

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 228**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2008 PCT/EP2008/009070**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2009 WO09056268**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2008 E 08844563 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2209805**

54 Título: **Un antígeno asociado con artritis reumatoide**

30 Prioridad:

30.10.2007 US 983606 P

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

12.12.2017

73 Titular/es:

PHILOGEN S.P.A. (100.0%)

LA LIZZA 7

53100 SIENA, IT

72 Inventor/es:

KASPAR, MANUELA;

SCHWAGER, KATHRIN y

TRACHSEL, EVELINE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 646 228 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

Un antígeno asociado con artritis reumatoide

La presente invención se refiere al tratamiento de la artritis reumatoide (AR). La invención implica el uso de un miembro de unión que se une a la isoforma ED-A de fibronectina, especialmente un miembro de unión que se une al dominio ED-A de fibronectina.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica y destructiva de las articulaciones que afecta al 0,5-1 % de la población en los países industrializados y frecuentemente lleva a una desestabilidad significativa y a una consecuente reducción de la calidad de vida.

Se considera que la angiogénesis de la membrana sinovial de los pacientes con AR es una etapa temprana importante en la patogénesis y en la perpetuación de la enfermedad (Taylor, 2002). Como en la neoplasia, la angiogénesis nutre la membrana sinovial en expansión (Walsh y col., 1998). El crecimiento de vasos sanguíneos probablemente contribuye a la proliferación del paño sinovial inflamatorio así como a la entrada de leucocitos inflamatorios en el tejido sinovial. La membrana sinovial de los pacientes con AR contenía cantidades aumentadas de factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) y de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Koch, 2003). Las concentraciones séricas de VEGF se correlacionan con la actividad de la enfermedad y el descenso, cuando se suprime con éxito la sinovitis mediante terapia (Taylor, 2002).

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

Las diferentes formas de FN se generan mediante corte y empalme alternativo de tres regiones (ED-A, ED-B, IIICS) del transcrito primario pre-ARNm de FN, un proceso que está modulado mediante citocinas y pH extracelular (Balza 1988; Carnemolla 1989; Borsi 1990; Borsi 1995). La fibronectina contiene dos extradominios globulares de tipo III que se pueden someter a un corte y empalme alternativo: ED-A y ED-B (Ffench-Constant 1995; Hynes 1990, Kaspar y col. 2006). Los EDA de fibronectina de ratón y fibronectina humana son el 96,7 % idénticos (solo difieren 3 aminoácidos entre las dos secuencias de 90 aminoácidos, véase la Figura 2).

La expresión del ED-A de fibronectina se ha documentado en células tumorales y en tumores sólidos a nivel de ARNm en cáncer de mama (Jacobs y col. 2002, Matsumoto y col. 1999) y en cáncer de hígado (Oyama y col. 1989, Tavian y col. 1994) y a nivel de proteína aislada en fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y melanoma (Borsi y col. 1987).

A nivel inmunohistoquímico, la presencia de ED-A se ha detectado en la matriz extracelular (MEC) de los tumores odontogénicos (Heikinheimo y col. 1991) y en carcinoma hepatocelular (Koukoulis y col. 1995). Por el contrario, se ha detectado ED-A en el estroma de neoplasias malignas de mama (Koukoulis y col. 1993), y en los vasos sanguíneos y en las membranas basales de carcinoma de células renales bien diferenciado (Lohi y col. 1995). Sin embargo, en carcinoma de células renales menos diferenciado (Lohi y col. 1995) y el carcinoma papilar del tiroides (Scarpino y col. 1999) se ha detectado EDA en los vasos sanguíneos, membranas basales y estroma tumoral. La presencia de ED-A en el sistema vascular de los gliomas también se ha documentado (Borsi y col. 1998). Por ende, el patrón de expresión de ED-A documentado para los diferentes tipos de tumores es altamente variable.

El suministro dirigido basado en anticuerpos de agentes bioactivos a lugares de angiogénesis es una estrategia terapéutica atractiva para el tratamiento de cáncer, pero esta en gran parte sin explorar para las enfermedades inflamatorias crónicas. Los inventores han demostrado previamente que el dominio ED-B de fibronectina, un marcador de angiogénesis, se expresa en lesiones psoriásicas en pacientes y en un modelo de ratón de psoriasis así como en patas con artritis en el modelo de ratón de artritis reumatoide inducida por colágeno. Usando tanto técnicas radiactivas como fluorescentes, se descubrió que el anticuerpo monoclonal humano L19, específico para EDB se localiza de manera selectiva en los lugares de inflamación *in vivo*, tras la administración intravenosa. Estos resultados sugieren un potencial terapéutico para el suministro selectivo de compuestos bioactivos basados en L19 a lugares de inflamación (Trachsel, 2007; documento PCT/EP2007/004044).

Se ha demostrado antes mediante hibridación *in situ* que además de ED-B, también puede estar presente el dominio ED-A de fibronectina en muestras de artritis humanas (Berndt y col., 1998; Kriegsmann y col., 2004).

Los inventores han demostrado en el presente documento que el anticuerpo anti-EDA, tal como el anticuerpo F8 desvelado en el presente documento, es capaz de dar un patrón de tinción más fuerte en muestras de artritis humanas comparado con el anticuerpo anti-EDB L19 y los anticuerpos anti-tenascina-C F16 y G11.

Por otro lado, usando tanto técnicas radiactivas como fluorescentes, se descubrió que el anticuerpo monoclonal humano F8, específico para ED-A se localiza de manera selectiva en los lugares de inflamación *in vivo*, tras la administración intravenosa.

Por consiguiente, el ED-A de fibronectina se indica como un marcador vascular de artritis reumatoide.

Las moléculas de unión tales como moléculas de anticuerpo que se unen al A-FN y/o al ED-A de fibronectina representa nuevos agentes que se pueden usar para la preparación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide (AR).

5 La presente invención proporciona el uso de un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma del Extra Dominio-A (ED-A) de fibronectina (A-FN), para la preparación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide. La invención también proporciona el uso de un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de fibronectina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide.

10 La invención proporciona adicionalmente el uso de un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma de ED-A de fibronectina para el suministro, a los lugares de artritis reumatoide, de una molécula conjugada con el miembro de unión. La invención también proporciona el uso de un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de fibronectina para el suministro, a los lugares de artritis reumatoide, de una molécula conjugada con el miembro de unión. El miembro de unión se puede usar para la fabricación de un medicamento para el suministro de tal molécula.

15 La divulgación proporciona el uso de un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma ED-A de fibronectina para la fabricación de un producto de diagnóstico para su uso en el diagnóstico de artritis reumatoide. La divulgación también proporciona el uso de un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de fibronectina para la fabricación de un producto de diagnóstico para su uso en el diagnóstico de artritis reumatoide.

20 La divulgación proporciona adicionalmente un procedimiento de detección o de diagnóstico de artritis reumatoide en un ser humano o un animal que comprende:

- (a) administrar al ser humano o al animal un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de fibronectina y
 - (b) determinar la presencia o ausencia del miembro de unión en los lugares de artritis reumatoide del cuerpo del ser humano o del animal;
- 25

en el que la localización del miembro de unión a lugares de artritis reumatoide indica la presencia de artritis reumatoide.

30 La presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de artritis reumatoide en un individuo que comprende la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma ED-A de fibronectina. La presente invención también proporciona un procedimiento de tratamiento de artritis reumatoide en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de fibronectina.

35 La presente invención proporciona una composición que comprende un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma ED-A de fibronectina, para su uso en un procedimiento de tratamiento de artritis reumatoide en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma ED-A de fibronectina. La presente invención también proporciona una composición que comprende un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de fibronectina, para su uso en un procedimiento de tratamiento de artritis reumatoide en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de fibronectina.

40

45 La invención proporciona un procedimiento de suministro de una molécula a la neovasculatura de lugares de artritis reumatoide en un ser humano o animal que comprende la administración al ser humano o animal de un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma ED-A de fibronectina, en el que el miembro de unión se conjuga con la molécula. La invención también proporciona un procedimiento de suministrar una molécula a la neovasculatura de lugares de artritis reumatoide en un ser humano o animal que comprende la administración al ser humano o animal de un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo que se une al ED-A de fibronectina, en el que el miembro de unión se conjuga con la molécula.

50 Un miembro de unión para su uso en la invención puede ser un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina y/o al ED-A de fibronectina, comprendiendo una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9. Preferentemente, un miembro de unión para su uso en la invención es un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina y/o al ED-A de fibronectina, comprendiendo una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo B2, C5, D5, C8, F8, B7 o G9. Más preferentemente, un miembro de unión para su uso en la invención es un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina y/o al ED-A de fibronectina, comprendiendo una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo F8.

55

Un miembro de unión para su uso en la divulgación puede comprender un conjunto de CDR de H y/o L del anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9, o un conjunto de CDR de H y/o L de anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9 con diez o menos, por ejemplo uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos en el conjunto de CDR de H y/o L desvelado. Preferentemente, un miembro de unión para su uso en la divulgación comprende un conjunto de CDR de H y/o L del anticuerpo B2, C5, D5, C8, F8, B7 o G9 con diez o menos, por ejemplo uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos en el conjunto de CDR de H y/o L desvelado.

Se pueden hacer sustituciones potencialmente en cualquier resto en el conjunto de las CDR, y puede ser en CDR1, CDR2 y/o CDR3.

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

El miembro de unión para su uso en la invención también puede comprender una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula de anticuerpo humano. El miembro de unión normalmente comprende un dominio VH y/o VL del anticuerpo. Los dominios VH de miembros de unión también se proporcionan para su uso en la invención. En cada uno de los dominios VH y VL hay regiones determinantes de complementariedad, ("CDR") y regiones marco, ("FR"). Un dominio VH comprende un conjunto de HCDR, y un dominio VL comprende un conjunto de LCDR. Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 y una región marco de VH. Como alternativa o también puede comprender un dominio VL que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 y una región marco de VL. Los dominios VH y VL y las CDR de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 se describen en el presente documento. Todas las secuencias de VH y VL, las secuencias de CDR, los conjuntos de CDR y los conjuntos de HCDR y los conjuntos de LCDR desvelados en el presente documento representan realizaciones de un miembro de unión para su uso en la invención. Tal como se describe en el presente documento, un "conjunto de CDR" comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Por ende, un conjunto de HCDR se refiere a la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y un conjunto de LCDR se refiere a la LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Salvo que se indique de otra forma, un "conjunto de CDR" incluye HCDR y LCDR.

Un miembro de unión para su uso en la invención puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende las regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región marco, en el que HCDR1 es la SEQ ID NO: 3, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103 o 113, y en el que de manera opcional HCDR2 es la SEQ ID NO: 4 y/o HCDR3 es la SEQ ID NO: 5. Preferentemente, la HCDR1 es la SEQ ID NO: 23, 33, 43, 53, 73, 83 o 103. Más preferentemente, la HCDR1 es la SEQ ID NO: 83.

Típicamente, un dominio de VH se empareja con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión a antígeno del anticuerpo, aunque tal como se trata adicionalmente a continuación, un dominio VH o VL solo se puede usar para la unión a antígeno. Por ende, un miembro de unión para su uso en la invención puede comprender adicionalmente un dominio VL que comprende las regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región marco, en el que LCDR1 es la SEQ ID NO: 6, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106 o 116 y en el que LCDR2 es la SEQ ID NO: 7 y/o LCDR3 es la SEQ ID NO: 8. Preferentemente, la LCDR1 es la SEQ ID NO: 26, 36, 46, 56, 76, 86 o 106. Más preferentemente, la LCDR1 es la SEQ ID NO: 86.

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

HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103 o 113,
 HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4,
 HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5,
 LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106 o 116;
 LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7; y
 LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.

Una o más CDR o un conjunto de CDR de un anticuerpo se pueden insertar en una región marco (por ejemplo, una región marco humana) para proporcionar una molécula de anticuerpo para su uso en la invención. Las regiones marco pueden comprender secuencias de segmentos de genes de la línea germinal humana. Por ende, se puede integrar la línea germinal en la región marco, en la que uno o más restos de la región marco se cambian para que coincidan los restos con la posición equivalente de la manera más similar en la región marco de la línea germinal humana. Un miembro de unión para su uso en la invención puede ser una molécula de anticuerpo aislada que tiene un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR en una región marco de una línea germinal humana, por ejemplo, DP47. Normalmente, el miembro de unión también tiene un dominio VL que comprende un conjunto de

LCDR, por ejemplo, en una región marco de una línea germinal humana. La región marco de la línea germinal humana del dominio VL puede ser DPK22.

Un dominio VH para su uso en la invención puede tener la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101 o 111. Preferentemente, un dominio VH para su uso en la invención tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21, 31, 41, 51, 71, 81 o 101. Más preferentemente, un dominio VH para su uso en la invención tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 81. Un dominio VL para su uso en la invención puede tener la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102 o 112. Preferentemente, un dominio VL para su uso en la invención tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22, 32, 42, 52, 72, 82 o 102. Más preferentemente, un dominio VL para su uso en la invención tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 82.

Un miembro de unión para su uso en la invención puede ser o comprender una Fv de cadena simple (scFv), que comprende un dominio VH y un dominio VL unidos mediante un enlace peptídico. El experto en la materia podrá seleccionar una longitud y secuencia de enlazador apropiadas, por ejemplo, al menos 5 o 10 aminoácidos de longitud, hasta aproximadamente 15, 20 o 25 aminoácidos de longitud. El enlazador puede tener la secuencia de aminoácidos GSSGG (SEQ ID NO: 28). La scFv puede consistir en o comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9.

Una Fv de cadena simple (scFv) puede estar comprendida en una miniinmunoglobulina o inmunoproteína pequeña (SIP, del inglés *small immunoprotein*), por ejemplo, tal como se describe en (Li y col., 1997). Una SIP puede comprender una molécula de scFv fusionada al dominio CH4 de la isoforma IgE-S2 de la IgE secretora humana (ϵ_{S2} -CH4; Batista y col., 1996) formando una molécula de anticuerpo miniinmunoglobulina homodimérica.

Como alternativa, un miembro de unión para su uso en la divulgación puede comprender un sitio de unión a antígeno en una molécula de no anticuerpo, normalmente provista de una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de CDR en una proteína de estructura no de anticuerpo. Los miembros de unión, incluyendo moléculas no de anticuerpo y anticuerpo, se describen en más detalle en otra parte en el presente documento.

Un miembro de unión para su uso en la invención se puede conjugar con una molécula que tenga actividad biocida, citotóxica inmunosupresora o antiinflamatoria. La interleucina-10 es una molécula ventajosa para la conjugación con un miembro de unión de acuerdo con la presente invención, y es útil en el tratamiento de artritis reumatoide. Por otro lado, un miembro de unión para su uso en la invención se puede conjugar con un radioisótopo, una etiqueta detectable o un fotosensibilizador.

Estos y otros aspectos de la invención se describen en más detalle a continuación.

30 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra los resultados de la inmunohistoquímica de muestras de artritis humana usando anticuerpos dirigidos hacia los marcadores de angiogénesis. La tinción más oscura indica una fuerte expresión del antígeno, visualizada mediante flechas blancas. F8 es una molécula de anticuerpo que se une al ED-A, desvelada en el presente documento, L19 es una molécula de anticuerpo que se une al ED-B (por ejemplo, Pini y col. 1998), F16 y G11 son moléculas de anticuerpo que se unen a los dominios A1 y C de tenascina-C, respectivamente (documento WO2006/050834).

La Figura 2 muestra los resultados del análisis de inmunofluorescencia en muestras de artritis humana usando la molécula de anticuerpo F8 dirigida contra el dominio ED-A de fibronectina. La tinción blanca indica una fuerte expresión del antígeno.

La figura 3 muestra un alineamiento entre A: el ED-A humano (secuencia superior) y B: el ED-A de ratón (secuencia inferior). Los asteriscos indican las posiciones de aminoácidos en las que los aminoácidos del ED-A humano y el ED-A de ratón son idénticos.

La Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo H1 anti-ED-A (SEQ ID NO: 12). La secuencia de nucleótidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo H1 anti-ED-A está subrayada. La secuencia de nucleótidos de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo H1 anti-ED-A se muestra en letras en cursiva y subrayadas. La secuencia de nucleótidos de la CDR3 de cadena pesada de anticuerpo H1 anti-ED-A se muestra en **letras en negrita y subrayadas**.

La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos de la secuencia del enlazador del anticuerpo H1 anti-ED-A (SEQ ID NO: 14).

