Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

10-134183

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-134183- -00000-0000
Fecha: 2010-10-28 16:57:41 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 - FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 628

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **"INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **A61K 39/00**

71. SOLICITANTE **ABBOTT LABORATORIES**

DOMICILIO ABBOTT PARK, ESTADO DE ILLINOIS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. _____

(FORMA P 10)

28-11-2010

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-134183- -00000-0000
Fecha: 2010-10-28 16:57:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 628

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)	Nombre: **ABBOTT LABORATORIES** Dirección: 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, Estados Unidos de América. Nacionalidad o Domicilio: Abbott Park, Estado de Illinois, Estados Unidos de América. Lugar de Constitución: Estado de Illinois, Estados Unidos de América. Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	**IDENTIFICACION** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
(3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE** Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 39.690.713 TP 53.215
(4) INVENTOR(ES) (72)	Nombre: GHAYUR, Tariq; MORGAN-LAPPE, Susan, E.; REILLY, Edward, B.; KINGSBURY, Gillian, A.; PHILLIPS, Andrew; WANG, Jieyi; BELL, Randy, L.; NORVELL, Suzanne, M.; LI, Yingehun; LIU, Junjian y YING, Hua. Dirección: 1014 Washington Street, Holliston, MA 01746; 5419 North Canfield Avenue, Chicago, IL 60656; 1136 Winners Circle, Libertyville, IL 60048; 46 Aqueduct Road, Wayland, MA 01778; 519 Garfield Avenue, Libertyville, IL 60048; 29726 Butterfly Court, Lake Bluff, IL 60044; 703 Federal Parkway, Lindenhurst, IL 60046; 4531 N Krueger Road, Long Grove, IL 60047; 103 Newfield Drive, Buffalo Grove, IL 60089; 527 W Thames Street, Unit 7, Norwich, CT 06360 y 15 Tyler Drive, Holden, MA 01520. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.	

(5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/041945 Fecha: 28/04/09

Publicación Internacional No. WO 2009/134776 A3 Fecha: 05/11/09

(6) Título (54) **"INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS"**

(7) Clasificación Internacional (51) **A61K 39/00**

(8) Prioridad SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US US US US	29/04/08 08/07/08 23/10/08 12/11/08	61/125,834 61/134,283 61/197,191 61/199,009

(9) Comprobante de Pago No. 10-67,605 **Fecha:** 17 de Agosto de 2010

(10) **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Documento de Representación Legal.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones
- [ ] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- [x] Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- [ ] Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] Arte Final 12X12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros: reporte de búsqueda internacional, publicación, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional y dibujos.

(11) **FIGURA CARACTERISTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 67,605
FECHA : AGOSTO 17 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-134183- -00000-0000
Fecha: 2010-10-28 16:57:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 628

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325651292	17/08/2010	20,736,200.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN		554,000.00
		TOTAL :	$	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ANEXO

Los documentos que acreditan la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de las sociedades peticionarias, que facultan a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se están presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.

ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2008-05-16-324
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Los abajo firmados, **ABBOTT LABORATORIES**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América, con domicilio en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA ,y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes y los registros, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y adicionalmente quedan facultados para tomar intervención como demandantes o

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
26 MAY 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO DOCIENTO Y UNO (E.P.)

4

demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir, conciliar y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado el 12 de julio de 2004
(firma: ilegible)
Laura J. Schumacher
Vicepresidente, Secretaria y Asesor Legal General Asistente



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América)
Estado de) ss:
Condado de)

En este día 12 de julio de 2004, compareció Laura J. Schumacher, a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que ella es l Vicepresidenta, Secretaria y Asesora de ABBOTT LABORATORIES, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América, domiciliada en la ciudad de Abbott Park, Condado de Lake, Estado de Illinois, Estados Unidos de América, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social conforme a las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Chicago, Estado de Illinois, con fecha 12 de septiembre de 2003, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho Estado la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Copia conforme con el original que tuve a la vista
D.C.
26 MAY 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

(firma: ilegible)
Notario Público

SELLO OFICIAL
Trina Lee Ruiz
Notario Público, Estado de Illinois
Mi Comisión Expira el 6-11-2007

6

Estado de Illinois

Secretario de Estado

Springfield, Illinois

Apostilla

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
3. ha sido firmado por Trina Lee Ruiz
3. actuando como Notario Público, Condado de Lake
4. lleva el sello/estampilla del Estado de Illinois

Certificado

5. en Springfield, Illinois
6. el día 20 de julio de 2004
7. por el Secretario de Estado, Estado de Illinois
8. No. S04VB11001
9. Sello/Estampilla
   Sello del Estado de Illinois
10. Firma (ilegible)
    Jesse White
    Secretario de Estado
    Estado de Illinois

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 16 de mayo de 2008, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 del 15 de agosto de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177 / 89 MINJUSTICIA
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO
que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
26 MAY 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

STATE OF ILLINOIS

SECRETARY OF STATE

SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by TRINA LEE RUIZ

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, LAKE COUNTY

4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

5. Springfield, Illinois

6. JULY 20, 2004

7. by the Secretary of State, State of Illinois

8. No. S04VB11001

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
26 MAY 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

I-168.2

8

Los abajo firmados, **ABBOTT LABORATORIES**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América,

con domicilio en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes y los registros, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y adicionalmente quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir, conciliar y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado el 12 de Julio de 2004



