100 durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguida de tres lavados con PBST. El tercer anticuerpo IgG de cabra anti-ratón marcada con Alexa Fluor 546® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR), se diluyó 1:100 y se aplicó de la misma manera que los anticuerpos secundarios. La tinción de contraste se realizó con DAPI y $(\text{DIOC}_5)_3$ (Molecular Probes). Después de la tinción inmunoquímica, los cubreobjetos se montaron usando un kit Prolong Antifade (Molecular Probes) y se observaron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX51® y las imágenes se registraron.

No se observó ninguna tinción obvia cuando se empleó AFAI (Fig. 3), debido probablemente a la baja afinidad de unión de AFAI monomérico. La capacidad del anticuerpo AFAI para teñir las células A549, sin embargo, se observó cuando se empleaba la forma pentamérica, ES1, (Fig. 3). Tal y como se observó con el fago con AFAI, ES1 solamente teñía una subpoblación de las células A549.

Ejemplo 4

Determinación de la especificidad de ES1 para tejidos tumorales

Para determinar la especificidad de tejido de ES1, se realizó una tinción inmunohistoquímica de una amplia gama de tejidos sobre una micromatriz de tejido utilizando ES1 como anticuerpo primario. Los resultados mostraban que ES1 reconocía la mayoría de los adenocarcinomas de pulmón, mostrando una inmunorreactividad de moderada a fuerte. Ningún adenocarcinoma de colon mostraba una inmunorreactividad fuerte hacia ES1, sin embargo, se observó una inmunorreactividad focal de débil a moderada en unos pocos casos. Los tejidos de pulmón y de colon no cancerosos no eran inmunorreactivos (Fig. 4, Tabla 1).

Tinciones inmunohistoquímicas

Para determinar la especificidad de tejido de ES1, se realizó una tinción inmunohistoquímica de una amplia gama de tejidos usando ES1 como anticuerpo primario.

La inmunotinción de tejidos humanos utilizando ES1 como anticuerpo primario se realizó utilizando el método del complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC) con un kit ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) en secciones de cuatro micras de espesor cortadas de los bloques de parafina.

La inmunotinción de tejidos humanos utilizando MIB1 (Dako, dilución 1:100) y TTF1 (Dako, dilución 1:50), dos anticuerpos utilizados ampliamente en la detección de carcinoma de pulmón, se llevó a cabo utilizando la técnica de peroxidasa-antiperoxidasa.

Evaluación morfológica

- 5 La inmunorreactividad de ES1 fue evaluada por dos patólogos y se puntuó como una tinción moderada o fuertemente positiva cuando había un patrón de tinción continua de la membrana y/o citoplasmática, y como débilmente positiva cuando había una tinción discontinua membranosa o citoplasmática débil. El patrón de tinción moderada o fuerte se puntuó adicionalmente como 3 en los casos que mostraban una tinción en más del 50% de las células, como 2 en más del 10% y como 1 en hasta el 10%. Se revisaron los casos con una puntuación discrepante.
- 10 Se obtuvieron ciento cuarenta y tres especímenes de resecciones o de biopsias que contenían tumores de pulmón, colon, mama, estómago, páncreas, próstata, endometrio, ovario, tiroides y mesotelio (Tabla 1). Para cada caso, una muestra de tejido tumoral representativo, de 2 mm de diámetro, se retiró del bloque de parafina y se volvió a incluir con otras muestras tumorales para producir un bloque de parafina con una micromatriz de tejidos que contenía al menos 15 tejidos diferentes. Del tejido normal también se tomaron muestras a partir de tejido no tumoral distante del tumor y de tejido pulmonar normal de una autopsia. Los casos de pulmón, colon, mama, estómago, páncreas, vejiga urinaria, vesícula biliar, esófago y ovario con tejido de la micromatriz que mostraba una inmunorreactividad negativa, débil o focal, se volvieron a presentar para someter a una inmunotinción con ES1, utilizando secciones de tejido de gran tamaño.
- 15 La Tabla 2 compara los resultados de la inmunotinción del grupo de carcinomas de pulmón de células grandes no escamosas con el grupo combinado de carcinomas de colon, mama, urotelial y otros adenocarcinomas secretores de moco. Excluyendo otros tipos de carcinomas que mostraban una inmunorreactividad débil o negativa con ES1, la sensibilidad y la especificidad de la inmunorreactividad con ES1 en los carcinomas pulmonares de células grandes no escamosas eran del 97 y 45%, respectivamente. El valor predictivo positivo era del 54%.
- 20 Los resultados mostraban que ES1 presentaba una inmunorreactividad de moderada a fuerte con la mayoría de los adenocarcinomas de pulmón. Ninguno de los adenocarcinomas de colon mostraba una inmunorreactividad fuerte con ES1; sin embargo, se observó una inmunorreactividad focal de débil a moderada en algunos casos. Los tejidos de pulmón y colon no cancerosos no eran inmunorreactivos.
- 25 La reactividad era frecuentemente más fuerte en la membrana (Figuras 5, 6, 7) que en el citoplasma (Figuras 8). El patrón de inmunotinción positiva variaba desde una tinción difusa (Figuras 5, 6) a una tinción focal en porciones de tumor o en células individuales (Figuras 7, 8). De 93 casos con inmunorreactividad negativa, débil o focal en las secciones de la micromatriz, había once secciones grandes que mostraban una puntuación de la inmunorreactividad de 1 o 2. La Tabla 1 resume los resultados finales de la inmunotinción de todos los especímenes.
- 30 Treinta y cinco carcinomas de pulmón de células grandes no escamosas que incluían siete carcinomas bronquioloalveolares y 22 adenocarcinomas desde bien diferenciados a poco diferenciados, seis carcinomas de células grandes indiferenciados mostraron puntuaciones de la inmunorreactividad de 1, 2 y 3 en 7, 17 y 10 tumores respectivamente (Figuras 5 a 8). El carcinoma restante era un carcinoma de células grandes no diferenciado con algunas características de diferenciación escamosa que mostraba una inmunorreactividad negativa. Los tumores con inmunorreactividad focal de moderada a fuerte (menos del 10% de células inmunorreactivas), eran tumores no mucinosos bien diferenciados. Dos carcinomas adenoescamosos también mostraban puntuaciones de la inmunorreactividad de 1 y 2 en el componente de adenocarcinoma (Figura 9). Cuatro de las cinco hiperplasias atípicas adenomatosas del pulmón mostraban una inmunorreactividad focal o débil (Figura 10). Todos los carcinomas escamosos puros, tumores carcinoides, parénquima pulmonar normal y reactivo con o sin carcinomas acompañantes, no reaccionaron con el anticuerpo.
- 35 En 53 tumores no de pulmón y secretores de moco que incluían 15 adenocarcinomas de colon, 8 carcinomas de mama, 4 carcinomas uroteliales y adenocarcinomas de páncreas (seis), estómago (seis) y vesícula biliar (uno), esófago (tres), vejiga urinaria (dos), ovario (tres) y tráquea (uno), la inmunorreactividad se puntuó como 1, 2, 3, débil y negativa en 15, 11, 3, 12 y 12, respectivamente (Figuras 11, 12). Los adenocarcinomas del colon formaban el subgrupo de tumores con más inmunorreactividad difusa y fuerte. Los adenomas de colon solo mostraban una inmunorreactividad focal o débil.
- 40 En 32 tumores no de pulmón y no mucinosos, la inmunorreactividad era negativa o débil. Los tejidos normales procedentes de pulmón, hígado, páncreas, riñón, vejiga urinaria, endometrio, tiroides, esófago y ovario de las zonas circundantes al cáncer o de órganos que no tenían cáncer, no eran reactivos para el cáncer con excepción de un caso de tejido de mama (que rodeaba un carcinoma ductal) que mostraba positividad moderada en ácinos ocasionales.
- 45 La inmunotinción con MIB1 realizada en 24 secciones grandes de 24 carcinomas de pulmón de células grandes no escamosas con una puntuación de la inmunorreactividad de 1 o 2, mostraba un aumento notable de la proliferación de las células tumorales en áreas con gran cantidad de células inmunorreactivas con ES1, en comparación con las zonas con células inmunorreactivas con ES1 negativas, débiles o focales. La inmunotinción con TTF1 se realizó en
- 50
- 55