La Figura 4C muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo H1 anti-ED-A (SEQ ID NO: 13). La secuencia de nucleótidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo H1 anti-ED-A está subrayada. La secuencia de nucleótidos de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo H1 anti-ED-A se muestra en letras en cursiva y subrayadas. La secuencia de nucleótidos de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo H1 anti-ED-A se muestra en **letras en negrita y subrayadas**.

La Figura 5A muestra la secuencia de aminoácido de la cadena pesada (VH) del anticuerpo H1 anti-ED-A (SEQ ID NO: 1). La secuencia de la CDR1 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 3) del anticuerpo H1 anti-ED-A está subrayada. La secuencia de la CDR2 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 4) del anticuerpo H1 anti-ED-A se muestra en letras en cursiva y subrayadas. La secuencia de la CDR3 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 5) del anticuerpo H1 anti-ED-A se muestra en **letras en negrita y subrayado**. La Figura 5B muestra la secuencia de aminoácidos de la secuencia del enlazador del anticuerpo H1 anti-ED-A (SEQ ID NO: 11).

La Figura 5C muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo H1 anti-ED-A (SEQ ID NO: 2). La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 6) del anticuerpo H1 anti-ED-A está subrayada. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 7) del anticuerpo H1 anti-ED-A se muestra en letras en cursiva y subrayadas. La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 8) del anticuerpo H1 anti-ED-A se muestra en **letras en negrita y subrayadas**.

La Figura 6 muestra la secuencia de una construcción de ácido nucleico que incluye una secuencia codificante para F8-IL10. La estructura es HINDIII secuencia de secreción F8 enlazador (enlazador de 14 aa) (SSSSG)₃-IL10-Parada-NotI, del modo siguiente: un sitio de restricción de HINDIII está subrayado, la secuencia que codifica la señal de secreción está en *cursiva*, la secuencia que codifica la VH de F8 está en **negrita** tras la secuencia de señal de secreción, la secuencia que codifica el enlazador de 14 aminoácidos está en minúsculas, la secuencia que codifica la VL del F8 está en **negrita** tras la secuencia del enlazador de 14 aminoácidos, una secuencia (SSSSG)₃ sigue a la secuencia que codifica F8 subrayada y en cursiva, la secuencia que codifica IL-10 está doblemente subrayada; la parada está después en minúsculas, seguida por un sitio de restricción de NOTI que está subrayado.

La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de un conjugado de scFv de anticuerpo (F8) con IL-10, que incluye enlazadores, de estructura: VH-enlazador-VL-enlazador-IL-10. Los dominios VH y VL están en **negrita**, el enlazador de scFv está en minúsculas, en enlazador entre scFv y IL10 está en minúsculas y en *cursiva*, la secuencia de IL-10 está subrayada.

La Figura 8 ilustra la clonación, expresión y purificación de F8-IL10 y HyHel10-IL10:

La Figura 8a muestra una representación esquemática de un vector pcDNA3.1 que contiene los elementos de las proteínas de fusión F8-IL10. El resto de IL10 humana se fusionó al extremo C-terminal del fragmento de anticuerpo scFv mediante el enlazador de 15 aminoácidos (SSSSG)₃. La secuencia de secreción en el extremo N-terminal se requiere para la secreción de proteínas recombinantes.

La Figura 8b muestra los resultados del análisis SDS-PAGE de proteínas de fusión purificadas: Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2 y 3, F8-IL10 en condiciones no reductoras y reductoras. Se espera que la proteína de fusión monomérica tenga un peso molecular de 46 kDa.

La figura 8c muestra un perfil de cromatografía por exclusión de tamaño de F8-IL10 purificada (Superdex 200). El pico que eluye a 13 ml de volumen de retención se corresponde con la forma homodimérica no covalente de F8-IL10, el pico más pequeño que eluye a un volumen de retención de 14 ml se corresponde con la porción monomérica.

La Figura 8d muestra los resultados de un ensayo de actividad de F8-IL10. La actividad de F8-IL10 se comparó con la de la IL10 humana recombinante en células MC/9.

40 TERMINOLOGÍA

Fibronectina

Fibronectina es un antígeno sometido a corte y empalme alternativo, y se conoce una serie de isoformas de fibronectina, tal como se describe en otra parte del presente documento. el Extradominio-A (EDA o ED-A) también se conoce como ED, repetición A extra de tipo III (EIIIA) o EDI. La secuencia del ED-A humano se ha publicado por Kornblihtt y col. (1984), Nucleic Acids Res. 12, 5853-5868 y Paoletta y col. (1988), Nucleic Acids Res. 16, 3545-3557. La secuencia del ED-A humano también está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1631-1720 (Fibronectina de tipo III 12; extradominio 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de acceso P02751. La secuencia del ED-A de ratón está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1721-1810 (Fibronectina tipo III 13; extradominio 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de acceso P11276.

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

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

5 *Corte y empalme alternativo*

El corte y empalme alternativo se refiere a la ocurrencia de diferentes patrones de corte y empalme de ADN de un transcrito primario de ARN para producir diferentes ARNm. Tras la escisión de los intrones, la selección puede determinar qué exones se cortan y empalman juntos para formar el ARNm. El corte y empalme alternativo lleva a la producción de diferentes isoformas que contienen diferentes exones y/o diferente número de exones. Por ejemplo, una isoforma puede comprender una secuencia de aminoácidos adicional correspondiente con uno o más exones, que pueden comprender uno o más dominios.

Miembro de unión

Esto describe un miembro de un par de moléculas que se unen entre sí. Los miembros de un par de unión puede tener origen natural o ser de origen total o parcialmente sintético. Un miembro del par de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se une a y es por tanto complementaria con una organización espacial particular y polar del otro miembro del par de moléculas. Los ejemplos de tipos de pares de unión son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. La presente invención se refiere a reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.

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

Un sitio de unión a antígeno se puede proporcionar por medio de la disposición de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de proteínas de estructura tales como fibronectina o citocromo B, etc. (Haan y Maggos, 2004; Koide 1998; Nygren 1997), aleatorizando o mutando restos de aminoácidos de un bucle en una proteína de estructura para conferir especificidad de unión para una diana deseada. Las estructuras para el diseño de nuevos sitios de unión en proteínas se han revisado en detalle en Nygren y col. (1997). Las estructuras de proteína para los imitadores de anticuerpos se desvelan en el documento WO/0034784, en el que los inventores describen proteínas (imitadores de anticuerpos) que incluyen un dominio de tipo III de fibronectina que tiene al menos un bucle aleatorizado. Una estructura adecuada en la que insertar una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de HCDR, se puede proporcionar mediante cualquier miembro de dominio de la superfamilia de genes de inmunoglobulina. La estructura puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de una proteína de estructura no de anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de unión a antígeno en una molécula de estructura que es más pequeña o más fácil de construir que al menos algunas moléculas de anticuerpo. El pequeño tamaño de un miembro de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles tales como una capacidad para introducirse en las células, para penetrar profundamente en tejidos o alcanzar dianas con otras estructuras, o para unirse a cavidades de proteínas del antígeno diana. El uso de sitios de unión a antígeno en proteínas de estructura no de anticuerpos se revisa en Wess, 2004. Lo típico son proteínas que tienen una estructura principal estable y uno o más bucles variables, en los que la secuencia de aminoácidos del bucle o de los bucles está mutada de manera específica o aleatorizada para crear un sitio de unión a antígeno que se une al antígeno diana. Tales proteínas incluyen los dominios de unión a IgG de proteína A de *S. aureus*, transferrina, tetranectina, fibronectina (por ejemplo, el 10^o dominio de tipo III de la fibronectina) y lipocalinas. Otras estrategias incluyen "microcuerpos" sintéticos (Selecore GmbH), que están basados en ciclótidos - pequeñas proteínas que tiene enlaces disulfuro intramoleculares.

Además de las secuencias de anticuerpo y/o un sitio de unión a antígeno, un miembro de unión para su uso en la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, que forman un péptido o polipéptido, tales como un dominio plegado, o para otorgarle a la molécula otra característica funcional además de la capacidad para unirse al antígeno. Los miembros de unión para su uso en la invención pueden llevar una etiqueta detectable o pueden conjugarse con una toxina o un resto de direccionamiento o enzima (por ejemplo, mediante un enlace peptídico o un enlazador). Por ejemplo, un miembro de unión puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático) así como un sitio de unión a antígeno, en el que el sitio de unión a antígeno se une al antígeno y por tanto dirige el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo, mediante escisión.

Aunque, como se ha señalado, las CDR las pueden llevar estructuras de no anticuerpos, la estructura para llevar una CDR o un conjunto de CDR será generalmente una secuencia de cadena pesada o de cadena ligera de anticuerpo o una porción sustancial del mismo en el que la CDR o el conjunto de CDR se localiza en una ubicación que se corresponde con la CDR o conjunto de CDR de los dominios variables de VH y VL de origen natural codificados por genes reordenados de inmunoglobulina. Las estructuras y las ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina se pueden determinar por referencia a Kabat 1987 y a las actualizaciones del mismo, actualmente disponibles en internet (en immuno.bme.nwu.edu o buscando "Kabat" usando cualquier buscador).

Con región CDR o CDR, se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas tal como se define por Kabat y col. (1987), (Kabat 1991a, y las últimas ediciones). Un anticuerpo típicamente contiene 3 CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término CDR y su plural se usa en el presente documento con el fin de indicar, según el caso, una o varias de estas regiones, o incluso la totalidad de estas regiones que contienen la mayoría de los restos de aminoácidos responsables de la unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítipo que lo reconoce.

Entre las seis secuencias cortas de CDR, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad, esencialmente debido a los mecanismos de reordenación de los genes que lo originan). Puede ser tan corta como 2 aminoácidos aunque el tamaño más largo conocido es de 26. Funcionalmente, HCDR3 desempeña un papel en parte en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal 1974; Amit 1986; Chothia 1987; Chothia 1989; Caton 1990; Sharon 1990a; Sharon 1990b; Kabat y col., 1991b).

Molécula de anticuerpo

Esto describe una inmunoglobulina bien natural o bien producida parcial o totalmente de forma sintética. La expresión también se refiere a cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo. Se debe entender en el presente documento que la invención no se refiere a los anticuerpos en la forma natural, es decir, que no están en su entorno natural pero que se ha sido capaz de aislarlos u obtenerlos mediante purificación a partir de fuentes naturales, o bien se pueden obtener mediante recombinación genética o mediante síntesis química y que entonces pueden contener aminoácidos no naturales tal como se describirá más adelante. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión a antígeno incluyen, pero sin limitación, moléculas de anticuerpo tales como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos.

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

Como los anticuerpos se pueden modificar de una serie de formas, la expresión "molécula de anticuerpo" debería interpretarse como que abarca cualquier miembro de unión o sustancia que tiene un sitio de unión a antígeno de anticuerpo con la especificidad y/o la unión a antígeno requerida. Por ende, esta expresión abarca fragmentos de anticuerpo y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo, tanto si es natural como si es total o parcialmente sintético. Las moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión a antígeno o similar, fusionado con otro polipéptido (por ejemplo, que proviene de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo) por lo tanto se incluyen. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en el documento EP-A-0120694 y en el documento EP-A-0125023 y en una gran cantidad de referencias posteriores.

Las técnicas adicionales disponibles en la materia de diseño de anticuerpo han hecho posible aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, los híbridos humanos se pueden preparar tal como se describe por Kontermann y Dubel (2001). La expresión en fago, otra técnica establecida para generar miembros de unión se ha descrito en detalle en muchas publicaciones tales como el documento WO92/01047 (tratado adicionalmente a continuación) y las patentes de Estados Unidos US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404 y Kontermann y Dubel (2001). Los ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpo de ratón están inactivados y funcionalmente reemplazados con genes de anticuerpo humano mientras se dejan intactos otros componentes del sistema inmunitario del ratón, se pueden usar para aislar anticuerpos humanos (Mendez, 1997).

Las moléculas de anticuerpo sintéticas se pueden crear mediante expresión a partir de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados y ensamblados en vectores de expresión adecuados, por ejemplo tal como se describe en Knappik y col. (2000) o Krebs y col. (2001).

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unirse a antígenos. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward 1989; McCafferty 1990; Holt 2003), que consiste en un dominio VH o en un dominio VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL se enlazan mediante un enlace peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird 1988; Huston 1988); (viii) dímeros de Fv biespecíficos de cadena simple (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos por fusión génica (documento WO94/13804; Holliger 1993a). Las moléculas de Fv, scFv o diacuerpo se pueden estabilizar mediante la incorporación de puentes disulfuro que enlazan los dominios VH y VL (Reiter 1996). Los anticuerpos que comprenden una scFv unida a un

dominio CH3 también se pueden preparar (Hu 1996). Otros ejemplos de fragmentos de unión son Fab', que difiere de los fragmentos Fab mediante la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada, que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo, y Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el que el (los) resto(s) de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre.

5 Los fragmentos de anticuerpo para su uso en la invención se pueden obtener comenzando a partir de cualquiera de las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento, por ejemplo, moléculas de anticuerpo que comprenden los dominios VH y/o VL o las CDR de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, mediante procedimientos tales como digestión por enzimas, tales como pepsina o papaína y/o mediante escisión de los puentes disulfuro mediante reducción química. De otra manera, los fragmentos de anticuerpo de la
10 presente invención se pueden obtener mediante técnicas de recombinación genética igualmente bien conocidas por el experto en la materia o bien mediante síntesis de péptidos por medio de, por ejemplo, sintetizadores automáticos de péptidos tales como los suministrados por la compañía Applied Biosystems, etc., o mediante síntesis y expresión de ácido nucleico.

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

Un dAb (anticuerpo de dominio) es un pequeño fragmento monomérico de unión a antígeno de un anticuerpo, a saber la región variable de una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo (Holt 2003). Los dAb de VH se dan de manera natural en camélidos (por ejemplo, camello, llama) y se pueden producir inmunizando a un camélido con un antígeno diana, aislando linfocitos B específicos de antígeno y clonando directamente los genes dAb a partir de linfocitos B individuales. Los dAb también son producibles en cultivo celular. Su pequeño tamaño, su buena solubilidad y su estabilidad a temperaturas los hace particular y fisiológicamente útiles y adecuados para la selección y maduración de la afinidad. Un miembro de unión de la presente divulgación puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL sustancialmente como se establece en el presente documento, o un dominio VH o VL que
20 comprende un conjunto de CDR sustancialmente como se establece en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "sustancialmente como se establece" se refiere a que la(s) característica(s) de las CDR relevantes del dominio VH o VL de los miembros de unión descritos en el presente documento serán o bien idénticas o altamente similares a las regiones especificadas en las que la secuencia se establece en el presente documento. Tal como se describe en el presente documento, la frase "altamente similar" con respecto a la(s) región(es) especificada(s) de uno o más dominios variables, contempla que desde 1 hasta
30 aproximadamente 5, por ejemplo de 1 a 4, incluyendo 1 a 3, o 1 o 2 o 3 o 4, sustituciones de aminoácidos se pueden hacer en la CDR y/o en el dominio VH o VL.

Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales forman una segunda generación de anticuerpos monoclonales en la que dos regiones variables diferentes se combinan en la misma molécula (Holliger 1999). Su uso se ha demostrado tanto en el campo de diagnóstico como en el campo de terapia a partir de su capacidad para reclutar nuevas funciones efectoras o para dirigirse a varias moléculas en la superficie de células tumorales. Cuando se van a usar anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que se pueden fabricar de una variedad de formas (Holliger 1993b), por ejemplo, químicamente preparadas o a partir de hibridomas híbridos, o puede ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente. Estos anticuerpos se pueden obtener mediante procedimientos químicos (Glennie 1987; Repp 1995) o procedimientos somáticos (Staerz 1986; Suresh 1986) pero igualmente mediante técnicas de ingeniería genética que permiten que se fuerce la heterodimerización y por tanto se facilite el proceso de purificación del anticuerpo buscado (Merchand 1998). Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen los de tecnología BiTE™ en los que los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad se pueden usar y enlazar directamente mediante péptidos cortos flexibles. Esto combina dos anticuerpos en una única cadena de polipéptidos corta. Los diacuerpos y la scFv se pueden construir sin una región Fc, usando solamente dominios variables, que potencialmente reducen los efectos de la reacción antiidiotípica.
35

Los anticuerpos biespecíficos se pueden construir como una IgG entera, como Fab'2 biespecífica, como Fab'PEG, como diacuerpos o bien como scFv biespecíficos. Adicionalmente, se pueden enlazar dos anticuerpos biespecíficos usando procedimientos habituales conocidos en la materia para formar anticuerpos tetravalentes.
40

Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos biespecíficos completos, también pueden ser particularmente útiles porque se pueden construir y expresar fácilmente en *E.coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión apropiada se pueden seleccionar fácilmente usando la expresión en fago (documento WO94/13804) de las bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo se mantiene constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra un anticuerpo diana, entonces se puede generar una biblioteca en la que el otro brazo varía y se selecciona un anticuerpo de especificidad apropiada. Los anticuerpos biespecíficos completos se pueden generar mediante procedimientos de diseño alternativos tal como se describe en Ridgeway 1996.
45

En la materia están disponibles diversos procedimientos para obtener anticuerpos frente a un antígeno diana. Los

anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, especialmente de origen humano, murino, quimérico o humanizado, que se pueden obtener de acuerdo con los procedimientos convencionales bien conocidos por el experto en la materia.