The undersigned, **ABBOTT LABORATORIES,** a corporation organized and existing under the laws of the State of Illinois, United States of America,

domiciled at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA

hereby appoint, ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications and registrations, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and additionally we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to conciliate, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 12th day of July, 2004

Laura J. Schumacher
Vice President, Secretary and Deputy General Counsel



10

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América
Estado de {ss
Condado de
Hoy 12 de Julio de 2004, compareció Laura J. Schumacher, a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es Vice Presidenta, Secretaria y Asesora de **ABBOTT LABORATORIES,** la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América, domiciliada en la ciudad de Abbott Park, Condado de Lake, Estado de Illinois, Estados Unidos de América, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social conforme a las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Chicago, Estado de Illinois, con fecha Sep. 12,2003, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho Estado la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

United States of America
State of {ss
County of
On this 12th day of July, 2004,
personally
came
to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that she is the Vice President Secretary and Deputy General Counsel of **ABBOTT LABORATORIES,**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the State of Illinois, United States of America, domiciled at the City of Abbott Park, County of Lake, State of Illinois, United States of America, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of the State of Illinois, United States of America; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Chicago, State of Illinois, under date of September 12, 2003, and hereby certifies that under the laws of said State the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

OFFICIAL SEAL
TRINA LEE RUIZ
NOTARY PUBLIC, STATE OF ILLINOIS
MY COMMISSION EXPIRES 6-11-2007

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
26 MAY 2010
AURIO VIRVIESCAS CALVETE

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 28-10-10

(30) Prioridad	(31) *No. Prioridad*	(32) *Fecha*	(33) *País*
	61/125,834	29-04-08	US
	61/134,283	08-07-08	US
	61/197,191	23-10-08	US
	61/199,009	12-11-08	US

(51) Int Cl: A61K 39/00

(71) Solicitante(s): **ABBOTT LABORATORIES**

(72) Inventor(es): GHAYUR, Tariq; MORGAN-LAPPE, Susan, E.; REILLY, Edward, B.; KINGSBURY, Gillian, A.; PHILLIPS, Andrew; WANG, Jieyi; BELL, Randy, L.; NORVELL, Suzanne, M.; LI, Yingehun; LIU, Junjian y YING, Hua.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 29-11-10

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 28-04-09
No. de solicitud: ***PCT/US2009/041945***

(87) Publicación internacional
Fecha: ***05-11-09***
N° publicación: ***WO 2009/134776 A3***

(54) Titulo: **INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS**

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Una proteína de unión que comprende una cadena de polipéptido, en donde dicha cadena de polipéptido comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde;

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena pesada;

(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y

(X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente,

en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de CD-20 y CD-19; CD-20 y CD-80; CD-20 y CD-22; CD-20 y CD-40; CD-3 y HER-2; CD-3 y CD-19; EGFR y HER-2; EGFR y CD-3; EGFR e IGF1,2; EGFR e IGF1R; EGFR y RON; EGFR y HGF; EGFR y c-MET; HER-2 e IGF1,2; HER-2 e IGF1R; RON y HGF; VEGF y EGFR; VEGF y HER-2; VEGF y CD-20; VEGF e IGF1,2; VEGF y DLL4; VEGF y HGF; VEGF y RON; VEGF y NRP1; CD-20 y CD3; DLL-4 y PLGF; VEGF y PLGF, ErbB3 y EGFR, HER-2 y ErbB3, ErbB3 y HGF; HER-2 y PLGF, y HER-2 y HER-2.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT __X__ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL __

(21) N° de solicitud:
(22) Fecha de solicitud: 28-10-10
(51) Clasificación Internacional: A61K 39/00

(71) Solicitante(s): **ABBOTT LABORATORIES**

(72) Inventor(es): GHAYUR, Tariq; MORGAN-LAPPE, Susan, E.; REILLY, Edward, B.; KINGSBURY, Gillian, A.; PHILLIPS, Andrew; WANG, Jieyi; BELL, Randy, L.; NORVELL, Suzanne, M.; LI, Yingehun; LIU, Junjian y YING, Hua.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) *No. Prioridad*	(32) *Fecha*	(33) *País*
	61/125,834	29-04-08	US
	61/134,283	08-07-08	US
	61/197,191	23-10-08	US
	61/199,009	12-11-08	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 29-11-10
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 28-04-09
No. de solicitud: ***PCT/US2009/041945***

(87) Publicación internacional
Fecha: ***05-11-09***
N° publicación: ***WO 2009/134776 A3***

(54) Titulo: **INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ___ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 28-10-10
(51) Clasificación Internacional: A61K 39/00

(71) Solicitante(s): **ABBOTT LABORATORIES**

(72) Inventor(es): GHAYUR, Tariq; MORGAN-LAPPE, Susan, E.; REILLY, Edward, B.; KINGSBURY, Gillian, A.; PHILLIPS, Andrew; WANG, Jieyi; BELL, Randy, L.; NORVELL, Suzanne, M.; LI, Yingehun; LIU, Junjian y YING, Hua.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) *No. Prioridad*	(32) *Fecha*	(33) *País*
	61/125,834	29-04-08	US
	61/134,283	08-07-08	US
	61/197,191	23-10-08	US
	61/199,009	12-11-08	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 29-11-10
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 28-04-09
No. de solicitud: ***PCT/US2009/041945***

(87) Publicación internacional:
Fecha: ***05-11-09***
No. Publicación : ***WO 2009/134776 A3***

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Titulo:

INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS

(57) Resumen:

Reivindicación número 1.-

Una proteina de unión que comprende una cadena de polipéptido, en donde dicha cadena de polipéptido comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde;