tejido de micromatrices. Todos los tejidos no de pulmón y no de tiroides mostraban una inmunorreactividad nuclear negativa. En 35 carcinomas de pulmón de células grandes no escamosas, la inmunorreactividad con TTF1 era negativa en 8 casos, incluyendo 5 carcinomas de células grandes no diferenciados, dos adenocarcinomas poco diferenciados y un carcinoma bronquioloalveolar mucinoso. Los otros tipos de tejido de la micromatriz no eran inmunorreactivos.

En este estudio, la inmunorreactividad con ES1 estaba casi completamente limitada a tumores malignos, en particular adenocarcinomas de pulmón. Había una tendencia a que la inmunorreactividad fuera más fuerte en los tumores de pulmón con un componente mucinoso, ya que los carcinomas no mucinosos bronquioloalveolares mostraban solo una inmunorreactividad focal. La inmunorreactividad con ES1 era positiva en una serie de adenocarcinomas de colon con tinción más débil y focal que en los adenocarcinomas de pulmón. De interés, la inmunotinción con ES1 siguió teniendo una puntuación de 2 o 3 en un carcinoma de pulmón de células grandes no diferenciado en el sitio primario, así como en los sitios de metástasis en comparación con la baja sensibilidad de TTF1 en la inmunotinción del carcinoma de pulmón de células grandes no diferenciado (*). Además los adenomas de colon solo mostraban una inmunorreactividad focal débil o negativa. El adenocarcinoma mucinoso procedente de otros órganos presentaba una puntuación de 2, una inmunorreactividad focal o débil en un número escaso de casos. Los cambios inmunorreactivos identificados en los adenocarcinomas de pulmón en este estudio probablemente se corresponden con una regulación al alza del antígeno AFAI. Esta impresión se ve apoyada por el hallazgo de una inmunorreactividad con ES1 positiva en áreas de carcinoma de pulmón con una mayor capacidad de proliferación como se demuestra con la inmunorreactividad con MIB1.

Exposición no limitante de variaciones y usos de AFAI

El antígeno AFAI, parece estar regulado al alza en el adenocarcinoma de pulmón, incluso en tumores menos diferenciados. ES1 es probablemente un marcador más sensible que TTF1 para un adenocarcinoma de pulmón poco diferenciado. Dado que la mayoría del tejido normal sometido a ensayo no era inmunorreactivo con ES1, ES1 es adecuado para uso en el desarrollo de una prueba de detección para adenocarcinomas de pulmón y una serie de carcinomas de colon y de mama.