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

10 Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener, por ejemplo, a partir de una célula animal inmunizada frente a A-FN o uno de sus fragmentos que contienen el epítipo reconocido mediante dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo, un fragmento que comprende o que consiste en el ED-A, o un fragmento de péptido del ED-A. El A-FN, o uno de sus fragmentos, se puede producir de manera específica de acuerdo con los procedimientos comunes de trabajo, mediante recombinación genética comenzando con una secuencia de ácido nucleico contenida en la secuencia de ADNc codificada por A-FN o un fragmento del mismo, por síntesis de péptidos comenzando a partir de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia de péptidos de A-FN y/o un fragmento del mismo.

15 Los anticuerpos monoclonales pueden, por ejemplo, purificarse en una columna de afinidad en la que A-FN o uno de sus fragmentos que contienen el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo, un fragmento que comprende o que consiste en el ED-A o un fragmento del ED-A, se ha inmovilizado previamente. Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar mediante cromatografía en proteína A y/o G, seguido o no por cromatografía de intercambio iónico enfocada a eliminar los contaminantes proteicos residuales así como el ADN y el LPS, en sí, seguido o no por cromatografía de exclusión en gel de sefarsa con el fin de eliminar los posibles agregados debido a la presencia de dímeros o de otros multímeros. El conjunto de estas técnicas se puede usar de
20 manera simultánea o de manera sucesiva.

Sitio de unión a antígeno

25 Esto describe la parte de una molécula que se une a y es complementaria a todos o parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo se refiere como el sitio de unión a antígeno de anticuerpo, y comprende la parte del anticuerpo que se une a y que es complementaria con todos o parte del antígeno diana. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo solo puede unirse a una parte determinada del antígeno, cuya parte se denomina un epítipo. Un sitio de unión a antígeno se puede proporcionar mediante uno o más dominios variables del anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno de anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH).

30 *Aislado*

Esto se refiere al estado en el que los miembros de unión para su uso en la invención o el ácido nucleico que codifica tales miembros de unión, estará generalmente de acuerdo con la presente invención. Por ende, los miembros de unión, los dominios VH y/o VL de la presente invención se pueden proporcionar aislados y/o purificados, por ejemplo, a partir de su entorno natural, de forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso
35 de ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origen distinto al de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. Los miembros aislados y el ácido nucleico aislado estará libre o sustancialmente libre de material con el que se asocian de manera natural tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular) cuando tal preparación se realiza *in vitro* o *in vivo* mediante tecnología del ADN recombinante. Los miembros
40 y el ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o adyuvantes y, aún con fines prácticos, se pueden aislar - por ejemplo los miembros normalmente se mezclarán con gelatina u otros vehículos si se usan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usan en diagnóstico o en terapia. Los miembros de unión se pueden glicosilar, bien de manera natural o mediante sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NS0 (ECACC 85110503), o pueden estar (por ejemplo si se producen mediante la expresión en una célula procarionota) sin glicosilar.
45

Las preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpo también se pueden usar en la invención. Por ejemplo, tales preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de lisina en el extremo C-terminal, con diversos grados de glicosilación y/o con aminoácidos derivados, tales como ciclización de un ácido glutámico en el extremo N-terminal para formar un resto
50 de ácido piroglutámico.

Uno o más miembros de unión para un antígeno, por ejemplo el A-FN o el ED-A de fibronectina, se pueden obtener poniendo en contacto una biblioteca de miembros de unión de acuerdo con la invención y el antígeno o el fragmento del mismo, por ejemplo, un fragmento que comprende o consiste en el ED-A o un fragmento de péptido del ED-A y seleccionando uno o más miembros de unión de la biblioteca capaces de unirse al antígeno.

55 Se puede explorar una biblioteca de anticuerpos usando la exploración iterativa de colonias en filtros (ICFS, del inglés *Iterative Colony Filter Screening*). En la ICFS, las bacterias que contienen el ADN que codifica varias especificidades de unión se cultivan en medio líquido y, una vez se ha alcanzado la etapa de crecimiento exponencial, algunos miles de millones de ellos se distribuyen en un soporte de crecimiento que consiste en un filtro de

membrana pretratado de manera adecuada que se incubaba hasta que aparecen colonias de bacterias completamente confluentes. Un segundo sustrato trampa consiste en otro filtro de membrana, prehumidificado y recubierto con el antígeno deseado.

5 El filtro de membrana trampa se colocan entonces en una placa que contiene un medio de cultivo adecuado y se recubre con el filtro de crecimiento con la superficie recubierta con colonias bacterianas apuntando hacia arriba. El sándwich obtenido entonces se incubaba a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas. Es, por tanto, posible obtener la expresión de los genes que codifican fragmentos scFv de anticuerpo que tienen una acción expansiva, de manera que aquellos fragmentos que se unen de manera específica con el antígeno que está presente en la membrana de la trampa quedan atrapados. La membrana de trampa entonces se trata para señalar los fragmentos scFv de anticuerpo unidos con técnicas colorimétricas comúnmente usadas para este fin.

10 La posición de las manchas coloreadas en el filtro de trampa permite volver a las correspondientes colonias bacterianas que están presentes en la membrana de crecimiento y producir los fragmentos de anticuerpo atrapados. Tales colonias se recolectan y se cultivan y las bacterias, unos pocos millones de ellas, se distribuyen en una nueva membrana de cultivo repitiendo los procedimientos descritos anteriormente. Los ciclos análogos se llevan a cabo entonces hasta que las señales positivas en la membrana de la trampa se corresponden con colonias positivas únicas, cada una de las cuales representa una posible fuente de fragmentos de anticuerpo monoclonal dirigidos contra el antígeno usado en la selección. la ICFS se describe por ejemplo en el documento WO0246455.

15 Una biblioteca también se puede expresar en partículas o complejos moleculares, por ejemplo, paquetes genéticos replicables tales como partículas de bacteriófago (por ejemplo, T7), u otros sistemas de expresión *in vitro*, conteniendo cada partícula o complejo molecular ácido nucleico que codifica el dominio variable VH de anticuerpo expresado en él, y opcionalmente también un dominio VL expresado si está presente. La expresión en fago se describe en el documento WO92/01047, y por ejemplo en las patentes de Estados Unidos US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 y US6521404.

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

25 Un dominio variable VH de anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio variable VH de anticuerpo de un dicho miembro de unión seleccionado se puede proporcionar de forma aislada, como puede ser un miembro de unión que comprende tal dominio VH.

30 La capacidad para unirse a A-FN o al ED-A de la fibronectina u otro antígeno diana o isoforma se puede ensayar adicionalmente, por ejemplo, la capacidad para competir con, por ejemplo, uno cualquiera de los anticuerpos anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9 por la unión a A-FN o a un fragmento del A-FN, por ejemplo, el ED-A de fibronectina.

35 Un miembro de unión para su uso en la invención se puede unir al A-FN y/o al ED-A de fibronectina de manera específica. Un miembro de unión de la presente invención se puede unir al A-FN y/o al ED-A de fibronectina con la misma afinidad que el anticuerpo anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9, por ejemplo en formato scFv o con una afinidad que es mejor. Un miembro de unión para su uso en la invención se puede unir al A-FN y/o al ED-A de fibronectina con una K_D de 3×10^{-8} M o una afinidad que es mejor. Preferentemente, un miembro de unión para su uso en la invención se una al A-FN y/o al ED-A de fibronectina con una K_D de 2×10^{-8} M o una afinidad que es mejor. Más preferentemente, un miembro de unión para su uso en la invención se una al A-FN y/o al ED-A de fibronectina con una K_D de $1,7 \times 10^{-8}$ M o una afinidad que es mejor. Aún más preferentemente, un miembro de unión para su uso en la invención se una al A-FN y/o al ED-A de fibronectina con una K_D de $1,4 \times 10^{-8}$ M o una afinidad que es mejor. Más preferentemente, un miembro de unión para su uso en la invención se una al A-FN y/o al ED-A de fibronectina con una K_D de 3×10^{-9} M o una afinidad que es mejor.

40 Un miembro de unión de la presente invención se puede unir al mismo epítipo en A-FN y/o al ED-A de fibronectina como el anticuerpo anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9.

45 Un miembro de unión para su uso en la invención no puede presentar cualquier unión significativa a moléculas que no sean el AFN y/o el ED-A de fibronectina. En particular, el miembro de unión no se puede unir a otras isoformas de fibronectina, por ejemplo a la isoforma ED-B y/o a la isoforma IIICS de la fibronectina.

50 Las variantes de moléculas de anticuerpo desveladas en el presente documento se pueden producir y usar en la presente divulgación. Las técnicas requeridas para hacer sustituciones en las secuencias de aminoácidos de las CDR, los dominios VH o VL del anticuerpo y los miembros de unión generalmente están disponibles en la materia. Las secuencias de variante se pueden hacer, con sustituciones que se pueden o no predecir que tienen un efecto mínimo o beneficioso en la actividad, y ensayar la capacidad para unirse al A-FN y/o al ED-A de fibronectina y/o para

cualquier otra propiedad deseada.

Las variantes de secuencia de aminoácido del dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se desvelan de manera específica en el presente documento se pueden emplear de acuerdo con la presente divulgación, tal como se trata. Las variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un resto de aminoácido), puede ser menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de aproximadamente 10 alteraciones o menos de aproximadamente 5 alteraciones, quizás 5, 4, 3, 2 o 1. Las alteraciones se pueden hacer en una o más regiones marco y/o una o más CDR. Las alteraciones normalmente no dan como resultado la pérdida de función, de manera que un miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos alterada de ese modo puede mantener la capacidad de unirse a A-FN y/o al ED-A de fibronectina. Por ejemplo, puede mantener la misma unión cuantitativa que un miembro de unión en el que la alteración no se produce, por ejemplo tal como se mide en un ensayo descrito en el presente documento. El miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos alterada de este modo puede tener una capacidad mejorada para unirse a A-FN y/o al ED-A de fibronectina.

Las nuevas regiones VH o VL que llevan secuencias derivadas de CDR para su uso en la divulgación se pueden generar usando mutagénesis aleatorizada de uno o más genes de VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones en todo el dominio variable. En algunas divulgaciones se hacen una o dos sustituciones de aminoácidos en todo el dominio variable o conjunto de CDR. Otro procedimiento que se puede usar es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de los genes de VH o VL.

Como se ha indicado anteriormente, una secuencia de aminoácidos de CDR sustancialmente como la expuesta en el presente documento se puede llevar como una CDR en un dominio variable de anticuerpo humano o una porción sustancial del mismo. Las secuencias de HCDR3 sustancialmente como las expuestas en el presente documento representan realizaciones de la presente invención y, por ejemplo, cada una de ellas se puede llevar como una HCDR3 en un dominio variable de cadena pesada humana o una porción sustancial del mismo.

Los dominios variables empleados en la invención se pueden obtener o derivar de cualquier línea germinal o dominio variable humano reordenado, o puede ser un dominio variable sintético basado en consenso o en secuencias reales de dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable puede provenir de un anticuerpo no humano. Una secuencia de CDR para su uso en la invención (por ejemplo CDR3) se puede introducir en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (por ejemplo, CDR3) usando la tecnología del ADN recombinante. Por ejemplo, Marks y col. (1992) describen procedimientos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpo en los que los cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' de la superficie del dominio variable se usan junto con los cebadores consenso para la tercera región marco de los genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una CDR3. Marks y col. describen adicionalmente cómo este repertorio se puede combinar con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención se pueden barajar con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos barajados combinados con un dominio VL o VH afín para proporcionar miembros de unión para su uso en la invención. El repertorio se puede expresar después en un sistema de hospedador adecuado tal como el sistema de expresión en fago del documento WO92/01047 o cualquiera de una gran cantidad de referencias posteriores, incluyendo Kay, Winter y McCafferty (1996), de manera que los miembros de unión adecuados se pueden seleccionar. Un repertorio puede consistir en cualquier cosa a partir de 10^4 miembros individuales en adelante, por ejemplo, al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 o al menos 10^{10} miembros.

De forma análoga, una o más, o todas las tres CDR se pueden insertar en un repertorio de dominios VH o VL que se seleccionan entonces para un miembro de unión o miembros de unión para el A-FN y/o el ED-A de fibronectina.

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

De forma análoga, otros dominios de VH y VL, conjuntos de CDR y conjuntos de HCDR y/o conjuntos de LCDR desvelados en el presente documento se pueden emplear.

El A-FN y/o el ED-A de fibronectina se puede usar en una selección para miembros de unión, por ejemplo, moléculas de anticuerpo, para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide. La selección puede ser una selección de un repertorio tal como se desvela en otra parte del presente documento.

Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina puede comprender al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones marco de intervención. La porción también puede incluir al menos aproximadamente el 50 % de cualquiera o ambos de la primera y cuarta regiones marco, siendo el 50 % el 50 % del C-terminal de la primera región marco y el 50 % del N-terminal de la cuarta región marco. Los restos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos normalmente asociados con regiones de dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión de la presente

invención hecha mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de restos de N-terminal o C-terminal codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir los dominios variables desvelados en otra parte en el presente documento a secuencias de proteína adicionales que incluyen las regiones constantes del anticuerpo, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o etiquetas detectables/funcionales tal como se trata en más detalle en alguna parte del presente documento.

Aunque los miembros de unión pueden comprender un par de dominios VH y VL, los únicos dominios de unión basados bien en las secuencias de dominio de VH o VL también se pueden usar en la divulgación. Es sabido que los dominios simples de inmunoglobulinas, especialmente los dominios VH, son capaces de unirse a antígenos diana de una manera específica. Por ejemplo, véase el tratamiento de los dAbs anterior.

En el caso de cualquiera de los dominios simples de unión, estos dominios se pueden usar para explorar dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión de dos dominios capaz de unirse al A-FN y/o al ED-A de fibronectina. Esto se puede lograr mediante procedimientos de exploración de expresión en fago que usan el, así llamado, enfoque combinatorio doble jerárquico tal como se desvela en el documento WO92/01047, en el que una colonia individual que contiene bien un clon de cadena H o de L se usa para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión de cadena doble resultante se selecciona de acuerdo con las técnicas de expresión en fago tales como las descritas en esa referencia. Esta técnica también se desvela en Marks 1992.

Los miembros de unión para su uso en la presente invención pueden comprender adicionalmente regiones constantes de anticuerpos o partes de las mismas, por ejemplo, regiones constantes de anticuerpos humanos o partes de las mismas. Por ejemplo, se puede unir un dominio VL en su extremo C-terminal a los dominios constantes de la cadena ligera del anticuerpo que incluyen las cadenas C κ o C λ , por ejemplo C λ . De forma análoga, un miembro de unión basado en un dominio VH se puede unir en su extremo C-terminal a toda o parte (por ejemplo, un dominio CH1) de una cadena pesada de inmunoglobulina que proviene de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las subclases del isotipo, particularmente IgG1 y IgG4. Cualquier variante sintética u otra región constante que tenga estas propiedades y establezca regiones variables es también útil en las realizaciones de la presente invención.

Los miembros de unión para su uso en la invención se pueden etiquetar con una etiqueta detectable o funcional. Una etiqueta puede ser cualquier molécula que produce o que puede inducir la producción de una señal, incluyendo pero sin limitarse a fluorescentes, radiomarcadores, enzimas, quimioluminiscentes o fotosensibilizadores. Por ende, la unión se puede detectar y/o medir mediante la detección de fluorescencia o luminiscencia, radiactividad, actividad enzimática o absorbancia de luz. Las etiquetas detectables se pueden unir a anticuerpos para su uso en la invención usando química convencional conocida en la materia.

Existen numerosos procedimientos mediante los cuales la etiqueta puede producir una señal detectable por medios externos, por ejemplo, mediante examen visual, radiación electromagnética, calor y reactivos químicos. La etiqueta también se puede unir a otro miembro de unión que se une al anticuerpo para su uso en la invención o a un soporte.