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena pesada;

(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y

(X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente,

en donde la proteina de unión es capaz de unirse a un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de CD-20 y CD-19; CD-20 y CD-80; CD-20 y CD-22; CD-20 y CD-40; CD-3 y HER-2; CD-3 y CD-19; EGFR y HER-2; EGFR y CD-3; EGFR e IGF1,2; EGFR e IGF1R; EGFR y RON; EGFR y HGF; EGFR y c-MET; HER-2 e IGF1,2; HER-2 e IGF1R; RON y HGF; VEGF y EGFR; VEGF y HER-2; VEGF y CD-20; VEGF e IGF1,2; VEGF y DLL4; VEGF y HGF; VEGF y RON; VEGF y NRP1; CD-20 y CD3; DLL-4 y PLGF; VEGF y PLGF, ErbB3 y EGFR, HER-2 y ErbB3, ErbB3 y HGF; HER-2 y PLGF, y HER-2 y HER-2.

14

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 9380WOO1	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US 09/41945	International filing date *(day/month/year)* 28 April 2009 (28.04.2009)	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 29 April 2008 (29.04.2008)
Applicant ABBOTT LABORATORIES		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 14 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed.

☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/41945

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☐ in the international application as filed

   ☒ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/41945

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Groups I+: Claims 1-40 are drawn to a binding protein or method of producing a binding protein, where the first named invention will be searched and includes SEQ ID NOS: 27 and 28 (claims 1-7 and 9-40). Applicant may have additional sequences searched for an additional search fee per pair of VL and VH regions (i.e. an an odd number and even number selected from SEQ ID NOS: 27-94) or per consensus sequence selected from SEQ ID NOS: 1-26 (e.g. an additional search fee for SEQ ID NO: 1 would also pay for SEQ ID NOS: 2 and 10 because SEQ ID NO: 1 is a consensus sequence of both SEQ ID NO: 2 and 10).

The inventions of the group listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons.

The inventions are drawn to distinct peptide sequences having different structure and function.

Accordingly, unity of invention is lacking under PCT Rule 13 because the groups do not share a same or corresponding special technical feature.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-7 and 9-40, where SEQ ID-limted claims are limited to SEQ ID NOS: 27 and/or 28

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/41945

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/00 (2009.01)
USPC - 424/136.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC- 424/136.1
IPC- A61K 39/00 (2009.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 530/387.3; 424/133.1, 424/801

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWest, Google Scholar: dual variable, domain, bind$4, protein, heavy chain, light chain, link$2, Fc, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgGA, IgGM, IgGE, IgGD, epitop$2, antigen$2, polypeptide$2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/0071675 A1 (WU et al.) 29 Mar 2007 (29.03.2007); para [0014], [0016], [0053], [0057], [0118], [0126]	1, 3, 5-6, 9-23, 25-26, 28-40
Y		2, 4, 7, 24, 27
Y	US 2007/0071745 A1 (UMANA et al.) 29 Mar 2007 (29.03.2007); para [0265]; SEQ ID NO: 57	2, 7, 24, 27
Y	US 7,317,091 B2 (LAZAR et al.) 08 Jan 2008 (08.01.2008); col 9, ln 12-14; Figure 38A; SEQ ID NO: 3	4, 7, 24, 27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 Oct 2009 (22.10.2009)

Date of mailing of the international search report
02 NOV 2009

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:
Lee W. Young
PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

18

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
5 November 2009 (05.11.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/134776 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/041945

(22) International Filing Date:
28 April 2009 (28.04.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

61/125,834	29 April 2008 (29.04.2008)	US
61/134,283	8 July 2008 (08.07.2008)	US
61/197,191	23 October 2008 (23.10.2008)	US
61/199,009	12 November 2008 (12.11.2008)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **ABBOTT LABORATORIES** [US/US]; 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 (US).

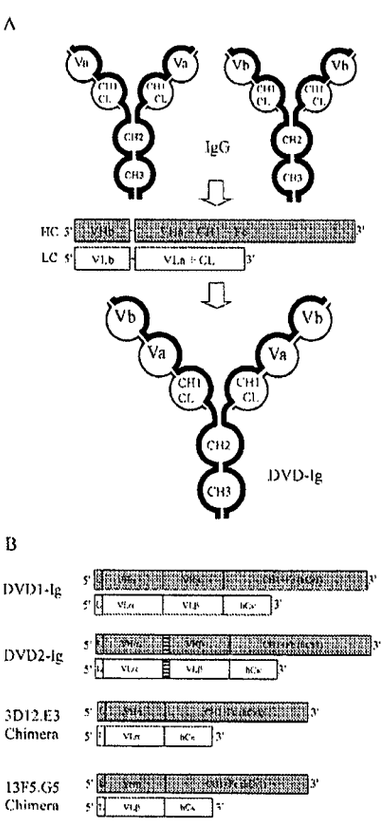
(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **GHAYUR, Tariq** [PK/US]; 1014 Washington Street, Holliston, MA 01746 (US). **MORGAN-LAPPE, Susan, E.** [US/US]; 5419 North Canfield Avenue, Chicago, IL 60656 (US). **REILLY, Edward, B.** [US/US]; 1136 Winners Circle, Libertyville, IL 60048 (US). **KINGSBURY, Gillian, A.** [US/US]; 46 Aqueduct Road, Wayland, MA 01778 (US). **PHILLIPS, Andrew** [GB/US]; 519 Garfield Avenue, Libertyville, IL 60048 (US). **WANG, Jieyi** [US/US]; 29726 Butterfly Court, Lake Bluff, IL 60044 (US). **BELL, Randy, L.** [US/US]; 703 Federal Parkway, Lin-

[Continued on next page]

(54) Title: DUAL VARIABLE DOMAIN IMMUNOGLOBULINS AND USES THEREOF

Figure 1



(57) Abstract: The present invention relates to engineered multivalent and multispecific binding proteins, methods of making, and specifically to their uses in the prevention, diagnosis, and/or treatment of disease.