En una realización de la invención, se proporciona una secuencia de aminoácidos de AFAI como se muestra en la Figura 1 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 95% o 98% idéntica a la misma. Los ejemplos de secuencias de aminoácidos variantes de interés se muestran en la Tabla III, en la que los residuos sin cambios se indican mediante un guión. Se apreciará que AFAI se puede mutar en cualquier posición que no interfiera con la unión al antígeno o la especificidad. Los sitios de interés particular incluyen aquellos para los que se muestran algunas mutaciones posibles en la Tabla III. Aunque solo se muestran algunas variantes posibles, se apreciará que todas las variantes funcionales, incluyendo todas las variantes de AFAI que difieren de SEQ. ID. No. 1 en uno o varios de los cambios de aminoácidos descritos en la Tabla III, están contempladas específicamente y están dentro del alcance de la invención.

En una realización de la invención, se proporciona una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia completa con las regiones subrayadas (CDR) de AFAI, tal y como se muestra en la Figura 1 y que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con las porciones restantes de esa secuencia. También se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos que codifican tales secuencias de aminoácidos.

En una realización de la invención, se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos que codifican AFAI tal y como se describe en la Figura 1, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% o 95% idéntica a las mismas.

En una realización de la invención, se proporciona una secuencia de polipéptido que comprende al menos 90 aminoácidos que incluyen las tres secuencias siguientes de aminoácidos contiguos: KNLMG, TISGSGGTNYASSVEG y AFAI.

En una realización de la invención, se proporciona el uso de un polipéptido obtenido a partir de AFAI y/o un polipéptido que tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO. 1 como se muestra en la Figura 1A y/o una porción de la misma, en la formación de un conjugado mediante el injerto en el polipéptido de un fragmento que se une a antígeno. En algunos casos, una o varias de las CDRs de AFAI se injertan en un fragmento que se une a antígeno, incluyendo, por ejemplo, una estructura VHH, VH o VL (armazón) o una inmunoglobulina y/o un fragmento de la misma (por ejemplo, Fab, scFv). Una o varias de las CDRs de AFAI también se pueden emplear para producir una proteína de fusión en la que la segunda secuencia polipeptídica proporciona una funcionalidad o propiedad útil. En algunos casos puede ser deseable producir variantes humanizadas del anticuerpo AFAI usando métodos conocidos en la técnica. Tales anticuerpos humanizados se contemplan específicamente en el presente documento. En algunos casos será deseable conjugar AFAI o una porción del mismo con moléculas de autoensamblaje para permitir la formación de complejos multiméricos que tienen propiedades de unión a antígeno mejoradas.

En una realización de la invención, se proporciona un conjugado de un polipéptido que contiene al menos una de las tres secuencias de aminoácidos contiguos y una molécula o moléculas que se van a transportar. La molécula que se va a transportar puede ser útil para el diagnóstico o el tratamiento de un carcinoma. Por ejemplo, puede ser una enzima o un radioisótopo útil en la identificación y la localización de células de interés en un tejido o puede ser un

agente citotóxico tal como un fármaco, un antígeno adicional fuerte, un inductor de la apoptosis o un radioisótopo útil en la reducción de la viabilidad o la capacidad de proliferación de una célula de carcinoma.

Referencias

- 5 1. Aina, O. H., Sroka, T. C., Chen, M. L. & Lam, K. S. (2002). Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers* 66, 184-199.
2. Hoogenboom, H. R., Henderikx, P. & de Haard, H. (1998). Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31, 5-31.
3. Zhang, J., Spring, H. & Schwab, M. (2001). Neuroblastoma tumor cell-binding peptides identified through random peptide phage display. *Cancer Lett.* 171, 153-164.
- 10 4. Tanha, J., Dubuc, G., Hiram, T., Narang, S. A. & MacKenzie, C. R. (2002). Selection by phage display of llama conventional V(H) fragments with heavy chain antibody V(H)H properties. *J. Immunol. Methods* 263, 97-109.
- 15 5. Williams, L. E., Wu, A. M., Yazaki, P. J., Liu, A., Raubitschek, A. A., Shively, J. E. & Wong, J. Y. (2001). Numerical selection of optimal tumor imaging agents with application to engineered antibodies. *Cancer Biother. Radiopharm.* 16, 25-35.
6. Rader, C., Cheresch, D. A. & Barbas, C. F., III (1998). A phage display approach for rapid antibody humanization: designed combinatorial V gene libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 8910-8915.
7. Becerril, B., Poul, M. A. & Marks, J. D. (1999). Toward selection of internalizing antibodies from phage libraries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 386-393.
- 20 8. Tanha, J., Muruganandam, A. & Stanimirovic, D. (2003). Phage display technology for identifying specific antigens on brain endothelial cells. *Methods Mol. Med.* 89, 436-449.
9. Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S. & Mische, S. M. (1999). Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20, 601-605.
- 25 10. MacKenzie R y Zhang J (2002), documento PCT/CA02/01829.
11. Conrath KE, Wernery U, Muyldermans S, Nguyen VK. (2003) Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev Comp Immunol.* 27(2):87-103.
12. Riechmann L, Muyldermans S. (1999) Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *J Immunol Methods.* 231:25-38.
- 30 13. Tanha J, Dubuc G, Hiram T, Narang SA, MacKenzie CR. (2002) Selection by phage display of llama conventional V(H) fragments with heavy chain antibody V(H)H properties. *J Immunol Methods.* 263:97-109.
14. Conrath K, Lauwereys M, Wyns L, Muyldermans S. (2001) Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J Biol Chem.* 276(10):7346-50.
15. Muyldermans S. (2001) Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol.* 74(4):277-302.