Los miembros de unión etiquetados, por ejemplo, scFv etiquetado con una etiqueta detectable, se puede usar para diagnóstico *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* y/o para terapia.

Por ejemplo, los miembros de unión radiomarcados (por ejemplo, miembros de unión conjugados con un radioisótopo) se pueden usar en radiodiagnóstico y radioterapia. Los radioisótopos que se pueden conjugar con un miembro de unión para su uso en la invención incluyen isótopos tales como ^{94m}Tc , ^{99m}Tc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{47}Sc , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{121}Sn , ^{161}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{105}Rh , ^{177}Lu , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I y ^{131}I .

Por ejemplo, se puede usar un miembro de unión para su uso en la divulgación etiquetado con una etiqueta detectable para detectar, diagnosticar o controlar la artritis reumatoide en un ser humano o animal.

Un miembro de unión de la presente divulgación se puede usar para la fabricación de un producto de diagnóstico para su uso en el diagnóstico de artritis reumatoide.

La presente divulgación proporciona un procedimiento de detección o de diagnóstico de artritis reumatoide en un ser humano o animal que comprende:

- (a) administrar al ser humano o animal un miembro de unión de la presente invención, por ejemplo, etiquetado con una etiqueta detectable, que se une a la isoforma ED-A de fibronectina y/o al ED-A de fibronectina y
- (b) determinar la presencia o ausencia del miembro de unión en la neovasculatura del cuerpo humano o del animal;

en el que la localización del miembro de unión en la neovasculatura en el ser humano o animal es indicativa de la presencia de artritis reumatoide.

Cuando el miembro de unión se etiqueta con una etiqueta detectable, la presencia o ausencia de la etiqueta

detectable se puede determinar mediante detección de la etiqueta.

5 En la presente invención se puede emplear un conjugado o fusión entre un miembro de unión para su uso en la invención y una molécula que ejerce un efecto biocida, inmunosupresor citotóxico o antiinflamatorio en células diana en las lesiones y un anticuerpo dirigido contra un componente de la matriz extracelular que está presente en tales lesiones. Por ejemplo, la molécula conjugada puede ser, entre otras, interleucina-10, un antiinflamatorio u otro fármaco, un fotosensibilizador o un radionucleido. Tales conjugados se pueden usar de manera terapéutica, por ejemplo, para el tratamiento de artritis reumatoide tal como se menciona en el presente documento.

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

10 La invención proporciona un procedimiento de tratamiento de artritis reumatoide, comprendiendo el procedimiento la administración a un individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión para su uso en la invención.

15 El miembro de unión puede ser un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto antiinflamatorio en células diana mediante interacción celular, una molécula antiinflamatoria, IL-10, TGF beta u otro fármaco y (ii) un miembro de unión para la isoforma ED-A de fibronectina y/o el ED-A de fibronectina.

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

20 El miembro de unión puede ser un conjugado de (i) interleucina-10 (IL10) o TGF beta y (ii) un miembro de unión para la isoforma ED-A de fibronectina y/o el ED-A de fibronectina. Tal miembro de unión es útil en aspectos de la invención desvelados en el presente documento referidos al tratamiento de la artritis reumatoide.

La invención proporciona el uso de un miembro de unión para su uso en la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide.

25 El miembro de unión puede ser un conjugado o una fusión a una molécula que ejerce un efecto biocida, citotóxico, inmunosupresor o antiinflamatorio tal como se describe en el presente documento. El miembro de unión puede ser un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico en células diana mediante interacción molecular o tiene un efecto inmunosupresor o antiinflamatorio y (ii) un miembro de unión para la fibronectina humana de acuerdo con la presente invención.

30 También se describe en el presente documento un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico en células diana mediante interacción celular, o un efecto inmunosupresor o antiinflamatorio y (ii) un miembro de unión para la fibronectina humana según para su uso en la presente invención. Tal conjugado preferentemente comprende una proteína de fusión que comprende la molécula biocida, citotóxica, inmunosupresora o antiinflamatoria y un dicho miembro de unión, o, cuando el miembro de unión es de cadena doble o de cadena múltiple, una proteína de fusión que comprende la molécula biocida, citotóxica, inmunosupresora o antiinflamatoria y un componente de cadena polipeptídica de dicho miembro de unión. Preferentemente, el miembro de unión es un polipéptido de cadena simple, por ejemplo, una molécula de anticuerpo de cadena simple, tal como scFv.

Se puede usar en la invención una proteína de fusión que comprende la molécula inmunosupresora o antiinflamatoria y una molécula de anticuerpo Fv de cadena simple.

40 La molécula inmunosupresora o antiinflamatoria que ejerce su efecto en células diana mediante interacción celular, puede interaccionar directamente con las células diana, puede interaccionar con un receptor de unión a membrana en la célula diana o alterar el potencial electroquímico de la membrana celular. En una realización ejemplar preferida la molécula es IL-10.

45 Tal como se trata adicionalmente a continuación, el miembro de unión específico es preferentemente un anticuerpo o comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo. Convenientemente, el miembro de unión específico puede ser un polipéptido de cadena simple, tal como un anticuerpo de cadena simple. Esto permite la producción conveniente de una proteína de fusión que comprende anticuerpo de cadena simple y molécula inmunosupresora o antiinflamatoria (por ejemplo, interleucina-10 o TGF beta). Se puede proporcionar un sitio de unión a antígeno por medio de la asociación de un dominio VH de anticuerpo y un dominio VL de anticuerpo en polipéptidos separados, por ejemplo, en un anticuerpo completo o en un fragmento de anticuerpo tal como Fab o diacuerpo. Cuando el miembro de unión específica es una molécula de cadena doble o de cadena múltiple (por ejemplo, Fab o el anticuerpo completo, respectivamente), la molécula inmunosupresora o antiinflamatoria se puede conjugar como un polipéptido de fusión con una o más cadenas de polipéptidos en el miembro de unión específica.

55 El miembro de unión se puede conjugar con la molécula inmunosupresora o antiinflamatoria por medio de un enlace peptídico, es decir, en un polipéptido de fusión que comprende dicha molécula y el miembro de unión específica o un componente de la cadena polipeptídica del mismo (véase por ejemplo Trachsel y col.). Otros medios de conjugación incluyen la conjugación química, especialmente la formación de enlaces transversales usando un reactivo bifuncional

(por ejemplo, empleando la Guía de selección de reactivos para la formación de enlaces transversales DOUBLE-REAGENTS™, Pierce).

5 También se describe en el presente documento un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión para su uso en la presente invención. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN. Un ácido nucleico puede codificar una CDR o un conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión a antígeno de anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG, por ejemplo, IgG1, tal como se define anteriormente. Las secuencias de nucleótidos pueden codificar los dominios VH y/o VL desvelados en el presente documento.

En el presente documento se describen adicionalmente construcciones en la forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o de expresión que comprenden al menos un polinucleótido tal como se describe anteriormente.

10 También se describe una célula hospedadora recombinante que comprende una o más construcciones como las anteriores. Se describe un ácido nucleico que codifica cualquier CDR o conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión a antígeno de anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG1 o IgG4 tal como se proporciona, como también un procedimiento de producción del producto codificado, cuyo procedimiento comprende la expresión a partir del ácido nucleico codificante. La expresión se puede lograr de manera conveniente cultivando en condiciones apropiadas las células hospedadoras que contienen el ácido nucleico. Tras la producción mediante la expresión, un dominio VH o VL o un miembro de unión se puede aislar y/o purificar usando cualquier técnica adecuada, después se usa según corresponda.

20 Un ácido nucleico puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos tal como se expone en el presente documento abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U se sustituye por T, salvo que el contexto requiera otra cosa.

También se describe un procedimiento de un dominio variable VH de anticuerpo, incluyendo el procedimiento el provocar la expresión a partir del ácido nucleico codificante. Tal procedimiento puede comprender cultivar células hospedadoras en condiciones para la producción de dicho dominio variable VH de anticuerpo.

25 Un procedimiento de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto. Un procedimiento de producción puede comprender formular el producto en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células hospedadoras es bien conocido. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, hongos filamentosos, levaduras y sistemas de baculovirus y plantas y animales transgénicos. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariotas está bien establecido en la materia. Para una revisión, véase por ejemplo Plückthun 1991. Un hospedador bacteriano común es *E.coli*.

35 La expresión en células eucariotas en cultivo está también disponible para los expertos en la materia como una opción para la producción de un miembro de unión, por ejemplo Chadd y Chamow (2001), Andersen y Krummen (2002), Larrick y Thomas (2001). Las líneas celulares de mamífero disponibles en la materia para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células renales de cría de hámster, células NS0 de melanoma de ratón, células YB2/0 de mieloma de rata, células renales de embrión humano, células retinianas de embrión humano y muchas otras.

40 Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según corresponda. Los vectores pueden ser plásmidos, por ejemplo fagémido, o víricos, por ejemplo fago, según corresponda. Para más detalles, véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001). Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación del ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica y análisis de proteínas, se describen en detalle en Ausubel 1999.

50 Una célula hospedadora puede contener un ácido nucleico tal como se describe en el presente documento. Tal célula hospedadora puede estar *in vitro* y puede estar en cultivo. Tal célula hospedadora puede estar *in vivo*. La presencia *in vivo* de la célula hospedadora puede permitir la expresión intracelular de un miembro de unión para su uso en la presente invención como "intracuerpos" o anticuerpos intracelulares. Los intracuerpos se pueden usar para la terapia génica.

55 También se describe un procedimiento que comprende la introducción de un ácido nucleico desvelado en el presente documento en una célula hospedadora. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transfección de fosfato cálcico, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposoma y transducción usando retrovirus u otro virus, por ejemplo, vacuna o, para células de insecto, baculovirus. La introducción de ácido nucleico en la célula hospedadora, en particular una célula eucariota puede usar un sistema vírico o basado en plásmido. El sistema de plásmido se puede mantener a modo de episoma o se puede incorporar en la célula hospedadora o en un cromosoma artificial. La

incorporación puede ser bien mediante aleatorización o mediante integración dirigida de una o más copias de un solo o de múltiples loci. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transformación de cloruro de calcio, la electroporación y la transfección usando bacteriófago.

5 La introducción puede estar seguida de provocar o permitir la expresión a partir del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando las células hospedadoras en condiciones para la expresión del gen. La purificación del producto expresado se puede lograr mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia.

El ácido nucleico se puede integrar en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula hospedadora. La integración se puede promover mediante la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con las técnicas convencionales.

10 También se describe un procedimiento que comprende el uso de una construcción tal como se indicó anteriormente en un sistema de expresión con el fin de expresar un miembro de unión o polipéptido como anteriormente.

15 Los miembros de unión para su uso en la presente invención se diseñan para su uso en procedimientos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, por ejemplo, el ser humano. Los miembros de unión para su uso en la invención se pueden usar, tal como se desvela, en el diagnóstico o, de acuerdo con la invención, para el tratamiento de artritis reumatoide.

20 Por consiguiente, la invención proporciona procedimientos de tratamiento que comprenden la administración de un miembro de unión tal como se proporciona, composiciones farmacéuticas que comprenden tal miembro de unión, y el uso de tal miembro de unión en la fabricación de un medicamento para la administración, por ejemplo, en un procedimiento de preparación de un medicamento o composición farmacéutica que comprende formular el miembro de unión con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y se adaptarán por el experto en la materia en función de la naturaleza y del modo de administración del(los) compuesto(s) activo(s) elegido(s).

25 Los miembros de unión para su uso en la presente invención normalmente se administrarán en la forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación, y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia. Tales materiales no deberían ser tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerán de la vía de administración, que puede ser oral, inhalada o mediante inyección, por ejemplo, intravenosa.

30 Las composiciones farmacéuticas para la administración oral tales como por ejemplo nanocuerpos, etc. también se conciben en la presente invención. Tales formulaciones orales pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, forma líquida o semisólida. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprende un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceites minerales o aceites sintéticos. Se puede incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

35 Para la inyección intravenosa o la inyección en el lugar de aflicción, el principio activo estará en la forma de una solución acuosa aceptable por vía parenteral que es sin pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia serán capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactada. Se pueden emplear conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y otros aditivos según sea necesario. Muchos procedimientos para la preparación de formulaciones farmacéuticas son conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Robinson, 1978.

40 Se puede administrar una composición sola o en combinación con otros tratamientos, de manera concurrente o de manera secuencial o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, dependiendo de la afección a tratar.

45 Se puede usar un miembro de unión para su uso en la presente invención como parte de una terapia de combinación junto con un componente medicinal adicional. Los tratamientos de combinación se pueden usar para proporcionar efectos sinérgicos significativos, particularmente la combinación de un miembro de unión para su uso en la presente invención con uno u otros fármacos más. Un miembro de unión para su uso en la presente invención se puede administrar de manera concurrente o de manera secuencial o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, para el tratamiento de una o más de las afecciones enumeradas en el presente documento.

50 Por ejemplo, se puede usar un miembro de unión en la invención en combinación con un agente terapéutico existente para el tratamiento de la artritis reumatoide.

55

Los agentes terapéuticos existentes para el tratamiento de artritis reumatoide incluyen IL-10, TGFbeta, fotosensibilizadores o fármacos citotóxicos.

5 Se puede usar un miembro de unión para su uso en la invención y uno o más de los componentes medicinales adicionales en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para la administración separada o combinada a un individuo, y por consiguiente puede comprender el miembro de unión y el componente adicional como una preparación combinada o como preparaciones separadas. Las preparaciones separadas se pueden usar para facilitar la administración separada y secuencial o simultánea, y permitir la administración de los componentes mediante diferentes vías, por ejemplo, administración oral y parenteral.

10 De acuerdo con la presente invención, las composiciones proporcionadas se pueden administrar a mamíferos. La administración puede ser en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo ésta suficiente para presentar beneficios para un paciente. Tales beneficios pueden ser al menos mejorar al menos un síntoma. Por lo tanto, el "tratamiento de la artritis reumatoide" se refiere a la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la tasa y evolución temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando, el mamífero particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el lugar de administración de la composición, el tipo del miembro de unión, el procedimiento de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los practicantes médicos. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones en la dosificación, etc., está bajo la responsabilidad de los practicantes generales y otros médicos y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o de la progresión de una enfermedad que se esté tratando. Las dosis apropiadas de anticuerpo son bien conocidas en la materia (Ledermann 1991 y Bagshawe 1991). Se pueden usar las dosificaciones específicas indicadas en el presente documento, o en Physician's Desk Reference (2003) como apropiadas para el tipo de medicamento que se está administrando. Se puede determinar una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis adecuada de un miembro de unión para su uso en la invención comparando su actividad *in vitro* e *in vivo* en un modelo animal. Los procedimientos de extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de ensayo a humanos son conocidos. La dosis precisa dependerá de una serie de factores, que incluyen si el anticuerpo es para el diagnóstico, para la prevención o para el tratamiento, el tamaño y localización del área a tratar, la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo completo, fragmento o diacuerpo) y la naturaleza de cualquier etiqueta detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis típica de anticuerpo estará en el intervalo de 100 µg a 1 g para aplicaciones sistémicas, y de 1 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. Se puede administrar una dosis inicial de carga más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo completo, por ejemplo el isotipo IgG 1 o IgG4. Esta es una dosis para un único tratamiento de un paciente adulto, que se puede ajustar de manera proporcional para niños y lactantes, y también para otros formatos de anticuerpo en proporción con el peso molecular. Los tratamientos se pueden repetir en intervalos diarios, de dos veces a la semana, semanales o mensuales, a discreción del médico. Los tratamientos pueden ser cada dos a cuatro semanas para la administración subcutánea y cada cuatro a ocho semanas para la administración intravenosa. En algunas realizaciones de la presente invención, el tratamiento es periódico, y el período entre las administraciones es de aproximadamente dos semanas o más, por ejemplo aproximadamente dos semanas o más, aproximadamente cuatro semanas o más, o aproximadamente una vez al mes. En otras realizaciones de la invención, el tratamiento se puede dar antes y/o después de la cirugía y se puede administrar o aplicar directamente en el lugar anatómico del tratamiento quirúrgico.

40 Los aspectos y las realizaciones adicionales de la invención serán evidentes para los expertos en la materia dada la presente divulgación que incluye la siguiente ejemplificación experimental.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

RESULTADOS

Análisis histoquímico de muestras de artritis humana

45 La expresión de los dominios EDA y EDB de fibronectina así como de los dominios A1 y C de tenascina-C se investigaron mediante inmunohistoquímica en muestras de artritis humana usando los anticuerpos F8, L19, F16 y G11, respectivamente.