WO 2009/134776 A3

denhurst, IL 60046 (US). **NORVELL, Suzanne, M.** [US/US]; 4531 N Krueger Road, Long Grove, IL 60047 (US). **LI, Yingchun** [CN/US]; 103 Newfield Drive, Buffalo Grove, IL 60089 (US). **LIU, Junjian** [CN/US]; 527 W Thames Street, Unit 7, Norwich, CT 06360 (US). **YING, Hua** [US/US]; 15 Tyler Drive, Holden, MA 01520 (US).

(74) **Agents**: **STEEL, Diana M.** et al.; Abbott Bioresearch Center, 100 Research Drive, Worcester, MA 01605 (US).

(81) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

(88) **Date of publication of the international search report**:
23 December 2009

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: DIANA M. STEEL
ABBOTT BIORESEARCH CENTER
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER, MA 01605

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	02 NOV 2009
Applicant's or agent's file reference 9380WO01	FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US 09/41945	28 April 2009 (28.04.2009)	29 April 2008 (29.04.2008)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC(8) - A61K 39/00 (2009.01)
USPC - 424/136.1

Applicant ABBOTT LABORATORIES

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- [X] Box No. I Basis of the opinion
- [ ] Box No. II Priority
- [ ] Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- [X] Box No. IV Lack of unity of invention
- [X] Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- [ ] Box No. VI Certain documents cited
- [ ] Box No. VII Certain defects in the international application
- [ ] Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US	Date of completion of this opinion	Authorized officer:
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	22 Oct 2009 (22.10.2009)	Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (July 2009)

21

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/41945

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed.

   ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

      ☐ on paper

      ☒ in electronic form

   b. (time)

      ☐ in the international application as filed

      ☒ together with the international application in electronic form

      ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/41945

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the appicable time limit:

   ☐ paid additional fees

   ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee

   ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid

   ☒ not paid additional fees

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

   ☐ complied with

   ☒ not complied with for the following reasons:

Groups I+: Claims 1-40 are drawn to a binding protein or method of producing a binding protein, where the first named invention will be searched and includes SEQ ID NOS: 27 and 28 (claims 1-7 and 9-40). Applicant may have additional sequences searched for an additional search fee per pair of VL and VH regions (i.e. an an odd number and even number selected from SEQ ID NOS: 27-94) or per consensus sequence selected from SEQ ID NOS: 1-26 (e.g. an additional search fee for SEQ ID NO: 1 would also pay for SEQ ID NOS: 2 and 10 because SEQ ID NO: 1 is a consensus sequence of both SEQ ID NO: 2 and 10).

The inventions of the group listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons.

The inventions are drawn to distinct peptide sequences having different structure and function.

Accordingly, unity of invention is lacking under PCT Rule 13 because the groups do not share a same or corresponding special technical feature.

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:

   ☐ all parts

   ☒ the parts relating to claims Nos. 1-7 and 9-40, where SEQ ID-limted claims are limited to SEQ ID NOS: 27 and/or 28

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/41945

Box No. V **Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims	2, 4, 7, 12-15, 18, 24, 27, 38	YES
	Claims	1, 3, 5-6, 9-11, 16-17, 19-23, 25-26, 28-37, 39-40	NO
Inventive step (IS)	Claims	None	YES
	Claims	1-7, 9-40	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7, 9-40	YES
	Claims	None	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1, 3, 5, 6, 9-11, 16, 17, 19-23, 25, 26, 28-37, 39, and 40 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2007/0071675 A1 to Wu et al. (hereinafter "Wu").

Regarding claim 1, Wu teaches a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n, wherein;
VDI is a first heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0114]);
VD2 is a second heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0114]);
C is a heavy chain constant domain (para [0016]);
(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present; and
(X2)n is an Fc region (para [0016]),
wherein said (X2)n is present, wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens consisting of CD-20 and CD-19 (para [0017]).

Regarding claim 3, Wu teaches a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VDI-(XI)n-VD2 C-(X2)n (para [0016]), wherein;
VDI is a light heavy chain variable domain obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0126]);
VD2 is a light heavy chain variable domain obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0126]);
C is a light chain constant domain;
(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present; and
(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]), wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens selected from the group consisting of CD-20 and CD-19 (para [0017]).

Regarding claim 5, Wu further teaches the binding protein of claim 1, wherein (X2)n is absent (para [0016]- X2 does not comprise an Fc region).

Regarding claim 6, Wu teaches a binding protein comprising first and second polypeptide chains, wherein, said first polypeptide chain comprises a first VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (para [0016]), wherein
VDI is a first heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody (para [0114]);
VD2 is a second heavy chain variable domain (para [0016])obtained from a second parent antibody (para [0114]);
C is a heavy chain constant domain (para [0016]);
(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI (para [0016]), wherein said (XI)n is present; and
(X2)n is an Fc region (para [0016]), wherein said (X2)n is present (para [0016]); and
wherein said second polypeptide chain comprises a second VDI-(XI)n-VD2-C(X2)n, wherein
VDI is a first light chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody (para [0114]);
VD2 is a second light chain variable domain (para [0016]) obtained from a second parent antibody (para [0114]);
C is a light chain constant domain (para [0016]);
(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI (Para [0016]), wherein said (XI)n is either present or absent (para [0016]); and
(X2)n does not comprise an Fc region (para [0016]), wherein said (X2)n is present (para [0016]), wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens consisting ofCD20 and CD-19; CD-20 (para [0017]).