35 **Tabla 1:** 143 lesiones neoplásicas y 103 muestras de tejido no neoplásico diferente

Categorías	nº	Inmunorreactividad				
		+++	++	+	débil	-
A) LESIONES NEOPLÁSICAS PULMONARES (54 lesiones)						
Adenocarcinoma, nº	22	8	11	3		
Carcinoma de células no pequeñas indiferenciado	6	2	3			1
Carcinoma bronquioloalveolar	7		3	4		
Carcinoma adenoescamoso	2		1	1		
Carcinoma de células escamosas	5				2	3
Carcinoma de células pequeñas indiferenciado	3					3
Hiperplasia adenomatosa atípica	6			1	3	2

Tumor carcinoide	3					3
B) TUMORES SECRETORES DE MOCO NO PULMONARES (53 tumores)						
Adenocarcinoma de colon	15	3	5	3	3	1
Carcinoma ductal de mama	8		2	3	1	2
Adenocarcinoma pancreático	6		2	1	2	1
Adenocarcinoma gástrico	6		1	2	1	2
Adenocarcinoma de vesícula biliar	1		1			
Adenocarcinoma esofágico	3			2	1	
Adenocarcinoma de vejiga urinaria	2			1	1	
Adenocarcinoma mucinoso de ovario	3			1		2
Carcinoma de tráquea/adenoide quístico	1					1
Carcinoma urotelial	4			1	1	2
Adenoma de colon	4			1	2	1
C) TUMORES NO PULMONARES Y NO MUCINOSOS (32 tumores)						
Carcinoma de células renales	4				1	3
Carcinoma hepatocelular	5				3	2
Carcinoma papilar seroso de ovario	4					4
Carcinoma papilar de tiroides	5				1	4
Adenoma pleomórfico salivar	3					3
Mesotelioma	5					5
Adenocarcinoma de próstata	3					3
Carcinoma endometrioide	2					2
Carcinoma escamoso esofágico	1					1
D) TEJIDO PULMONAR NORMAL						
Tejido circundante a un carcinoma de pulmón	52					52
Pulmón que no tiene cáncer	4					4
E) OTROS TEJIDOS NORMALES						
próstata (3), riñón (4), endometrio (2), ovario (3), tiroides (5) vejiga urinaria (6), esófago (2), mesotelio (5), mucosa del colon (8), páncreas (4) mucosa gástrica (5)	47			1a		46

Clasificación de la inmunorreactividad: +++: inmunorreactividad de moderada a fuerte en más del 50% de las células tumorales
 ++: inmunorreactividad de moderada a fuerte en más del 10% de las células tumorales
 +: inmunorreactividad de moderada a fuerte en hasta un 10% de las células tumorales
 a: positividad focal en algunos ácinos normales de mama

Tabla 2: Comparación entre carcinomas de pulmón no escamosos de células grandes y carcinomas no de pulmón

Grupos	Total	Inmunorreactividad	
		Positiva	Débil o negativa
Carcinomas de pulmón no escamosos de células grandes	35	34	1
Adenocarcioma de otros sitios	53	29	24
(Adenocarcinoma de colon)	(15)	(11)	(4)

Grupos	Total	Inmunorreactividad	
		Positiva	Débil o negativa
(Carcinoma de mama, carcinomas uroteliales y adenocarcinomas no colónicos secretores de mucosa)*	(38)	(18)	(20)
*páncreas, estómago, vesícula biliar, ovario (no seroso), vejiga urinaria y esófago La sensibilidad de la inmunorreactividad con ES1 en los carcinomas de pulmón no escamosos y no de células pequeñas era del 97% (34/35) La especificidad era del 45% (24/53) Valor predictivo positivo: 54% (34/63)			

Tabla III

Parte A SEQ ID 5

DVQLQASGGG X₁VQPGGSLRL SCAAHDPFD KNLMGWX₂RQA PGKX₃XEX₅VAT ISGSGGTNYA SSVEGRFTIS
RDNAKTIVYL QMNDLKPEDT AVYYCNSAFA IX₆GQGTQVTV SS

en donde X₁ es: V, S, D, L, F, W o T; X₂ es: G, F, Y, V, I, H o L; X₃ es: Q, G, E, D, L, R o K; X₄ es: R, C, Q, L, I, P o K; X₅ es: Y, T, A, W, F, S o L; X₆ es: W, R, E, A, G, V o K.

Parte B

```
DVQLQASGGG VVQPGGSLRL SCAAHDPFD KNLMGWGRQA PGKQREYVAT ISGSGGTNYA SSVEGRFTIS RDNAKTIVYL QMNDLKPEDT AVYYCNSAFA IWGQGTQVTV SS SEQ.ID.1
-----S-----F-----GC-T-----R-----
-----D-----Y-----EQ-A-----E-----
-----L-----V-----DL-W-----A-----
-----F-----I-----LI-F-----G-----
-----W-----E-----EP-S-----V-----
-----T-----L-----KK-L-----K-----
```

Parte C

```
DVQLQASGGG VVQPGGSLRL SCAAHDPFD KNLMGWGRQA PGKQREYVAT ISGSGGTNYA SSVEGRFTIS RDNAKTIVYL QMNDLKPEDT AVYYCNSAFA IWGQGTQVTV SS SEQ.ID.1
-----S-----F-----GC-T-----R-----
-----D-----Y-----EQ-A-----E-----
-----L-----V-----DL-W-----A-----
-----F-----I-----LI-F-----G-----
-----W-----E-----EP-S-----V-----
-----T-----L-----KK-L-----K-----
```