50 En la Figura 1, la tinción más oscura indica la expresión de los respectivos antígenos (indicada con flechas blancas). El anticuerpo F8 anti-EDA llevó a la tinción más fuerte, por lo tanto todos los experimentos adicionales se realizaron con este anticuerpo.

Se realizaron experimentos de inmunofluorescencia con el anticuerpo F8 que mostraron una buena tinción perivascular (visible como estructuras blancas en la Figura 2).

El anticuerpo monoclonal humano F8 se acumula de manera selectiva en lugares de artritis en ratones

55 Los inventores estudiaron el direccionamiento *in vivo* de F8 en formato de mini-anticuerpo (SIP) (Borsi y col. 2002) en el modelo de ratón CIA (Courtney y col. 1980) usando tanto fluorescencia como radiactividad para la detección de anticuerpos. El formato SIP consiste en un fragmento de anticuerpo scFv unido al dominio CH4 de la IgE humana que da lugar a una proteína homodimérica de 80 kDa de tamaño.

Se inyectó a los ratones con artritis con SIP(F8) etiquetado con el tinte de infrarrojo cercano Alexa 750. Veinticuatro horas tras la inyección intravenosa, se obtuvieron imágenes de los ratones usando un generador de imágenes por fluorescencia infrarroja (Birchler y col., 1999), revelando una gran acumulación selectiva de anticuerpos en las lesiones presentes en el miembro con artritis, visible como patas blancas resplandecientes, con alguna hinchazón de grado 2 en las patas delanteras de los ratones.

Veinticuatro horas tras la inyección intravenosa de SIP(F8) marcado radiactivamente con ¹²⁵I, se sacrificó a los ratones y se obtuvieron imágenes de las patas mediante autorradiografía (phosphorimaging). Se observó una acumulación preferencial de radiactividad en las extremidades inflamadas de los ratones inyectados con SIP(F8), visible como tinción negra en autorradiografía. Una pata mostró una puntuación de artritis de 2 (hinchazón de la pata completa). Otra pata se clasificó como artritis de grado 1 (hinchazón solo de dedos).

Actividad de la fusión anticuerpo anti-ED-A - interleucina-10

La molécula de anticuerpo F8 en formato scFv se conjugó en una proteína de fusión con interleucina-10 (IL-10). La actividad biológica de la proteína de fusión se comparó con la de la IL-10 humana en un ensayo determinando la capacidad para inducir la proliferación de células MC/9 dependiente de IL-4 (Thompson y col., 1991). Los resultados se muestran en la Figura 8(d).

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Análisis inmunohistoquímico de muestras de artritis humana

Las secciones congeladas de muestras de artritis humana se fijaron en acetona enfriada con hielo durante 10 minutos, se bloquearon con suero bovino fetal durante 30 minutos y se tiñeron con marcadores de neovasculatura (ED-A y ED-B de fibronectina, dominio A1 y C de tenascina-C). Los anticuerpos F8, L19, F16 y G11 se usaron como scFvs etiquetados con myc en una concentración de 10 ug/ml y se incubaron durante 1 hora. Los anticuerpos primarios se coincubaron con el anticuerpo 9E10 anti-myc en concentración de 7 ug/ml. Como anticuerpos de detección terciaria se usaron un anticuerpo IgG de conejo anti-ratón (Dako, Dinamarca) y anticuerpos APAAP monoclonales de ratón (Dako, Dinamarca) en concentraciones de 5 y 50 ug/ml respectivamente durante 1 hora cada uno. Se usaron comprimidos de Fast Red (Sigma, Suiza) para desarrollar la tinción, incubando durante 15 minutos. Se hizo una tinción de contraste de los portaobjetos con hematoxilina durante 2 minutos, se lavaron con agua, se montaron con medio de montaje Glycergel (Dako, Dinamarca) y se analizaron con un microscopio Axiovert S100 TV (Zeiss, Suiza).

Análisis de inmunofluorescencia en muestras de artritis humana

Las secciones congeladas de muestras de artritis humana se fijaron en acetona enfriada con hielo durante 10 minutos, se bloquearon con suero bovino fetal durante 30 minutos y se tiñeron para el dominio EDA de fibronectina. El anticuerpo F8 se usó como scFv etiquetado con myc en una concentración de 10 ug/ml y se incubaron durante 1 hora. El anticuerpo primario se coincubó con el anticuerpo 9E10 anti-myc en una concentración de 7 ug/ml. Como anticuerpo de detección terciaria se usó un anticuerpo anti-ratón-Alexa 596 fluorescente (Molecular Probes, Dinamarca) en una concentración de 10 ug/ml durante 1 hora cada uno. Se hizo una tinción de contraste de los portaobjetos con Hoechst 33342, se montó con medio de montaje Glycergel (Dako, Dinamarca) y se analizó con un microscopio AxioScop 2MOT+ (Zeiss, Suiza).

Modelo animal

Se inmunizaron ratones DBA/1 macho (8-12 semanas de vida) mediante inyección intradérmica en la base de la cola de 200 µg de colágeno bovino de tipo II (MD Biosciences) emulsionados con volúmenes iguales de adyuvante completo de Freund (MD Biosciences). 2 semanas después de la primera inmunización se repitió el procedimiento pero se usó adyuvante incompleto de Freund (MD Biosciences) para emulsionar el colágeno. Se inspeccionó diariamente a los ratones y cada ratón que presentaba eritema y/o hinchazón de patas en 1 o más miembros se asignó para la obtención de imágenes o estudios de tratamiento.

La artritis se controló usando 2 índices de enfermedad (puntuación clínica e hinchazón de la pata). Para la puntuación clínica se puntuó cada miembro diariamente de manera no cegada. (0 = normal, 1 = hinchazón de 1 o más dedos del mismo miembro, 2 = hinchazón de la pata completa), dando como resultado una puntuación máxima de 8 por animal. La hinchazón de la pata se evaluó cada segundo día usando un calibre para medir el grosor de cada miembro con anestesia de isoflurano. El valor medio de las 4 patas se asignó como el grosor de la pata de cada animal.

Generación de imágenes de infrarrojo cercano de patas con artritis

La acumulación selectiva de SIP(F8) en ratones con artritis se ensayó mediante análisis de generación de imágenes de infrarrojo cercano tal como se describe por Birchler y col. (1999). Brevemente, el SIP(F8) purificado se tiñó con Alexa750 (MolecularProbes, Leiden, Países Bajos) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y 100 ug de proteína etiquetada se inyectaron en la vena de la cola de los ratones con artritis. Los ratones se anestesiaron con

80 mg/kg de ketamina y con 0,2 mg/kg de medetomidina y se obtuvieron imágenes en un generador de imágenes de ratón en infrarrojo cercano 24 horas tras la inyección (Trachsel y col. 2007; Birchler y col. 1999).

Experimentos de biodistribución

5 El rendimiento de direccionamiento *in vivo* de SIP(F8) en ratones con artritis se evaluó mediante análisis de biodistribución tal como se describe anteriormente (Borsi y col. 2002; Tarli y col., 1999). Brevemente, el SIP(F8) se radioyodó y 10 ug de proteína, correspondiente con 11 uCi de ¹²⁵I, se inyectaron en la vena de la cola de los ratones con artritis. Los ratones se sacrificaron a las 24 horas tras la inyección y se expusieron las patas durante 1 hora y se leyeron en un aparato de autorradiografía (Fujifilm BAS-5000) tal como se describe anteriormente (Trachsel y col. 2007).

10 *Anticuerpos*

El aislamiento del fragmento de anticuerpo scFv(L19) anti-ED-B se ha descrito anteriormente (Pini y col. 1998). El anticuerpo parental anti-ED-A se aisló a partir de la biblioteca ETH-2 usando los procedimientos publicados (Giovannoni, Nucleic. Acid Research, 2001,29(5):E27). La maduración de afinidad del anticuerpo parental anti-ED-A, que produce los anticuerpos anti-ED-A de alta afinidad, se describe en la siguiente sección.

15 *Maduración de afinidad del anticuerpo parental anti-ED-A*

20 El anticuerpo parental anti-ED-A (un anticuerpo derivado de ETH-2) se usó como molde para la construcción de una biblioteca de maduración de afinidad. La variabilidad de secuencia en la CDR1 de VH (línea germinal DP47) y la CDR1 de VL (línea germinal DPK22) de la biblioteca se introdujo mediante PCR usando los cebadores parcialmente degenerados 5'-CTGGAGCCTGGCGGACCCAGCTCATMNMNMNNGCTAAAGGTGAAT CCAGA-3' (SEQ ID NO: 17) para VH y 5'-CCAGGTTTCTGCTGGTACCAGGCTAA MNMNMNMNNGCTAACACTCTGACTGGCCCTGC-3' (SEQ ID NO: 18) para VL (todos los oligonucleótidos se solicitaron a Operon Biotechnologies, Colonia, Alemania), en un proceso que genera mutaciones aleatorizadas en las posiciones 31, 32 y 33 de la CDR1 de VH y en las posiciones 31, 31a y 32 de la CDR1 de VL. Las combinaciones VHVL se ensamblaron en formato scFv mediante ensamblaje de PCR usando los cebadores LMB31ong (5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3') (SEQ ID NO: 19) y fdseqlong (5'-GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG-3') (SEQ ID NO: 20), usando segmentos de VH y VL purificados en gel como moldes. Los fragmentos VH-VL ensamblados se digirieron doblemente con NcoI/NotI y se clonaron en el vector fagémido pHEN1 digerido con NcoI/NotI (Hoogenboom y col., 1991). El producto de unión resultante se electroporó en células *E.coli* TG-1 electrocompetentes de acuerdo con (Viti y col., 2000), dando lugar a una biblioteca que contiene 1,5 x 10⁷ clones individuales de anticuerpo, que se exploró para anticuerpos que se unen al ED-A con una afinidad mejorada.

30

Selección de anticuerpos anti-ED-A

35 La biblioteca de anticuerpos descrita anteriormente se exploró para anticuerpos que se unían al ED-A con una mayor afinidad que el anticuerpo parental anti-ED-A usando el análisis BIAcore. El antígeno (11A12) usado en el análisis BIAcore contenía el dominio ED-A de la fibronectina humana y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 120):

MRSYRTEIDKPSQMQVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQ
 TEMTIEGLQPTVEYVVSVAQNPSGESQPLVQTAVTNI DRPKGLAFTDVDVDSIKIAWES
 PQQQVSRYRVTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPL
 IGTQSTAI PAPTDLKFTQVTPTSLSAQWTFPNVQLTGYRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDS
 SSVVVSGLMVATKYEVSVYALKDTLTSRPAQGVVTTLENVRSHHHHHH

La secuencia de nucleótidos del antígeno (11A12) (SEQ ID NO: 121) es como sigue:

atgagatcctaccgaacagaaattgacaaaccatcccagatgcaagtgaccgatgttcaggacaa
 cagcattagtgtcaagtggtgcttcaagttcccctgttactggttacagagtaaccaccactc
 ccaaaaatggaccaggaccaacaaaaactaaaactgcaggtccagatcaaacagaaatgactatt
 gaaggcttgcagcccacagtggagtatgtggttagtgtctatgctcagaatccaagcggagagag
 tcagcctctgggttcagactgcagtaaccaacattgatcgcctaaaggactggcattcactgatg
 tggatgtcgattccatcaaaattgcttgggaaagcccacaggggcaagtttccaggtacagggtg
 acctactcgagccctgaggatggaatccatgagctattcccctgcacctgatggatgaagaagacac
 tgcagagctgcaaggcctcagaccgggttctgagtacacagtcagtggttgccttgcacgatg
 atatggagagccagcccctgattggaaccagtcacacagctattcctgcaccaactgacctgaag
 ttcactcaggtcacaccccacaagcctgagcgcaccagtggaaccacccaatgttcagctcactgg
 atatcgagtgcggtgaccccccaaggagaagaccggaccaatgaaagaaatcaaccttgctcctg
 acagctcatccgtgggtgtatcaggacttatggtggccaccaaataatgaagtgagtgctatgct
 ctttaaggacactttgacaagcagaccagctcagggagttgtcaccactctggagaatgtcagatc
 tcatcaccatcaccatcactaa

La secuencia de nucleótidos del antígeno se amplificó mediante PCR usando cebadores que contienen los sitios de restricción BamHI y BglIII en 5' y 3', respectivamente. El producto de PCR resultante y el vector pQE12 (QIAGEN) se digirieron con la endonucleasa de restricción BamHI y BglIII y se unieron posteriormente en una reacción que contiene una relación de inserción frente a vector de 3:1. El vector resultante se secuenció para comprobar que la secuencia era correcta.

Preparación del antígeno

Se electroporó un precultivo electrocompetente de TG1 en 10 ml de 2TY, Amp, glucosa al 1 % en presencia de 1 µl de una miniprep de ADN de 11A12. El precultivo se diluyó entonces a 1:100 (8 ml en 800 ml de 2TY, Amp, Glucosa al 0,1 %) y se cultivó hasta una DO600 de 0,4-0,6 y después se indujo con IPTG durante la noche. Al día siguiente se volteó a las células y se filtró el sobrenadante (0,22 µm Millipore). Tras la centrifugación y la clarificación del caldo de cultivo, 11A12 se purificó usando una columna Hitrap en FPLC. La columna Ni/ se regeneró como sigue: la columna se enjuagó con 5 volúmenes de columna (VC) de H2O seguido por la aplicación de 3 VC de EDTA 0,5 M / Tris 0,2 M a pH 8 para retirar el antiguo níquel de la columna. Esto fue seguido de un enjuague de la columna con 5 VC de H2O. La columna entonces se recargó con 2 VC de NiSO4 100 mM seguido del enjuague de la columna con varios VC de H2O. La columna entonces se equilibró con 5 VC de tampón de lisis (imidazol 20 mM/NaCl 250 mM/PBS a pH 7,4). El lisado celular se filtró (0,45 µm Millipore) y se cargó en la columna (de manera manual). La columna entonces se volvió a poner en FPLC y se dejó fluir el tampón de lisis hasta que la señal UV fue estable (constante), aproximadamente 3 VC. El programa de elución comenzó entonces: Gradiente del 0 % al 100 % de tampón de elución (imidazol 400 mM / NaCl 250 mM / PBS a pH 7,4) en 5 VC. Las fracciones que contienen el antígeno eluido se agruparon y se sometieron a diálisis en PBS durante la noche.

Expresión y purificación de los anticuerpos anti-ED-A

Los anticuerpos anti-ED-A se expresaron y purificaron como sigue: Se electroporó un precultivo electrocompetente de TG1 en 10 ml de 2TY, Amp, glucosa al 1 % en presencia de 1 µl de una miniprep de ADN de uno de los anticuerpos anti-ED-A. El precultivo se diluyó entonces a 1:100 (8 ml en 800 ml de 2TY, Amp, Glucosa al 0,1 %) y se cultivó hasta una DO600 de 0,4-0,6 y después se indujo con IPTG durante la noche. Al día siguiente se volteó a las células y se filtró el sobrenadante (0,22 µm Millipore). Los scFv se purificaron en una columna de proteína A-Sefarosa y se usó trietilamina para eluir los scFv de la columna. Las fracciones que contienen los scFv eluidos se sometieron a diálisis en PBS durante la noche a 4 °C. Las fracciones de scFv se pusieron entonces en una columna Superdex 75 con PNS fluyendo a 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 0,25 ml. Las fracciones monoméricas se usaron para el análisis BIAcore.

Análisis BIAcore™ 1

La micromatriz BIAcore™ se lavó durante la noche a un caudal de 5 µl/min con tampón HBS-EP de BIAcore™, Hepes 0,01 M a pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 % (el mismo tampón usado para el ensayo). El antígeno (11A12) se diluyó a una concentración de 50 µg/ml en tampón de acetato (pH 4,0) y los grupos

COOH en la micromatriz se activaron mediante inyección de 50 μ l de una mezcla de N-Hidroxisuccinimida (NHS) y etil-N-(dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC). Se inyectaron 40 μ l del antígeno 11A12 en la micromatriz y los grupos libres COOH restantes se bloquearon con 30 μ l de etanolamina. Tras una filtración de 0,22 μ m, se inyectaron 20 μ l de cada sobrenadante bacteriano individual en la micromatriz y la interacción con el antígeno se controló a tiempo real.