Regarding claim 9, Wu further teaches the binding protein of claim 6, wherein the binding protein comprises two first polypeptide chains and two second polypeptide chains (para [0016]).

Regarding claim 10, Wu further teaches the binding protein of claim 1, wherein the Fc region is selected from the group consisting of native sequence Fc region and a variant sequence Fc region (para [0053]).

Regarding claim 11, Wu further teaches the binding protein of claim 10, wherein the Fc region is selected from the group consisting of an Fc region from an IgGI, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, and IgD (para [0118]).

**********Continued in Supplemental Box**********

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/41945

Supplemental Box

In case **the space in any of the preceding boxes is not sufficient.**

Continuation of:
Box V(2):

Regarding claim 16, Wu further teaches the binding protein of claim 1, wherein said first and said second parent antibodies bind different epitopes on said antigen (para [0057]).

Regarding claim 17, Wu further teaches the binding protein of claim 1, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said first antigen with a potency different from the potency with which said second parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said second antigen (Table 13 shows potency differentiation for various antigens).

Regarding claim 19, Wu teaches the binding protein of claim 1, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, and said second parent antibody or antigen binding portion thereof, are selected from the group consisting of a human antibody, a CDR grafted antibody, and a humanized antibody (para [0114]).

Regarding claim 20, Wu further teaches the binding protein of claim 1, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, and said second parent antibody or antigen binding portion thereof, consist of a Fab fragment (para [0054]).

Regarding claim 21, Wu further teaches the binding protein of claim 1, wherein said binding protein possesses at least one desired property exhibited by said first parent antibody or antigen binding portion thereof, or said second parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0054]- binding specificity).

Regarding claim 22, Wu further teaches the binding protein of claim 21, wherein said desired property is selected from one or more antibody parameters (para [0054]- binding specificity).

Regarding claim 23, Wu further teaches the binding protein of claim 21, wherein said antibody parameters consisting of antigen specificity (para [0054])

Regarding claim 25, Wu teaches a DVD-Ig capable of binding two antigens (para [0042]) comprising four polypeptide chains, wherein first and third polypeptide chains comprise VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n, (para [0016]) wherein
VDI is a first heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0014]);
VD2 is a second heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0014]);
C is a heavy chain constant domain (para [0016]);
(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present (para [0016]); and
(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]); and
wherein second and fourth polypeptide chains comprise VDI-(XI)n-VD2-C(X2)n (para [0016]), wherein
VDI is a first light chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody (para [0014]);
VD2 is a second light chain variable domain (para [0016]) obtained from a second parent antibody (para [0014]);
C is a light chain constant domain (para [0016]);
(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present (para [0016]); and
(X2)n does not comprise an Fc region(para [0016]), wherein said (X2)n is present(para [0016]), wherein the DVD-Ig binds at least one antigen selected from the group consisting of CD-20, CD-19 (para [0167]).

Regarding claim 26, Wu teaches a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding two antigens (para [0016]) comprising the steps of
a) obtaining a first parent antibody or antigen binding portion thereof, capable of binding a first antigen (para [0012]);
b) obtaining a second parent antibody or antigen binding portion thereof, capable of binding a second antigen (para [0012]);
c) constructing first and third polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (para [0016]), wherein
VD1 is a first heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from said first parent antibody (para [0014]);
VD2 is a second heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from said second parent antibody (para [0014]);
C is a heavy chain constant domain (para [0016]);
(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present (para [0016]); and
(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]);
d) constructing second and fourth polypeptide chains comprising VD1-(XI)n-VD2-C-(X2)n (para [0016]), wherein VDI is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody (para [0014]);
VD2 is a second light chain variable (para [0016]) domain obtained from said second parent antibody (para [0014]);
C is a light chain constant domain (para [0016]);
(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present (para [0016]); and
(X2)n does not comprise an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]);
e) expressing said first, second, third and fourth polypeptide chains (para [0016]);
such that a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding said first and said second antigen is generated (para [0016]), wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens selected from the group consisting of CD-20 and CD-19 (para [0017]).

**********Continued in Supplemental Box**********

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/41945

Supplemental Box

In case **the space in any of the preceding boxes is not sufficient.**

Continuation of:
Previous Supplemental Box:
Regarding claim 28, Wu further teaches the method of claim 26, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, and said second parent antibody or antigen binding portion thereof, are selected from the group consisting of a human antibody, a CDR grafted antibody, and a humanized antibody (para [0012]).

Regarding claim 29, Wu further teaches the method of claim 26, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, and said second parent antibody or antigen binding portion thereof, are selected from the group consisting of a Fab fragment (para [0054]).

Regarding claim 30, Wu further teaches the method of claim 26, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof possesses at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0054]- binding specificity).

Regarding claim 31, Wu further teaches the method of claim 26, wherein said second parent antibody or antigen binding portion thereof possesses at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0054]- binding specificity).

Regarding claim 32, Wu further teaches the method of claim 26, wherein the Fc region is a native sequence Fc region (para [0053])..