Parte D

```
DVQLQASGGG VVQPGGSLRL SCAAHDPFD KNLMGWGRQA PGKQREYVAT ISGSGGTNYA SSVEGRFTIS RDNAKTIVYL QMNDLKPEDT AVYYCNSAFA IWGQGTQVTV SS SEQ.ID.1
-----S-----F-----GC-T-----R-----
-----D-----Y-----EQ-A-----E-----
-----L-----V-----DL-W-----A-----
-----F-----I-----LI-F-----G-----
-----W-----E-----EP-S-----V-----
-----T-----L-----KK-L-----K-----
```

Parte E

```
DVQLQASGGG VVQPGGSLRL SCAAHDPFD KNLMGWGRQA PGKQREYVAT ISGSGGTNYA SSVEGRFTIS RDNAKTIVYL QMNDLKPEDT AVYYCNSAFA IWGQGTQVTV SS SEQ.ID.1
-----S-----F-----GC-T-----R-----
-----D-----Y-----EQ-A-----E-----
-----L-----V-----DL-W-----A-----
-----F-----I-----LI-F-----G-----
-----W-----E-----EP-S-----V-----
-----T-----L-----KK-L-----K-----
```

Parte F

```

DVQLQASGGG VVQPGGSLRL SCAAHDPFID KNLMGWGRQA PGKQREYVAT ISGSGGTNYA SSVEGRFTIS RDNAKKTVYL QMDLKPEDT AVYYCNSAPA IWGQGTQVTV SS SEQ.ID.1
-----
-----V-----L-W-----A-----
L-----L-W-----A-----
L-----V-----L-W-----A-----
L-----V-----L-W-----A-----
L-----V-----L-W-----

```

Parte G

```

DVQLQASGGG VVQPGGSLRL SCAAHDPFID KNLMGWGRQA PGKQREYVAT ISGSGGTNYA SSVEGRFTIS RDNAKKTVYL QMDLKPEDT AVYYCNSAPA IWGQGTQVTV SS SEQ.ID.1
-----
-----Y-----LI-F-----G-----
F-----LI-F-----G-----
F-----I-----G-----
F-----I-----LI-F-----G-----
F-----I-----LI-F-----

```

Parte H

```

DVQLQASGGG VVQPGGSLRL SCAAHDPFID KNLMGWGRQA PGKQREYVAT ISGSGGTNYA SSVEGRFTIS RDNAKKTVYL QMDLKPEDT AVYYCNSAPA IWGQGTQVTV SS SEQ.ID.1
-----
-----H-----RP-S-----V-----
H-----RP-S-----V-----
H-----P-S-----V-----
H-----R-S-----V-----
H-----RP-----

```

Parte I

```

DVQLQASGGG VVQPGGSLRL SCAAHDPFID KNLMGWGRQA PGKQREYVAT ISGSGGTNYA SSVEGRFTIS RDNAKKTVYL QMDLKPEDT AVYYCNSAPA IWGQGTQVTV SS SEQ.ID.1
-----
-----L-----KK-L-----
T-----KK-L-----
T-----L-----K-L-----
T-----L-----K-L-----
T-----L-----KK-----

```

REIVINDICACIONES

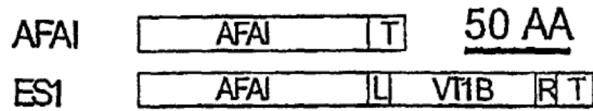
1. Un anticuerpo de dominio único aislado (sdAb) **caracterizado por** una secuencia de una región determinante de la complementariedad (CDR1) KNLMG, una secuencia de CDR2 TISGSGGTNYASSVEG y una secuencia de CDR3 AFAL y que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO. 1 como se muestra en la Figura 1A, y al menos 90% de identidad de secuencia de las porciones restantes de SEQ ID NO. 1 como se muestra en la Figura 1A y en donde el sdAb aislado se une a una línea celular A549 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas.
2. La secuencia de sdAb según la reivindicación 1, que consiste en SEQ ID NO. 1 como se muestra en la Figura 1A.
3. El sdAb según la reivindicación 1, en donde la secuencia es SEQ ID NO. 5 como se muestra en la Tabla III.
4. Un conjugado que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1 a 3 y una molécula seleccionada a partir del grupo que consiste en un radioisótopo, un agente terapéutico o una toxina.
5. Un conjugado que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1 a 3 y un radioisótopo para uso en el diagnóstico de carcinoma de pulmón en tejido de mamífero.
6. El anticuerpo según las reivindicaciones 1 o 2 o el conjugado según la reivindicación 4 que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1 o 2 y una molécula seleccionada a partir del grupo que consiste en un radioisótopo, un agente terapéutico y una toxina para uso en el tratamiento de carcinoma de pulmón.
7. Un kit que comprende:
 - (a) el conjugado según la reivindicación 4; e
 - (b) instrucciones para llevar a cabo el uso según la reivindicación 6.
8. Un oligómero que comprende el sdAb según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
9. El oligómero según la reivindicación 8, que es un homopentámero y que comprende SEQ ID NO. 2 como se muestra en la Figura 1C.
10. Un vector de terapia génica que expresa una secuencia de nucleótidos, que codifica el sdAb según las reivindicaciones 1 a 3.