Análisis BIAcore™ 2

La k_{on} , k_{off} y K_D del anticuerpo parental anti-ED-A y los anticuerpos anti-ED-A B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 se evaluaron usando la resonancia de plasmón superficial. La microplaca se equilibró durante la noche con el mismo tampón usado durante el ensayo a un caudal del tampón de 5 μ l/min. Todo el procedimiento de recubrimiento se realizó a este caudal. El antígeno 11A12 se diluyó a 1:25 con tampón de acetato a pH 4,00 (proporcionado por BIAcore™) a una concentración final de 20 μ g/ml. El NHS y el EDC se mezclaron entonces y se inyectaron 50 μ l para activar los grupos COOH en el chip CM5. Esto fue seguido por la inyección de 40 μ l del antígeno (esto dura unos 40 segundos). Después se inyectaron 30 μ l de etanolamina con el fin de bloquear la reactividad de los COOH libres eventuales.

Cada muestra se ensayó a un caudal de 20 μ l/min. Se inyectaron 20 μ l de proteína monomérica sin diluir (como si saliera de la filtración en gel). El tiempo de disociación se dejó correr durante aproximadamente 200 segundos. Después se inyectaron 10 μ l de HCl 10 mM para regenerar la micromatriz. La inyección de proteína monomérica se repitió a diferentes diluciones, es decir, dilución 1:2 (en PBS) seguido por la regeneración con HCl. Esto fue seguido por una tercera inyección de la proteína, a una dilución de 1:4 seguido de nuevo por regeneración con HCl. Los valores de k_{on} , k_{off} y K_D para cada anticuerpo anti-ED-A se evaluaron usando el programa informático BIAevaluation.

Selección de anticuerpos anti-ED-A del análisis BIAcore™ 1

El análisis BIAcore™ produjo un gráfico para cada anticuerpo anti-ED-A que se analizó para deducir la afinidad de un anticuerpo por un antígeno como sigue: El eje x de cada gráfico se corresponde con el tiempo y el eje y se corresponde con las unidades de resonancia (una medición que indica la afinidad de unión del anticuerpo ensayado por el antígeno recubierto en la micromatriz BIAcore™). Cada gráfico presentó 3 picos y 1 descenso que se corresponde con cambios en el tampón y, por lo tanto, son irrelevantes para la interpretación de los resultados.

La parte ascendente de cada gráfico representa la fase de asociación. Cuanto más pronunciada sea la curva en esta parte del gráfico, más rápida será la asociación del anticuerpo con el antígeno. La parte descendente de cada gráfico representa la fase de disociación del anticuerpo respecto del antígeno. Cuanto más plana sea la curva en esta parte del gráfico, más lenta será la disociación del anticuerpo con respecto del antígeno.

Los anticuerpos anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 mostraron todos una curva de disociación más plana que el anticuerpo parental anti-ED-A del que provienen, lo que indica que se unen al ED-A y por tanto también al A-FN, con una mayor afinidad que el anticuerpo parental anti-ED-A. Los gráficos para los anticuerpos E5, F1, F8 y H1 presentaron las curvas de disociación más planas de todos los anticuerpos anti-ED-A ensayados. Las curvas de asociación de los anticuerpos H1, C5, D5, E5, C8, F8 y F1 fueron más inclinadas que la observada para el anticuerpo parental anti-ED-A mientras que la curva de asociación observada para los anticuerpos B2, B7, E8 y G9 fueron tan inclinadas como la curva de asociación observada para el anticuerpo parental anti-ED-A. Sin embargo, como se usaron sobrenadantes bacterianos de células *E. coli* TG-1 inducidas por IPTG para el análisis BIAcore™ de anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9, la concentración de las muestras de anticuerpo ensayadas era desconocida pero, lo más probable, menor que la concentración de la muestra de anticuerpo parental anti-ED-A usada para la comparación. Por consiguiente, la curva de asociación de anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 pueden ser artificialmente baja debido a la baja concentración de anticuerpo en las muestras usadas para el análisis BIAcore™. Sin embargo, como la concentración no afecta de manera significativa a la disociación de un anticuerpo de su antígeno diana en el análisis BIAcore™, las curvas de disociación planas observadas para los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 muestran que estos anticuerpos se unen al ED-A con al menos una igual y, probablemente, mayor afinidad, que el anticuerpo parental anti-ED-A.

Análisis BIAcore 2

Los valores de k_{on} , k_{off} y K_D para cada anticuerpo anti-ED-A se evaluaron usando el programa informático BIAevaluation. Los valores de k_{on} , k_{off} y K_D del anticuerpo parental anti-ED-A y los anticuerpos anti-ED-A B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 para el antígeno 11A12 se detallan en la Tabla 2. Los anticuerpos anti-ED-A B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 tienen todos unos mejores valores de K_D para el antígeno 11A12 que el anticuerpo parental anti-ED-A del que provienen, lo que indica que se unen al ED-A y por tanto también al A-FN, con una mayor afinidad que el anticuerpo parental anti-ED-A.

Secuencias

Los anticuerpos anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 son todos anticuerpos scFv y se secuenciaron usando procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos del anticuerpo H1 anti-ED-A se muestra en la Figura 3. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo H1 anti-ED-A se muestra en la Figura 4.

- 5 Las secuencias de nucleótido preferidas que codifican la VH y/o VL de los anticuerpos anti-ED-A B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 son idénticas a las secuencias de nucleótidos que codifican la VH y/o la VL del anticuerpo H1 anti-ED-A, excepto en que las secuencias de nucleótido que codifican las CDR1 de H1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) se sustituyen con las secuencias de nucleótidos que codifican las CDR1 de cadena ligera (VL) y pesada (VH) enumeradas en la Tabla 1 para el respectivo anticuerpo.
- 10 Las secuencias de nucleótidos preferidas que codifican la VH y/o VL del diacuerpo scFv F8 anti-ED-A son idénticas a las secuencias de nucleótido que codifican la VH y/o VL del anticuerpo H1 anti-ED-A, excepto en que las secuencias de nucleótido que codifican las CDR1 de H1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) se sustituyen con las secuencias de nucleótidos que codifican las CDR1 de cadena ligera (VL) y pesada (VH) enumeradas en la Tabla 1 para el anticuerpo F8 anti-ED-A. La secuencia de nucleótido preferida que codifica el enlazador que enlaza la VH y VL del diacuerpo scFv F8 anti-ED-A es ggggccagtgggcggg (SEQ ID NO: 29).
- 15 Los anticuerpos anti-ED-A B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 son secuencias de aminoácidos idénticas a las del anticuerpo H1 anti-ED-A, excepto en que las secuencias de las CDR1 de H1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) se sustituyen con las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de cadena ligera (VL) y pesada (VH) enumeradas en la Tabla 1 para el respectivo anticuerpo. La secuencia de aminoácidos del diacuerpo scFv F8 anti-ED-A es idéntica a las secuencias de aminoácidos del anticuerpo H1 anti-ED-A, excepto en que las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de H1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) se sustituyen con las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de cadena ligera (VL) y pesada (VH) enumeradas en la Tabla 1 para el anticuerpo F8 anti-ED-A, y la secuencia de aminoácidos del enlazador en H1 se sustituye con la secuencia de aminoácidos del enlazador GSSGG (SEQ ID NO: 28).
- 20 La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo B2 anti-ED-A (SEQ ID NO: 21) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 23 se sustituye por la CDR1 de VH de H1.
- 25 La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo C5 anti-ED-A (SEQ ID NO: 41) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 43 se sustituye por la CDR1 de VH de H1.
- La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo D5 anti-ED-A (SEQ ID NO: 51) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 53 se sustituye por la CDR1 de VH de H1.
- 30 La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo E5 anti-ED-A (SEQ ID NO: 61) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 63 se sustituye por la CDR1 de VH de H1.
- La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo C8 anti-ED-A (SEQ ID NO: 71) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 73 se sustituye por la CDR1 de VH de H1.
- 35 La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo F8 anti-ED-A (SEQ ID NO: 81) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 83 se sustituye por la CDR1 de VH de H1. El dominio VH del diacuerpo F8 anti-EDA tiene la misma secuencia de aminoácidos que el dominio VH del anticuerpo F8 anti-ED-A (es decir, la SEQ ID NO: 81).
- 40 La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo F1 anti-ED-A (SEQ ID NO: 91) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 93 se sustituye por la CDR1 de VH de H1.
- La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo B7 anti-ED-A (SEQ ID NO: 101) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 103 se sustituye por la CDR1 de VH de H1.
- 45 La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo E8 anti-ED-A (SEQ ID NO: 111) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 113 se sustituye por la CDR1 de VH de H1.
- 50 La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo G9 anti-ED-A (SEQ ID NO: 31) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 33 se sustituye por la CDR1 de VH de H1.
- La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo B2 anti-ED-A (SEQ ID NO: 22) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 26 se sustituye por la CDR1 de VL de H1.

La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo C5 anti-ED-A (SEQ ID NO: 42) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 46 se sustituye por la CDR1 de VL de H1.

5 La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo D5 anti-ED-A (SEQ ID NO: 52) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 56 se sustituye por la CDR1 de VL de H1.

La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo E5 anti-ED-A (SEQ ID NO: 62) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 66 se sustituye por la CDR1 de VL de H1.

10 La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo C8 anti-ED-A (SEQ ID NO: 72) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 76 se sustituye por la CDR1 de VL de H1.

15 La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo F8 anti-ED-A (SEQ ID NO: 82) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 86 se sustituye por la CDR1 de VL de H1. El dominio VL del diacuerpo F8 anti-ED-A tiene la misma secuencia de aminoácidos que el dominio VL del anticuerpo F8 anti-ED-A (es decir, la SEQ ID NO: 82).

La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo F1 anti-ED-A (SEQ ID NO: 92) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 96 se sustituye por la CDR1 de VL de H1.

20 La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo B7 anti-ED-A (SEQ ID NO: 102) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 106 se sustituye por la CDR1 de VL de H1.

25 La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo E8 anti-ED-A (SEQ ID NO: 112) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 116 se sustituye por la CDR1 de VL de H1.

La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo G9 anti-ED-A (SEQ ID NO: 32) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo H1 anti-ED-A excepto en que la SEQ ID NO: 36 se sustituye por la CDR1 de VL de H1.

30 Opcionalmente, el aminoácido en la posición 5 del dominio VH de los anticuerpos anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 y el diacuerpo scFv F8 puede ser un resto de leucina (L) en lugar de un resto de valina (V) como se muestra en la Figura 4A. Además, o como alternativa, el aminoácido en la posición 18 del dominio VL de los anticuerpos anti-ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 y el diacuerpo scFv F8 puede ser un resto de arginina (R) en lugar de un resto de lisina (K) como se muestra en la Figura 4C.

Clonación, producción y caracterización de F8-IL10

35 El gen de la IL-10 humana se amplificó mediante PCR usando las siguientes secuencias de cebador:

un cebador de antisentido hacia atrás,
5'-TCGGGTAGTAGCTCTTCCGGCTCATCGTCCAGCGGCAGCCCAGGCCAGGGCACC-3';

y un cebador de sentido hacia delante,
5'-TTTTCTTTTGCGGCCGCtattaGTTTCGTATCTTCATTGTCATGTA-3',

40 cuya parte de apéndice de enlazador de 15 aminoácidos (SSSSG)₃ en su extremo N-terminal y su codón de parada y su sitio de restricción NotI en su extremo C-terminal.

El ADN que codifica el fragmento (F8) variable de cadena simple se amplificó con un péptido señal usando los siguientes pares de cebadores:

45 un cebador de antisentido hacia atrás,
5'-CCCAAGCTTGTCGACCATGGGCTGGAGCC-3' y un cebador de sentido hacia delante,

5' -
GAGCCGGAAGAGCTACTACCCGATGAGGAAGAGAATTCTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTG-
3' .

Usando esta estrategia, se insertó un sitio de restricción HindIII en el extremo N-terminal y una parte complementaria de la secuencia de enlazador se insertó en el extremo C-terminal.

Los fragmentos de Fv de cadena ligera y de IL-10 se ensamblaron entonces usando PCR y se clonaron en los sitios de restricción HindIII y NotI del vector de expresión en células de mamífero pcDNA3.1(+).

- 5 Las células CHO-S se transfectaron de manera estable con los plásmidos descritos anteriormente y la selección se llevó a cabo en presencia de G418 (0,5 g/l).

Los clones de células resistentes a G418 se seleccionaron para la expresión de la proteína de fusión mediante ELISA usando un EDA recombinante de fibronectina humana como antígenos y Proteína A para la detección.

- 10 Las proteínas de fusión se purificaron a partir del medio de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de proteína A.

El tamaño de las proteínas de fusión se analizó en condiciones reductoras y no reductoras en SDS-PAGE y en condiciones naturales mediante FPLC de filtración en gel en una columna de exclusión Superdex S-200 (Amersham Pharmacia Biotech, Dübendorf, Suiza).

Ensayo de actividad

- 15 La actividad biológica de hIL10 se determinó mediante su capacidad para inducir la proliferación de células MC/9 dependiente de IL-4 (Thompson y col., 1991) usando el ensayo colorimétrico de reducción del colorante MTT.

- 20 Se trataron 10.000 células MC/9 (ATCC, Manassas, EEUU) pocillo en 200 µl de medio que contiene 5 pg (0,05 unidades) de IL4 murina/ml (eBiosciences) en una placa de microtitulación de 96 pocillos durante 48 horas con cantidades variables de IL10 humana. La hIL10 convencional y la proteína de fusión F8-IL10 se usaron en un máximo de 100 ng / ml de equivalentes de IL10 y se diluyeron de manera seriada. Se añadieron 10 µl de 5 mg/ml de MTT (Sigma) y se incubó durante 3-5 horas. Las células se centrifugaron después, se lisaron con DMSO y se leyó su absorbancia a 570 nm.

REFERENCIAS

- 25 Amit y col. (1986), *Science*, 233:747-753.
 Andersen y col. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 117
 Ausubel y col. (1999) 4th eds., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons.
 Bagshawe K.D. y col. (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922 Balza y col. (1988), *FEBS Lett.*, 228: 42-44.
 30 Batista y col. *J. Exp. Med.*, 184: 2197-205, 1996.
 Berndt y col. *Histochem Cell Biol* 1998, 109(3):249-255.
 Birchler y col. (1999), *J. Immunol. Methods*, 231:239-248.
 Bird y col. (1988) *Science*, 242, 423-426 Borsi y col. (1987), *J. Cell. Biol.*, 104, 595-600.
 Borsi y col. (1990), *FEBS Lett.*, 261: 175-178.
 35 Borsi y col. (1995), *J. Biol.Chem.*, 270: 6243-6245.
 Borsi y col. (1998), *Exp. Cell Res.*, 240, 244-251.
 Borsi y col. (2000) *Int J Cancer*, 102(1):75-85.
 Brack y col. (2006), *Clin. Cancer Res.*, 12, 3200-3208.
 Carnemolla y col. (1989), *J. Cell. Biol.*, 108: 1139-1148.
 40 Caton y col. (1990), *J. Immunol.*, 144:1965-1968.
 Chadd y col. (2001), *Current Opinion in Biotechnology* 12: 188-194
 Chothia y col. (1987), *J. Mol. Biol.*, 196:901-917.
 Chothia y col. (1989), *Nature*, 342:877-883.
 Courtney y col. (1980) *Nature*, 14:283(5748):666-8.
 45 Devos y col. (1983), *Nucl. Acids Res.* 11: 4307-4323.
 ffrench-Constant (1995), *Exp. Cell Res.*, 221:261-271.
 Giovannoni, *Nucleic. Acid Research*, 2001,29(5):E27.
 Glennie M J y col., 1987 *J. Immunol.* 139, 2367-2375
 Haan y col. (2004), *BioCentury*, 12(5): A1-A6.
 50 Hanahan y col. (2000), *Cell* 100, 57-70.
 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp. 726, 1988
 Heikinheimo y col. (1991), *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, 61, 101-109.
 Holliger and Bohlen 1999 *Cancer and metastasis rev.* 18: 411-419.
 55 Holliger y col. (1993a), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448.
 Holliger y col. (1993b), *Current Opinion Biotechnol* 4, 446-449.
 Holt y col. (2003) *Trends in Biotechnology* 21,484-490.
 Hoogenboom y col. (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19 (15) 4133-7.