Regarding claim 33, Wu further teaches the method of claim 26, wherein the Fc region is selected from the group consisting of an Fc region from an IgGl, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, and IgD (para [0118]).

Regarding claim 34, Wu further teaches the method of claim 30, wherein said desired property is selected from one or more antibody parameters (para [0054]- binding specificity).

Regarding claim 35, Wu further teaches the method of claim 31, wherein said desired property is selected from one or more antibody parameters (para [0054]- binding specificity).

Regarding claim 36, Wu further teaches the method of claim 34, wherein said antibody parameters consisting of antigen specificity (para [0054]).

Regarding claim 37, Wu further teaches the method of claim 35, wherein said antibody parameters consists of antigen specificity (para [0054]).

Regarding claim 39, Wu further teaches he method of claim 26, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said first antigen with a different potency than the potency with which said second parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said second antigen (Table 13 shows potency differentiation for various antigens).

Regarding claim 40, Wu teaches a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding two antigens with desired properties (para [0016]) comprising the steps of
a) obtaining a first parent antibody or antigen binding portion thereof, capable of binding a first antigen and possessing at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0012]);
b) obtaining a second parent antibody or antigen binding portion thereof, capable of binding a second antigen and possessing at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0012]);
c) constructing first and third polypeptide chains comprising VD1-(Xl)n-VD2-C-(X2)n (para [0016]), wherein;
VD1 is a first heavy chain variable domain (para [0016])obtained from said first parent antibody (para [0014]);
VD2 is a second heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from said second parent antibody (para [0014]);
C is a heavy chain constant domain (para [0016]);
(Xl)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (Xl)n is present (para [0016]); and
(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]);
d) constructing second and fourth polypeptide chains comprising VD1-(Xl)n-VD2-C-(X2)n (para [0016]), wherein;
VDI is a first light chain variable domain (para [0016]) obtained from said first parent antibody (para [0014]);
VD2 is a second light chain variable domain (para [0016]) obtained from said second parent antibody (para [0014]);
C is a light chain constant domain (para [0016]);
(Xl)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (Xl)n is present (para [0016]); and
(X2)n does not comprise an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]);
e) expressing said first, second, third and fourth polypeptide chains (para [0016]); such that a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding said first and said second antigen (para [0016]) with desired properties is generated, wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens consisting of CD-20 and CD-19 (para [0017]).

Claims 12-15, 18 and 38 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Wu.

Regarding claim 12, Wu teaches the binding protein of claim 1, however fails to specify wherein said VDI of the first polypeptide chain and said VDI of the second polypeptide chain are obtained from the same parent antibody. Wu does teach wherein the variable domains are obtained from a parent antibody, however does not specify whether the variable domains are obtained from the same or different parent antibodies (para [0118]). Although not specified, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to experiment with various variable domains in order to determine if it is more advantageous to use variable domains from the same or different antibody.

**********Continued in Supplemental Box**********

Supplemental Box

In case **the space in any of the preceding boxes is not sufficient.**

Continuation of:
Previous Supplemental Box:

Regarding claim 13, Wu teaches the binding protein of claim 1, however fails to teach wherein said VDI of the first polypeptide chain and said VDI of the second polypeptide chain are obtained from different parent antibody or antigen binding portion thereof. Wu does teach wherein the variable domains are obtained from a parent antibody, however does not specify whether the variable domains are obtained from the same or different parent antibodies (para [0118]). Although not specified, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to experiment with various variable domains in order to determine if it is more advantageous to use variable domains from the same or different antibody.

Regarding claim 14, Wu teaches the binding protein of claim 1, however fails to teach wherein said VD2 of the first polypeptide chain and said VD2 of the second polypeptide chain are obtained from the same parent antibody or antigen binding portion thereof. Wu does teach wherein the variable domains are obtained from a parent antibody, however does not specify whether the variable domains are obtained from the same or different parent antibodies (para [0118]). Although not specified, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to experiment with various variable domains in order to determine if it is more advantageous to use variable domains from the same or different antibody.

Regarding claim 15, Wu teaches the binding protein of claim 1, however fails to teach wherein said VD2 of the first polypeptide chain and said VD2 of the second polypeptide chain are obtained from different parent antibody or antigen binding portion thereof. Wu does teach wherein the variable domains are obtained from a parent antibody, however does not specify whether the variable domains are obtained from the same or different parent antibodies (para [0118]). Although not specified, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to experiment with various variable domains in order to determine if it is more advantageous to use variable domains from the same or different antibody.

Regarding claim 18, Wu teaches the binding protein of claim 1, however fails to specify wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said first antigen with an affinity different from the affinity with which said second parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said second antigen. Wu does illustrate wherein the various antigens have varying potencies (Table 13) and thus it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the affinities would differ for each antibody binding portion.

Regarding claim 38, Wu teaches the method of claim 26, however fails to specify wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said first antigen with a different affinity than the affinity with which said second parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said second antigen. Wu does illustrate wherein the various antigens have varying potencies (Table 13) and thus it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the affinities would differ for each antibody binding portion.

Claim 2 lacks inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Wu in view of US 2007/0071745 A1 to Umana et al. (hereinafter "Umana").

Regarding claim 2, Wu teaches the binding protein of claim 1, however fails to teach wherein VDI and VD2 comprise an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 27. Umana teaches SEQ ID NO: 27 (SEQ ID NO: 57; pg 23, Table 6 "C2B8-VH"). In light of the fact that Umana teaches wherein thesequence is capable of binding to CD-20 (C2B8 is a rituximab anti-CD20 antibody para [0096]), it would have been obvious to include this binding sequence as part of the binding sequence motif VD1 and VD2 in order to bind CD-20, as outlined by Wu.