Fig. 1

A SEQ ID No. 1

DVQLQASGGGVVQPGGSLRLSCAAHDPIFDKNLMGWGR
QAPGKQREYVATISGSGGTNYASSVEGRFTISRDNAKK
TVYLQMNDLKPEDTAVYYCNSAFAIWGQGTQVTVSS

B



AFAI: The sdAb AFAI

VT1B: The D17E/W34A of verotoxin B subunit (VT1B),
accession number of VT1B:p08027, AA21-89

T: c-Myc and 5 X His tag, EQKLISEEDLNHHHHH SEQ ID No 7

L: Left linker, GPGGGSGGGGS SEQ ID No 8

R: Right linker, GGGGSGLAGS SEQ ID No 9

C SEQ ID No 2

DVQLQASGGGVVQPGGSLRLSCAAHDPIFDKNLM
GWGROAPGKQREYVATISGSGGTNYASSVEGRFT
ISRDNAKKTVYLQMNDLKPEDTAVYYCNSAFAIW
GQGTQVTVSSGPGGGSGGGGSTPDCVTGKVEYTK
YNDEDTFTVKVGDKELFTNRRANLQSLLLSAQITG
MTVTIKTNACHNGGSEVIFRGGGSGLAGSEQ
KLISEEDLNHHHHH