- Hu y col. (1996), *Cancer Res.*, 56, 3055-3061.
 Huston y col. (1988) *PNAS USA*, 85, 5879-5883.
 Hynes, R.O. (1990). *Fibronectins* (New York: Springer-Verlag).
 Jacobs y col. (2002), *Hum. Pathol.*, 33, 29-38.
 5 Kabat y col. (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4th Edition. US Department of Health and Human Services.
 Kabat y col. (1991a), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington. (a)
 Kabat y col. (1991b), *J. Immunol.*, 147:1709-1719.
 10 Kaspar y col. (2006), *Int. J. Cancer*, 118, 1331-1339.
 Knappik y col., (2000) *J. Mol. Biol.* 296, 57-86.
 Koch y col. *Ann Rheum Dis* 2003, 62 Suppl 2:ii60-67.
 Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975
 Koide y col. (1998), *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151.
 15 Kontermann y col. (2001), *S, Antibody Engineering*, Springer-Verlag New York, LLC; ISBN: 3540413545.
 Kornblihtt y col. (1984), *Nucleic Acids Res.* 12, 5853-5868.
 Koukoulis y col. (1993), *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 25, 285-295.
 Koukoulis y col. (1995), *Ultrastruct. Pathol.*, 19, 37-43.
 Krebs y col. (2001), *Journal of Immunological Methods*, 254 67-84.
 20 Kriegsmann y col.(2004) *Rheumatol Int*, 24(1):25-33.
 Larrick JW and Thomas DW (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12:411-418.
 Ledermann J.A. y col. (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664 Li y col. *Protein Engineering*, 10: 731-736, 1997
 Lohi y col. (1995), *Int. J. Cancer*, 63, 442-449.
 Maeda y col. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 115: 1040-1047;
 25 Matsumoto y col. (1999), *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 320-325.
 McCafferty y col., (1990) *Nature*, 348, 552-554.
 Mendez, M. y col., (1997) *Nature Genet*, 15(2): 146-156.
 Merchand y col., 1998 *Nature Biotech.* 16:677-681
 Neri, D., and Bicknell, R. (2005), *Nat Rev Cancer* 5, 436-446.
 30 Nygren y col. (1997), *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463-469.
 Oyama y col. (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 10331-10334.
 Paoletta y col. (1988), *Nucleic Acids Res.* 16, 3545-3557.
 Pini y col. (1998), *J. Biol. Chem.*, 273, 21769-21776.
 Pluckthun (1991), *Bio/Technology* 9: 545-551.
 35 Reiter y col. (1996), *Nature Biotech*, 14, 1239-1245.
 Repp y col., 1995 *J. Hemat.* 377-382.
 Ridgeway y col. (1996), *Protein Eng.*, 9, 616-621.
 Robinson ed., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978
 Roesli y col. (2006), *Nature Protocols*, 1, 192-199.
 40 Ruf y col. (1991) *J. Biol. Chem.* 226: 15719-15725.
 Rybak y col. (2005), *Nat. Methods*, 2, 291-298.
 Rybak y col. (2006), *ChemMedChem.*, 2,22-40.
 Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ª edición*, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
 Scarpati y col. (1987) *Biochemistry* 26: 5234-5238.
 45 Scarpino y col. (1999) *J. Pathol.* 188, 163-167.
 Scheurer y col. (2005), *Proteomics* 5, 3035-3039.
 Segal y col. (1974), *PNAS*, 71:4298-4302.
 Sharon y col. (1990a), *PNAS*, 87:4814-4817.
 Sharon y col. (1990b), *J. Immunol.*, 144:4863-4869.
 50 Silacci y col. (2003), *Proteomics*, 5, 2340-2350.
 Staerz U. D. and Bevan M. J. 1986 *PNAS* 83 Suresh y col. (1986) *Method Enzymol.* 121: 210-228
 Taniguchi y col. (1983) *Nature* 302, 305-310;
 Tarli y col. *Blood* 1999, 94(1):192-198.
 Tavian y col. (1994), *Int. J. Cancer*, 56, 820-825.
 55 Taylor, *Arthritis Res* 2002, 4 Suppl 3:S99-107.
 Terrana y col. (1987), *Cancer Res.* 47, 3791-3797.
 Thompson y col. (1991), *J Exp Med*, 173:507-510.
 Thorpe (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10, 415-427.
 Trachsel y col. (2006), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58, 735-754.
 60 Trachsel y col. *Arthritis Res Ther* 2007, 9(1):R9.
 Viti y col. (2000), *Methods Enzymol.*, 326, 480-505.
 Walsh y col. (1998) *Am J Pathol.* 152(3):691-702.
 Ward y col. (1989), *Nature* 341,544-546.
 Wess In: *BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness*, 12(42), A1-A7, 2004.

ES 2 646 228 T3

TABLA 1

Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las CDR1 de cadena pesada (VH) y de cadena ligera (VL) de los anticuerpos anti-ED-A madurados por afinidad

Anticuerpo	CDR1 (VH)				CDR1 (VL)			
H1	CCG P	CGG R	AGG R	(SEQ ID NO: 3)	TCT S	GCG A	TGG W	(SEQ ID NO: 6)
B2	GCG A	GCT A	AAG K	(SEQ ID NO: 23)	GTG V	GCT A	TTT F	(SEQ ID NO: 26)
C5	CCG P	ATT I	ACT T	(SEQ ID NO: 43)	TTG L	CAT H	TTT F	(SEQ ID NO: 46)
D5	GTG V	ATG M	AAG K	(SEQ ID NO: 53)	AAT N	GCT A	TTT F	(SEQ ID NO: 56)
E5	ACT T	GGT G	TCT S	(SEQ ID NO: 63)	CTT L	GCG A	CAT H	(SEQ ID NO: 66)
C8	CTT L	CAG Q	ACT T	(SEQ ID NO: 73)	CTT L	CCT P	TTT F	(SEQ ID NO: 76)
F8	CTG L	TTT F	ACG T	(SEQ ID NO: 83)	ATG M	CCG P	TTT F	(SEQ ID NO: 86)
F1	TAG Q (Ámbar)	GCG A	CGT R	(SEQ ID NO: 103)	GCG A	CCT P	TTT F	(SEQ ID NO: 96)
B7	CAT H	TTT F	GAT D	(SEQ ID NO: 103)	CTG L	GCT A	TTT F	(SEQ ID NO: 106)
E8	GAT D	ATG M	CAT H	(SEQ ID NO: 113)	TCG S	TCT S	TTT F	(SEQ ID NO: 116)
G9	CAT H	ATG M	CAG Q	(SEQ ID NO: 33)	ACT T	GCT A	TTT F	(SEQ ID NO: 36)

TABLA 2

Datos de evaluación de BIAcore

Anticuerpo	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
Anticuerpo parental anti-ED-A	$2,5 \times 10^5$	0,02	$\sim 1 \times 10^{-7}$
B2	$3,8 \times 10^5$	$7,54 \times 10^{-3}$	$\sim 2 \times 10^{-8}$

(continuación)

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

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Philogen S.p.A. KASPAR, Manuela SCHWAGER, Kathrin TRACHSEL, Eveline
- <120> Un antígeno asociado con la artritis reumatoide
- 5 <130> SMWFP6580872
- <150> US 60/983.606
- <151> 30/10/2007
- <160> 147
- <170> PatentIn versión 3.3
- 10 <210> 1
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
- <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo H1 anti-ED-A
- <400> 1

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 2

ES 2 646 228 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
 20 25 30
 Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

- 5 <210> 3
- <211> 3
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo H1 anti-ED-A
- <400> 3
- Pro Arg Arg
- 1
- 10 <210> 4
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
- <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo H1 anti-ED-A
- <400> 4
- Ser Gly Ser Gly Gly Ser
- 1 5
- 20 <210> 5
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo H1 anti-

ES 2 646 228 T3

ED-A

<400> 5

Ser Thr His Leu Tyr Leu
1 5

5

<210> 6
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo H1 anti-ED-A

<400> 6

Ser Ala Trp
1

15

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo H1 anti-ED-A

<400> 7

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

25

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo H1 anti-ED-A

<400> 8

30

Met Arg Gly Arg Pro Pro
1 5

<210> 9

<400> 9
000

35

<210> 10
<400> 10
000

40

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

<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la secuencia de enlazador del anticuerpo H1 anti-ED-A

<400> 11

ES 2 646 228 T3

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

Gly Gly Gly Ser
 20

5 <210> 12
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo H1 anti-ED-A
 <400> 12

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc cegcggagga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagtact 300
 catttgatc tttttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc gagt 354

10 <210> 13
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo H1 anti-ED-A

<400> 13
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aaaagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtggttagc tctgcgtggt tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatcca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagatgcgtg gtcggccgcc gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaagcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat 360
 ctgaatgggg ccgcatagac tgtgaaa 387

20 <210> 14
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de nucleótidos de la secuencia del enlazador del anticuerpo H1 anti-ED-A

25 <400> 14
 ggcggtggag gttctggcgg cgttgccagt ggcggtggag gttccggggg tggaggatct 60

ES 2 646 228 T3

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

5 <400> 15
Phe Leu Thr Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Ala Pro
1 5 10 15

Arg

<210> 16
<211> 12
<212> PRT <213> Mus musculus

10 <400> 16
Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
1 5 10

<210> 17
<211> 52
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: Cebador parcialmente degenerado
<220>
<221 > misc_feature

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

<400> 17
ctggagcctg gcggaccag ctcatmnmn nmngctaaa ggtgaatcca ga 52

<210> 18
<211> 58
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

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

30 <220>
<221 > misc_feature
<222> 28, 29, 31,32, 34, 35
<223> n e s a o g o c o t

<400> 18
35 ccaggttct gctgtgacca ggctaamnm nmnngctaa cactctgact ggcctgc 58

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

40 <220>
<223> Secuencia sintética: Cebador LMB3long

<400> 19
caggaaacag ctatgacat gattac 26

<210> 20
<211> 30
<212> ADN

45

ES 2 646 228 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Cebador fdseqlong

<400> 20

5 gacgtagta aatgaatttt ctgtatgagg 30

<210> 21

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo B2 anti-ED-A

<400> 21

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

<210> 22

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo B2 anti-ED-A

15

<400> 22

20

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 3

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo B2 anti-ED-A

<400> 23

Ala Ala Lys

10 1

<210> 24

<400> 24

000

<210> 25

15 <400> 25

000

<210> 26

<211> 3

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del anticuerpo B2 anti-ED-A

<400> 26

ES 2 646 228 T3

Val Ala Phe
1

5
<210> 27
<400> 27 000
<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de enlazador del diacuerpo F8
10 <400> 28

Gly Ser Ser Gly Gly
1 5

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

<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de enlazador del diacuerpo F8

20 <400> 29
gggtccagtg gcggt 15

<210> 30

<400> 30
000

25 <210> 31
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo G9 anti-ED-A

<400> 31

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 32

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo G9 anti-ED-A

<400> 32

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

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

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

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

- <210> 33
- <211> 3
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo G9 anti-ED-A
- <400> 33
- 10 His Met Gln
1
- <210> 34
- <400> 34 000
- <210> 35
- <400> 35 000
- 15 <210> 36
- <211> 3
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo G9 anti-ED-A
- <400> 36
- Thr Ala Phe
1
- <210> 37
- 25 <400> 37
000
- <210> 38
- <400> 38
000

ES 2 646 228 T3

<210> 39
 <400> 39
 000
 <210> 40
 5 <400> 40
 000
 <210> 41
 <211> 118
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo C5 anti-ED-A
 <400> 41
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Ile
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 15 <210> 42
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo C5 anti-ED-A
 <400> 42

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 43
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada del anticuerpo C5 anti-ED-A

<400> 43

10 Pro Ile Thr
 1

<210> 44

<400> 44
 000

<210> 45

15 <400> 45
 000

<210> 46
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera del aminoácido C5 anti-ED-A

<400> 46

ES 2 646 228 T3

Leu His Phe
1

<210> 47
 <400> 47
 000
 5 <210> 48
 <400> 48
 000
 <210> 49
 <400> 49
 10 000
 <210> 50
 <400> 50
 000
 15 <210> 51
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo D5 anti-ED-A
 20 <400> 51
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Met
 20 25 30
 Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 52
 <211> 125

ES 2 646 228 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo D5 anti-ED-A

5 <400> 52
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ala
 20 25 30
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

10 <210> 53
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo D5 anti-ED-A

15 <400> 53
 Val Met Lys
 1

<210> 54
 <400> 54
 000

20 <210> 55
 <400> 55
 000

<210> 56
 <211> 3

ES 2 646 228 T3

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

5 <210> 62
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo E5 anti-ED-A

<400> 62
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 63
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo E5 anti-ED-A

<400> 63
 Thr Gly Ser
 1

20 <210> 64
 <400> 64
 000

ES 2 646 228 T3

<210> 65
<400> 65
000

5 <210> 66
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo E5 anti-ED-A

<400> 66
Leu Ala His
1

15 <210> 67
<400> 67
000

<210> 68
<400> 68
000

20 <210> 69
<400> 69
000

<210> 70
<400> 70
000

25 <210> 71
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo C8 anti-ED-A

<400> 71

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 72

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 72

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

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

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

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

- 5 <210> 73
- <211> 3
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo C8 anti-ED-A
- <400> 73
- 10 Leu Gln Thr
1
- <210> 74
- <400> 74
000
- <210> 75
- 15 <400> 75
000
- <210> 76
- <211> 3
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo C8 anti-ED-A
- <400> 76
- 25 Leu Pro Phe
1
- <210> 77
- <400> 77
000
- <210> 78
- 30 <400> 78
000
- <210> 79

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 83
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo F8 anti-ED-A

10 <400> 83
 Leu Phe Thr
 1

<210> 84
 <400> 84
 000

15 <210> 85
 <400> 85
 000

20 <210> 86
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo F8 anti-ED-A

<400> 86

ES 2 646 228 T3

Met Pro Phe
1

<210> 87
 <400> 87
 000
 5 <210> 88
 <400> 88
 000
 10 <210> 89
 <400> 89
 000
 <210> 90
 <400> 90
 000
 15 <210> 91
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo F1 anti-ED-A
 20 <400> 91
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Ala
 20 25 30
 Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 92

ES 2 646 228 T3

<211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo F1 anti-ED-A

<400> 92
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ala Pro
 20 25 30
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

10 <210> 93
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo F1 anti-ED-A

<400> 93
 Gln Ala Arg
 1

<210> 94
 20 <400> 94
 000

<210> 95
 <400> 95
 000

<210> 96

ES 2 646 228 T3

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

5 <220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo F1 anti-ED-A

<400> 96

Ala Pro Phe
1

10 <210> 97

<400> 97
000

<210> 98

<400> 98
000

15 <210> 99

<400> 99
000

<210> 100

20 <400> 100
000

<210> 101
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo B7 anti-ED-A

<400> 101

ES 2 646 228 T3

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

<210> 102

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo B7 anti-ED-A

<400> 102

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 103
- <211> 3
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo B7 anti-ED-A
- <400> 103
- 10 His Phe Asp
1
- <210> 104
- <400> 104
000
- <210> 105
- 15 <400> 105
000
- <210> 106
- <211> 3
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo B7 anti-ED-A
- <400> 106

ES 2 646 228 T3

<211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo E8 anti-ED-A

<400> 112
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

10 <210> 113
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo E8 anti-ED-A

<400> 113
 Asp Met His
 1

20 <210> 114
 <400> 114
 000

<210> 115
 <400> 115
 000

25 <210> 116
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 646 228 T3

<220>

<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo E8 anti-ED-A

<400> 116

5

Ser Ser Phe
1

<210> 117

<400> 117
000

10

<210> 118
<211> 90
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118

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

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

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

15

<210> 119
<211> 90
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 119

ES 2 646 228 T3

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 Arg Glu Leu Phe Pro
35 40 45

Ala Pro Asp Gly Glu Asp 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 Ile Gln Ser Thr
85 90

<210> 120

<211> 288

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Antígeno (11A12) que contiene el dominio ED-A de la fibronectina humana

<400> 120

ES 2 646 228 T3

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

Thr Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Lys Trp Leu Pro Ser Ser
 20 25 30

Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr Thr Pro Lys Asn Gly Pro
 35 40 45

Gly Pro Thr Lys Thr Lys Thr Ala Gly Pro Asp Gln Thr Glu Met Thr
 50 55 60

Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala
 65 70 75 80

Gln Asn Pro Ser Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 121
 <211> 867
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia de nucleótidos del antígeno (11A12)