Claim 4 lacks inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Wu in view of US 7,317,091 B2 to Lazar et al. (hereinafter "Lazar").

Regarding claim 4, Wu teaches the binding protein of claim 3, however fails to teach wherein the VDI and VD2 light chain variable domains comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 28. Lazar teaches a variable light chain with 98.6% homology to SEQ ID NO: 28 (Figure 38A, anti-CD20 binding SEQ ID NO: 3). In light of the fact that Lazar teaches wherein the Fc variants may be modified for optimal binding (col 9, ln 12-14) it would have would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize the general sequence taught by Lazar and experiment with further testing known at the time of the art to determine the best binding sequence for CD20 light chains.

Claims 7, 24 and 27 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Wu in view of Umana and further in view of Lazar.

Regarding claim 7, Wu teaches the binding protein of claim 6, however fails to teach wherein the VDI and VD2 heavy chain variable domains comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 27, and wherein the VDI and VD2 light chain variable domains comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 28. Umana teaches SEQ ID NO: 27 (SEQ ID NO: 57; pg 23, Table 6 "C2B8-VH"). In light of the fact that Umana teaches wherein thesequence is capable of binding to CD-20 (C2B8 is a rituximab anti-CD20 antibody para [0096]), it would have been obvious to include this binding sequence as part of the binding sequence motif VD1 and VD2 in order to bind CD-20, as outlined by Wu.
Lazar teaches a variable light chain with 98.6% homology to SEQ ID NO: 28 (Figure 38A, anti-CD20 binding SEQ ID NO: 3). In light of the fact that Lazar teaches wherein the Fc variants may be modified for optimal binding (col 9, ln 12-14) it would have would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize the general sequence taught by Lazar and experiment with further testing known at the time of the art to determine the best binding sequence for CD20 light chains.

**********Continued in Supplemental Box**********

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 09/41945

Supplemental Box

In case **the space in any of the preceding boxes is not sufficient.**

Continuation of:
Previous Supplemental Box:

Regarding claim 24, Wu teaches a DVD-Ig capable of binding two antigens (para [0042]) comprising four polypeptide chains (para [0016]), wherein first and third polypeptide chains comprise VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (para [0016]), wherein
VD1 is a first heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0114]);
VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0114]);
C is a heavy chain constant domain (para [0016]);
(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI (para [0016]), wherein said (XI)n is present; and
(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]); and
wherein second and fourth polypeptide chains comprise VDI-(XI)n-VD2-C(X2)n, wherein
VDI is a first light chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0014]);
VD2 is a second light chain variable domain (para [0016]) obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0014]);
C is a light chain constant domain (para [0016]);
(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present (para [0016]); and
(X2)n does not comprise an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]), however fails to teach wherein the VD1 and VD2 heavy chain variable domains comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 27, and wherein the VDI and VD2 light chain variable domains comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 28. Umana teaches SEQ ID NO: 27 (SEQ ID NO: 57; pg 23, Table 6 "C2B8-VH"). In light of the fact that Umana teaches wherein thesequence is capable of binding to CD-20 (C2B8 is a rituximab anti-CD20 antibody para [0096]), it would have been obvious to include this binding sequence as part of the binding sequence motif VD1 and VD2 in order to bind CD-20, as outlined by Wu. Lazar teaches a variable light chain with 98.6% homology to SEQ ID NO: 28 (Figure 38A, anti-CD20 binding SEQ ID NO: 3). In light of the fact that Lazar teaches wherein the Fc variants may be modified for optimal binding (col 9, in 12-14) it would have would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize the general sequence taught by Lazar and experiment with further testing known at the time of the art to determine the best binding sequence for CD20 light chains.

Regarding claim 27, Wu téaches the method of claim 26, however fail to teach wherein the VDI and VD2 heavy chain variable domains comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 27 and wherein the VDI and VD2 light chain variable domains comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 28. Umana teaches SEQ ID NO: 27 (SEQ ID NO: 57; pg 23, Table 6 "C2B8-VH"). In light of the fact that Umana teaches wherein thesequence is capable of binding to CD-20 (C2B8 is a rituximab anti-CD20 antibody para [0096]), it would have been obvious to include this binding sequence as part of the binding sequence motif VD1 and VD2 in order to bind CD-20, as outlined by Wu. Lazar teaches a variable light chain with 98.6% homology to SEQ ID NO: 28 (Figure 38A, anti-CD20 binding SEQ ID NO: 3). In light of the fact that Lazar teaches wherein the Fc variants may be modified for optimal binding (col 9, in 12-14) it would have would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize the general sequence taught by Lazar and experiment with further testing known at the time of the art to determine the best binding sequence for CD20 light chains.

Claims 1-7 and 9-40 have industrial applicability under PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
DIANA M. STEEL
ABBOTT BIORESEARCH CENTER
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER, MA 01605-4614

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing (*day/month/year*)	13 AUG 2010
Applicant's or agent's file reference 9380.WO.01	IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.	International filing date (*day/month/year*)	Priority date (*day/month/year*)
PCT/US09/41945	28 April 2009 (28.04.2009)	29 April 2008 (29.04.2008)

Applicant

ABBOTT LABORATORIES

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.

2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.