D

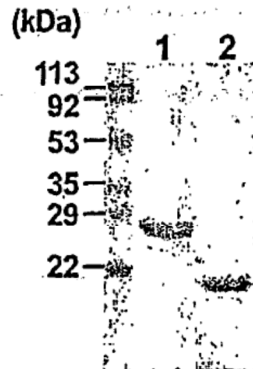


Fig. 2

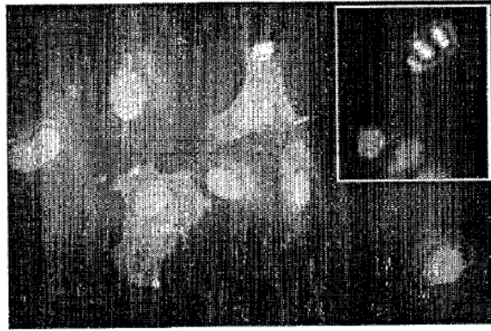


Fig. 3

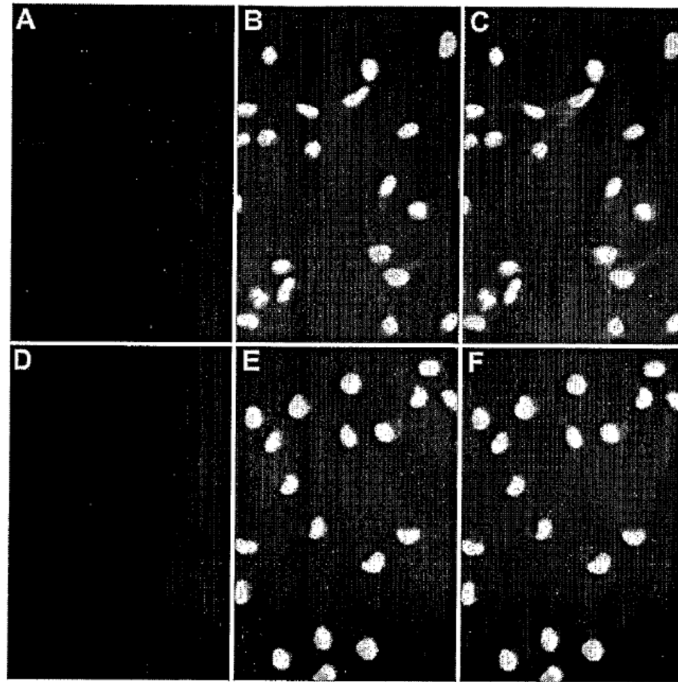


Fig. 4

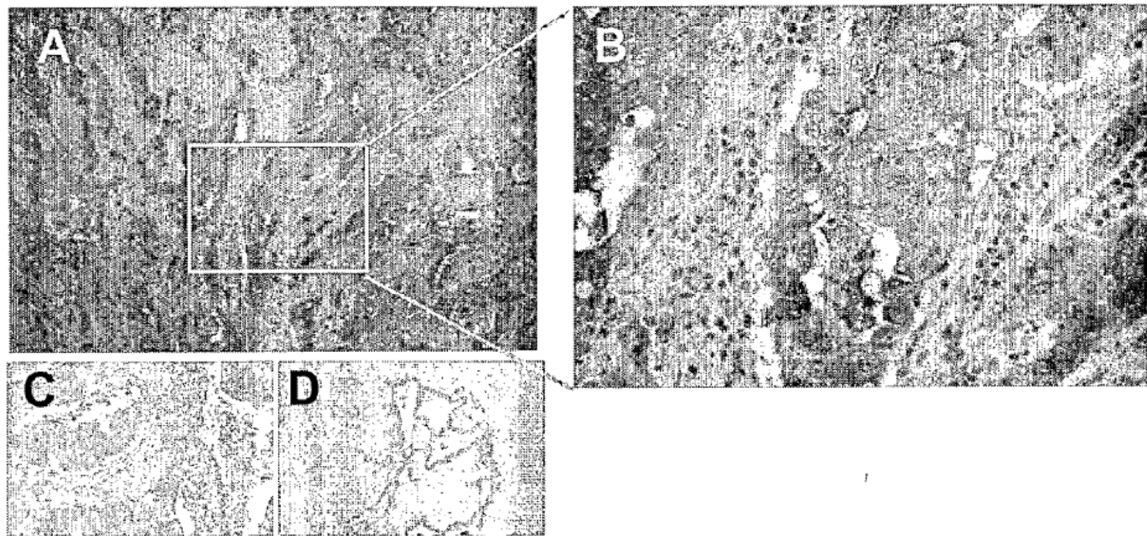


Fig. 5

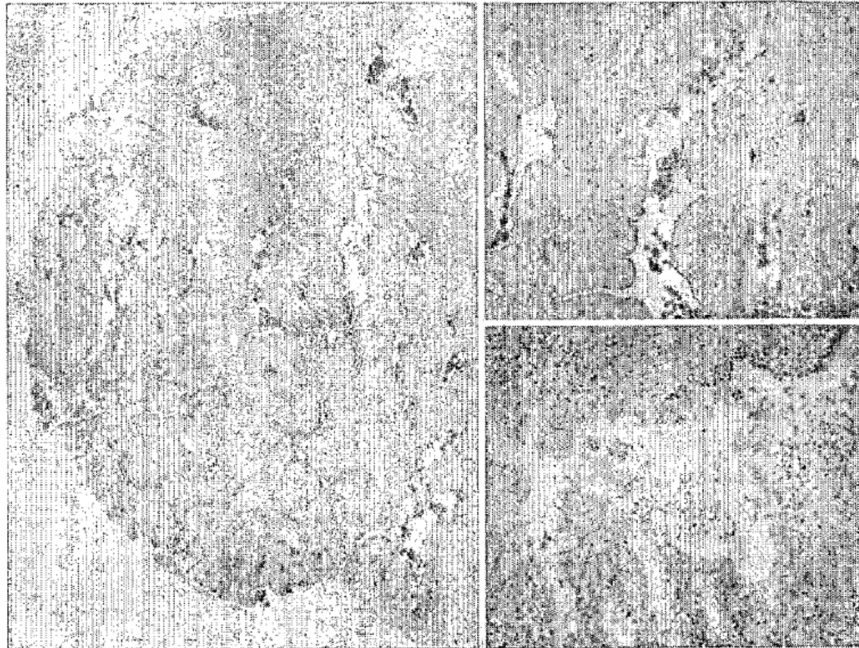


Fig. 6