<400> 121
 atgagatcct accgaacaga aattgacaaa ccatcccaga tgcaagtgc cgatgttcag 60
 gacaacagca ttagtgtcaa gtggctgcct tcaagttccc ctgttactgg ttacagagta 120
 accaccactc ccaaaaatgg accaggacca acaaaaacta aaactgcagg tccagatcaa 180
 acagaaatga ctattgaagg cttgcagccc acagtggagt atgtggttag tgtctatgct 240
 cagaatccaa ggggagagag tcagcctctg gttcagactg cagtaaccaa cattgatcgc 300
 cctaaaggac tggcattcac tgatgtggat gtogattcca tcaaaattgc ttgggaaagc 360
 ccacaggggc aagtttccag gtacaggggtg acctactcga gccttgagga tggaaatccat 420
 gagctattcc ctgcacctga tggatgaaga gacactgcag agctgcaagg cctcagaccg 480
 ggttctgagt acacagtcag tgtggttgcc ttgcacgatg atatggagag ccagcccctg 540
 attggaacct agtccacagc tattcctgca ccaactgacc tgaagtccac tcaggtcaca 600
 cccacaagcc tgagcgccca gtggacacca cccaatgttc agctcactgg atatcgagtg 660
 cgggtgacct ccaaggagaa gaccggacca atgaaagaaa tcaaccttgc tcctgacagc 720
 tcatccgtgg ttgtatcagg acttatgggtg gccaccaa atgaagtgc tgtctatgct 780
 cttaaggaca ctttgacaag cagaccagct cagggagttg tcaccactct ggagaatgct 840
 agatctcacc accatcacca tcaactaa 867

10

ES 2 646 228 T3

<210> 122
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH del anticuerpo H1 anti-ED-A

<400> 122
 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 Pro Arg
 20 25 30

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

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

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

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

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

 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 123
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH del anticuerpo B2 anti-ED-A

15 <400> 123

ES 2 646 228 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 Ala Ala
 20 25 30

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 124

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Dominio VH del anticuerpo C5 anti-ED-A

<400> 124

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 Pro Ile
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

ES 2 646 228 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 Thr Gly
 20 25 30

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 127

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Dominio VH del anticuerpo C8 anti-ED-A

<400> 127

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 Gln
 20 25 30

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

ES 2 646 228 T3

```

                35                40                45

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
                115

```

<210> 128

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Dominio VH del anticuerpo F8 anti-ED-A

<400> 128

```

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

ES 2 646 228 T3

<210> 129
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH del anticuerpo F1 anti-ED-A

<400> 129
 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 Gln Ala
 20 25 30

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

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

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

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

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

 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 130
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VH del anticuerpo B7 anti-ED-A

15 <400> 130
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 646 228 T3

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 132

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Dominio VH del anticuerpo G9 anti-ED-A

<400> 132

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 His Met
 20 25 30

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 133

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia sintética: Dominio VL del anticuerpo H1 anti-ED-A

<400> 133

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 134

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Dominio VL del anticuerpo B2 anti-ED-A

<400> 134

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

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

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

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

<210> 135

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Dominio VL del anticuerpo C5 anti-ED-A

<400> 135

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

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 136

<211> 125

<212> PRT

ES 2 646 228 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Dominio VL del anticuerpo D5 anti-ED-A

<400> 136

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

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 137

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia sintética: Dominio VL del anticuerpo E5 anti-ED-A

<400> 137

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

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 138

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Dominio VL del anticuerpo C8 anti-ED-A

<400> 138

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

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

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

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

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

ES 2 646 228 T3

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

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

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

<210> 139

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Dominio VL del anticuerpo F8 anti-ED-A

<400> 139

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

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 140

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia sintética: Dominio VL del anticuerpo F1 anti-ED-A

<400> 140

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 141
- <211> 125
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Secuencia sintética: Dominio VL del anticuerpo B7 anti-ED-A

<400> 141
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

ES 2 646 228 T3

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

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

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

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

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

<210> 142

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Dominio VL del anticuerpo E8 anti-ED-A

<400> 142

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

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 143

<211> 125

ES 2 646 228 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Dominio VL del anticuerpo G9 anti-ED-A

5 <400> 143
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

<210> 144
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Cebador

<400> 144
 tcgggtagtagctcttccggctcatcgccagcggcagcccaggccagggcacc
 54

<210> 145
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética: Cebador

<400> 145
 ttttccttttgccggcgcctcattagtttcgtatcttcattgcatgta
 48

<210> 146

REIVINDICACIONES

1. El uso de una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma de extradominio-A (ED-A) de fibronectina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con artritis reumatoide, en el que la molécula de anticuerpo se conjuga con interleucina-10 (IL-10).
- 5 2. El uso de una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina para la preparación de un medicamento para el suministro a la neovasculatura de lugares de artritis reumatoide en un paciente de una molécula conjugada con la molécula de anticuerpo, en el que la molécula es interleucina-10 (IL-10).
- 10 3. Una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma de ED-A de fibronectina, para su uso en un procedimiento de tratamiento de artritis reumatoide en un paciente que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende la molécula de anticuerpo, en la que la molécula de anticuerpo se conjuga con interleucina-10 (IL-10).
- 15 4. Una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma de ED-A de fibronectina, para su uso en un procedimiento de administración de una molécula a la neovasculatura de lugares de artritis reumatoide en un ser humano o animal que comprende la administración al ser humano o animal de la molécula de anticuerpo, en la que la molécula de anticuerpo se conjuga con la molécula, y en la que la molécula es interleucina-10 (IL-10).
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o la molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en la que la molécula de anticuerpo se une al ED-A de fibronectina.
6. El uso o molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula de anticuerpo, comprende:
- 20 (i) un dominio VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región marco, y; un dominio VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región marco, en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5; y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;
- 25 (ii) un dominio VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región marco, y; un dominio VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región marco, en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5; y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;
- 30 (iii) un dominio VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región marco, y; un dominio VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región marco, en el que, HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 33, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5; y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 36, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;
- 35 (iv) un dominio VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región marco, y; un dominio VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región marco, en el que, HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 43, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5; y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 46, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;
- 40 (v) un dominio VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región marco, y; un dominio VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región marco, en el que, HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 53, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5; y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 56, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;
- 45 (vi) un dominio VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región marco, y; un dominio VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región marco, en el que, HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 63, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5; y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;
- 50 (vii) un dominio VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región marco, y; un dominio VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región marco, en el que, HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 73, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5; y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 76, LCDR2
- 55
- 60

tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;

(viii) un dominio VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región marco, y; un dominio VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región marco, en el que, HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 83, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5; y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 86, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;

(ix) un dominio VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región marco, y; un dominio VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región marco, en el que, HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 93, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5; y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 96, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;

(x) un dominio VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región marco, y; un dominio VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región marco, en el que, HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 103, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5; y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 106, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8; o

(xi) un dominio VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región marco, y; un dominio VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región marco, en el que, HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 113, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5; y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 116, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.

7. El uso o molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula de anticuerpo comprende: un dominio V_H que comprende las secuencias de aminoácido de la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en la SEQ ID NO: 81; y un dominio V_L que comprende las secuencias de aminoácido de la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera en la SEQ ID NO: 82.

8. El uso o molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que la región marco del dominio VH es una región marco de la línea germinal humana y la región marco del dominio VL es una región marco de la línea germinal humana.

9. El uso o molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2;

el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22;

el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 31 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 32;

el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 41 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 42;

el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 51 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 52;

el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 61 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 62;

el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 71 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 72;

el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 81 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 82;

el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 91 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 92;

el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 101 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 102; o

el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 111 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 112;

opcionalmente en el que, el aminoácido en la posición 5 del dominio VH es un resto de leucina y/o el aminoácido en la posición 18 del dominio VL es una arginina.

10. El uso o molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 81 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 82.

11. El uso o moléculas de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la molécula de anticuerpo comprende una Fv de cadena simple.

12. El uso o molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la molécula de anticuerpo es una inmunoproteína pequeña (SIP).
13. El uso o molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la molécula de anticuerpo es un diacuerpo.
- 5 14. El uso o molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el paciente tiene artritis reumatoide.
15. Una molécula de anticuerpo que se une al ED-A de fibronectina, en la que la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo que comprende el dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 81 y el dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 82 y está conjugada con interleucina-10 (IL-10).
- 10 16. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 15, en la que la molécula de anticuerpo es un diacuerpo.
17. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 15, en la que la molécula de anticuerpo comprende una Fv de cadena simple.
18. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 15, en la que la molécula de anticuerpo es una inmunoproteína pequeña (SIP).

15

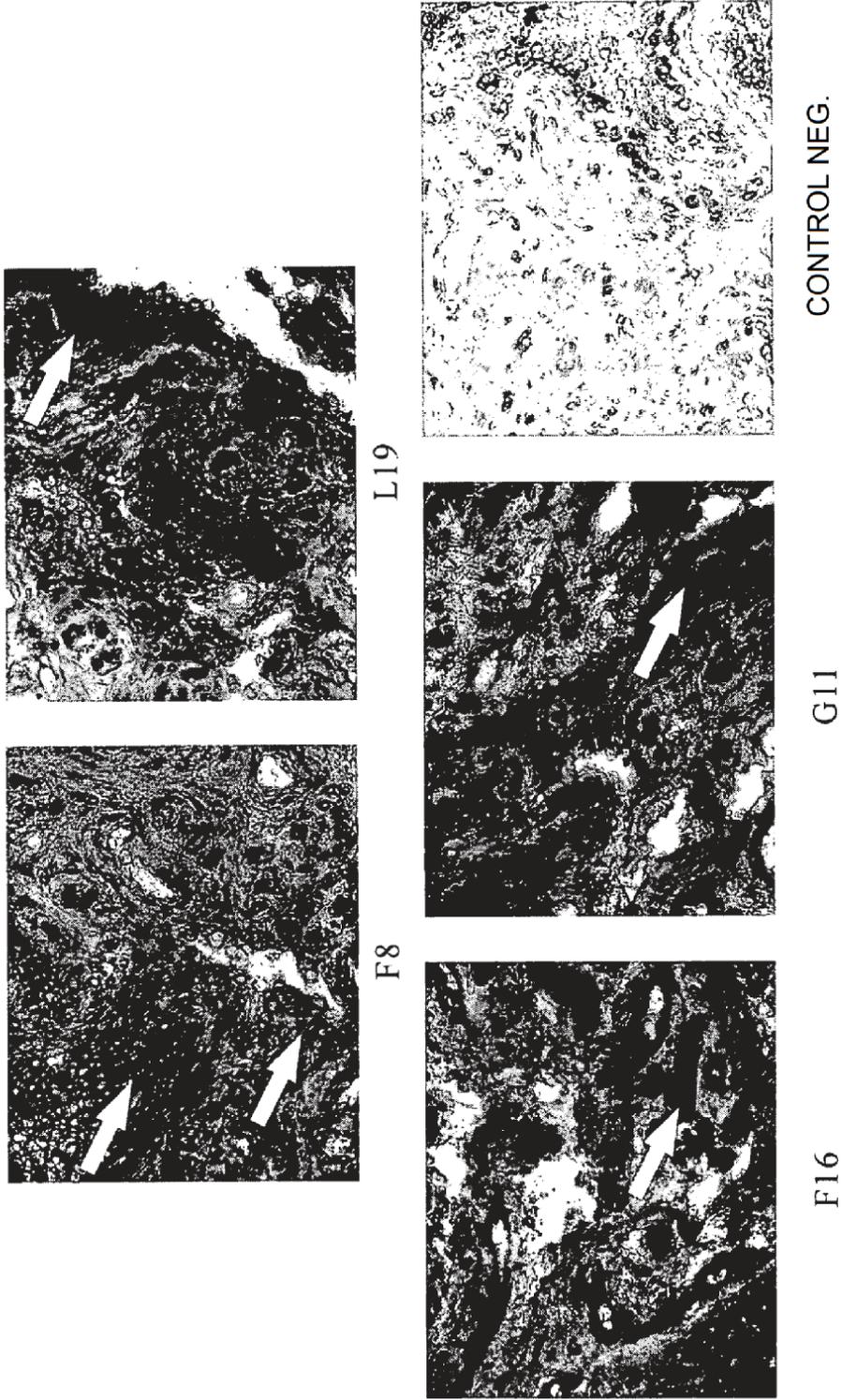


Figura 1

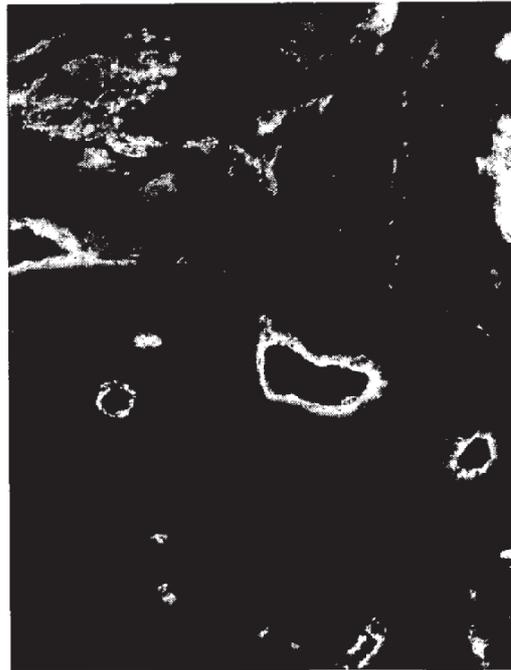


Figura 2

Figura 3

```
A 1 NIDRPKGLAFTD VD VDSIKIAWESPQGQVSRVRYRVTYSSPEDGIRHELFPAPDGEDDTAELQ
  *****
B 1 NIDRPKGLAFTD VD VDSIKIAWESPQGQVSRVRYRVTYSSPEDGIRHELFPAPDGEDDTAELQ
  *****

A 61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQST
  *****
B 61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQST
  *****
```

Figura 4A

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTT
TAGCCCGCGGAGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA
CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA CTGTGCGAAAAGTACTC
ATTTGTATCTTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCGAGT

Figura 4B

GGCGGTGGAGGTTCTGGCGGCGGTGGCAGTGGCGGTGGAGGTT
CCGGGGGTGGAGGATCT

Figura 4C

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC
CAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT
TAGCTCTGCGTGGTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG
GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG
GCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT
CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG
TATTACTGTCAGCAGATATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCC
AAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGCGGCCGCAGAACA AAAACT
CATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTGAAA

Figura 5A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSPRRMSWVRQ
APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVS
S

Figura 5B

GGGSGGGGSGGGGSGGGGS

Figura 5C

EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGEKATLSCRASQSVSSAWLAWYQQ
KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKAAAEQKLIS
EEDLNGAA

Figura 6

AAGCTTGTGACCATGGGCTGGAGCCTGATCCTCCTGTTCTCGTCGCTGTGG
CTACAGGTAAGGGGCTCACAGTAGCAGGCTTGAGGTCTGGACATATATATGGG
TGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTGCACTCGGAGGTGCA
GCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCCTGTTTACGATGAGCTGGGTCCG
CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGT
GGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTTGACTACTG
GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTggtggaggcgggtcaggcggagggtgc
tctggcgggtggcgggaGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCT
CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCATGC
CGTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCAT
CTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGT
GGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT
TTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCCA
AGGGACCAAGGTGGAATCAAAGAATTC*JCTTCCTCATCGGGTAGTAGCTCTT*
CCGGCTCATCGTCCAGCGGCAGCCCAGGGCAGGGCACCCAGTCTGAGAACAG
CTGCACCCACTTCCCAGGCAACCTGCCTAACATGCTTCGAGATCTCCGAGATG
CCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATCAGCTGGACAACCTGT
TGTTAAAGGAGTCCTTGCTGGAGGACTTTAAGGGTTACCTGGGTTGCCAAGCCT
TGTCTGAGATGATCCAGTTTTACCTGGAGGAGGTGATGCCCAAGCTGAGAAC
CAAGACCCAGACATCAAGGCGCATGTGAACTCCCTGGGGGAGAACCTGAAGAC
CCTCAGGCTGAGGCTACGGCGCTGTCATCGATTTCTTCCCTGTGAAAACAAGA
GCAAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCCAAGAGAAAGGC
ATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATCAACTACATAGAAGCCTACA
TGACAATGAAGATACGAAAC*taatga*GCGGCCGC

Figura 7

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS LFTMSWVRQA PGKGLEWVSA
 ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKST
 HLYLFDYWGQ GTLVTVssgg ggsggggsgg ggEIVLTQSP GTLSLSPGER
 ATLSCRASQS VSMPFLAWYQ QKPGQAPRLI IYGASSRATG IPDRFSGSGS
 GTDFTLTISR LEPEDFAVYY CQQMRGRPPT FGQGTKVEIK *Efssssgsss*
*sgsssg*SPG QGTQSENSCT HFPGNLPNML RDLRDAFSRV KTFFQMKDQL
DNLLKESLL EDFKGYLGCQ ALSEMIQFYL EEVMPQAENQ DPDIKAHVNS
LGENLKTLLR RLRRCHRFLP CENKSKAVEQ VKNAFNKLQE KGIYKAMSEF
DIFINYIEAY MTMKIRN

Figura 8