Fig 7

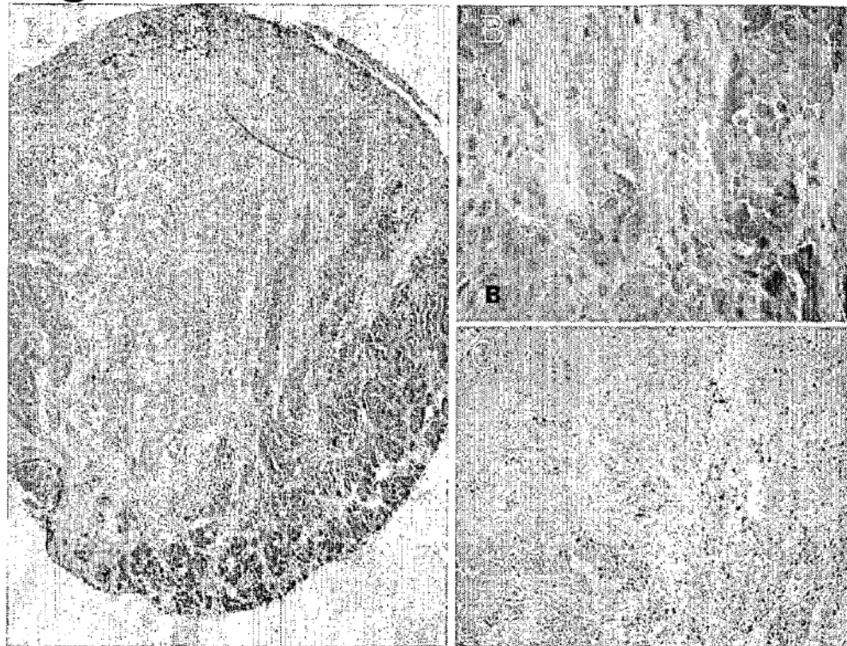


Fig. 8

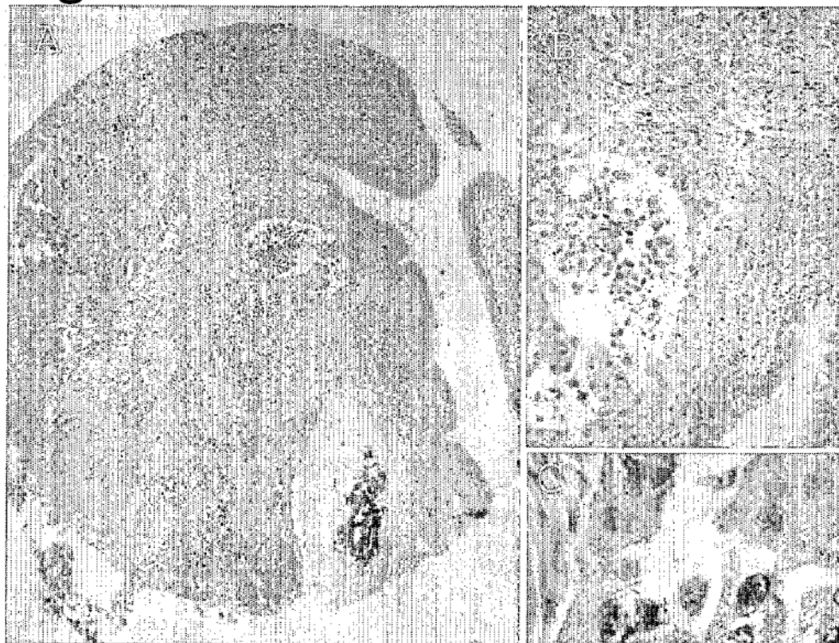


Fig. 9

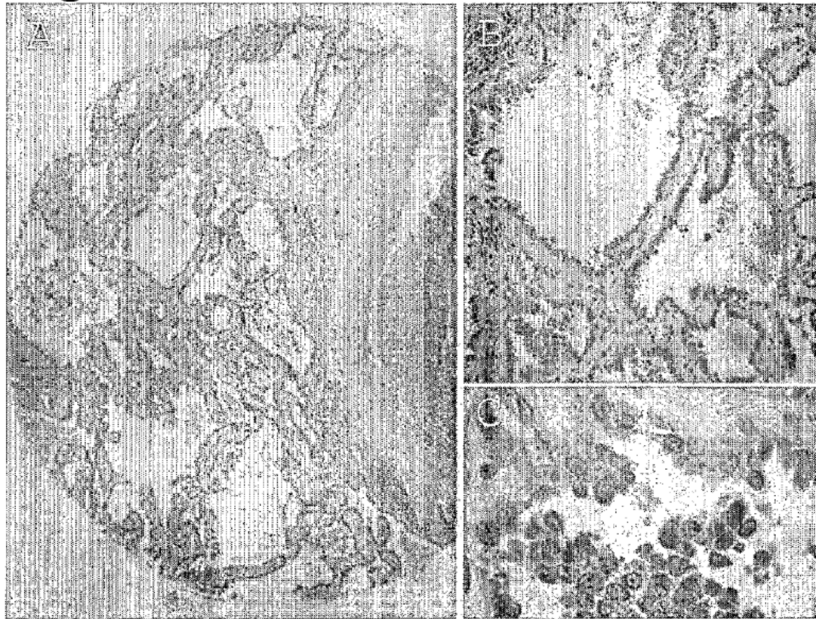


Fig. 10

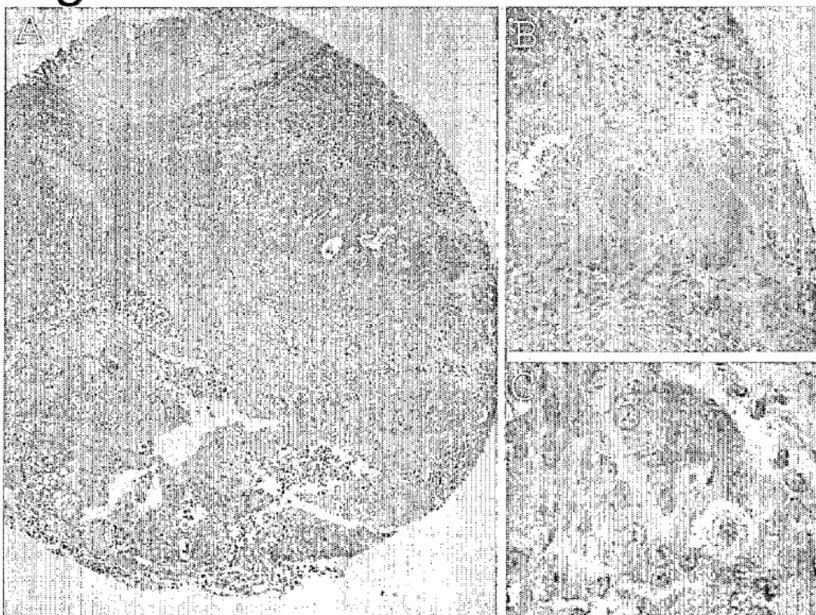


Fig. 11

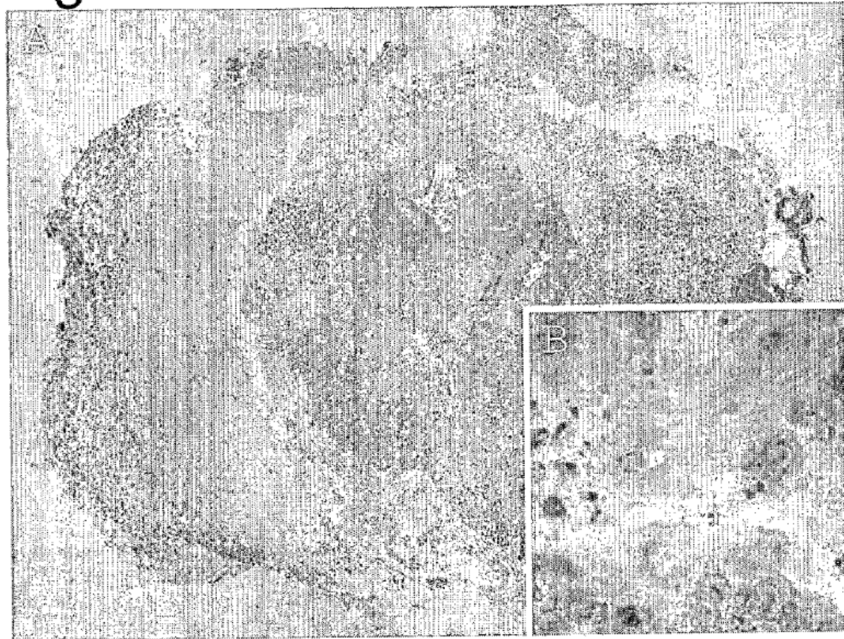


Fig. 12