3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices)(Article 39(1))(see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the *PCT Applicant's Guide.*

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed invention is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the IPEA/ US	Authorized officer
Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450	Marianne Seidel
Facsimile No.	Telephone No. 571-272-1600

Janice Boyd for

Form PCT/IPEA/416 (January 2004)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 9380.WO.01	FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/US09/41945	International filing date *(day/month/year)* 28 April 2009 (28.04.2009)	Priority date *(day/month/year)* 29 April 2008 (29.04.2008)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC(8): **A61K 39/00** (2009.01) USPC: 424/136.1		
Applicant ABBOTT LABORATORIES		

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 12 sheets, including this cover sheet.
3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:
   a. ☐ *(sent to the applicant and to the International Bureau)* a total of ___ sheets, as follows:
      ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).
      ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.
   b. ☐ *(sent to the International Bureau only)* a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) _____ , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).
4. This report contains indications relating to the following items:
   - ☒ Box No. I Basis of the report
   - ☐ Box No. II Priority
   - ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
   - ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
   - ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
   - ☐ Box No. VI Certain documents cited
   - ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
   - ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
24 November 2009 (24.11.2009)	09 August 2010 (09.08.2010)
Name and mailing address of the IPEA/ US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No.	Authorized officer Marianne Seidel Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet)(April 2007)

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US09/41945

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on:

☒ the international application in the language in which it was filed.

☐ a translation of the international application into English, which is the language of a translation furnished for the purposes of:

☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))

☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))

☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the **elements** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

☒ the international application as originally filed/furnished

☒ the description:
pages 1-469 as originally filed/furnished
pages* NONE received by this Authority on _____
pages* NONE received by this Authority on _____

☒ the claims:
pages 470-478 as originally filed/furnished
pages* NONE as amended (together with any statement) under Article 19
pages* NONE received by this Authority on _____
pages* NONE received by this Authority on _____

☒ the drawings:
pages 1 of 1 as originally filed/furnished
pages* NONE received by this Authority on _____
pages* NONE received by this Authority on _____

☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____
☐ the claims, Nos. _____
☐ the drawings, sheets/figs _____
☐ the sequence listing (*specify*): _____
☐ any table(s) related to the sequence listing (*specify*): _____

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

☐ the description, pages _____
☐ the claims, Nos. _____
☐ the drawings, sheets/figs _____
☐ the sequence listing (*specify*): _____
☐ any table(s) related to the sequence listing (*specify*): _____

5. ☐ This report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2(e)).

* *If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."*

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY	International application No. PCT/US09/41945

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:

   ☐ restricted the claims.

   ☐ paid additional fees.

   ☐ paid additional fees under protest, and, where applicable, the protest fee

   ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid

   ☒ neither restricted the claims nor paid additional fees

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is:

   ☐ complied with.

   ☒ not complied with for the following reasons:

Groups I+: Claims 1-40 are drawn to a binding protein or method of producing a binding protein, where the first named invention will be searched and includes SEQ ID NOS: 27 and 28 (claims 1-7 and 9-40). Applicant may have additional sequences searched for an additional search fee per pair of VL and VH regions (i.e. an an odd number and even number selected from SEQ ID NOS: 27-94) or per consensus sequence selected from SEQ ID NOS: 1-26 (e.g. an additional search fee for SEQ ID NO: 1 would also pay for SEQ ID NOS: 2 and 10 because SEQ ID NO: 1 is a consensus sequence of both SEQ ID NO: 2 and 10).

The inventions of the group listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons.

The inventions are drawn to distinct peptide sequences having different structure and function. Accordingly, unity of invention is lacking under PCT Rule 13 because the groups do not share a same or corresponding special technical feature.

4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:

   ☐ all parts

   ☒ the parts relating to claims Nos. 1-7 and 9-40, where SEQ ID-limited claims are limited to SEQ ID Nos. 27 and/or 28

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US09/41945

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims 2,4,7,12-15,18,24,27,38	YES
	Claims 1,3,5-6,9-11,16-17,19-23,25-26,28-37,39-40	NO
Inventive Step (IS)	Claims NONE	YES
	Claims 1-7, 9-40	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims 1-7, 9-40	YES
	Claims NONE	NO

2. Citations and Explanations (Rule 70.7)
Please See Continuation Sheet

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

V. 2. Citations and Explanations:

Claims 1, 3, 5, 6, 9-11, 16, 17, 19-23, 25, 26, 28-37, 39, and 40 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2007/0071675 A1 to Wu et al. (hereinafter "Wu")

Regarding claim 1, Wu teaches a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n, wherein;

VDI is a first heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0114]);

VD2 is a second heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0114]);

C is a heavy chain constant domain (para [0016]);

(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present; and

(X2)n is an Fc region (para [0016]),

wherein said (X2)n is present, wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens consisting of CD-20 and CD-19 (para [0017]).

Supplemental Box

Regarding claim 3, Wu teaches a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VDI-(XI)n-VD2 C-(X2)n (para [0016]), wherein;

VDI is a light heavy chain variable domain obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0126]);

VD2 is a light heavy chain variable domain obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0126]);

C is a light chain constant domain;

(Xi)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present; and

(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]), wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens selected from the group consisting of CD-20 and CD-19 (para [0017]).

Regarding claim 5, Wu further teaches the binding protein of claim 1, wherein (X2)n is absent (para [0016]- X2 does not comprise an Fc region)

Regarding claim 6, Wu teaches a binding protein comprising first and second polypeptide chains, wherein, said first polypeptide chain comprises a first VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (para [0016]), wherein

VDI is a first heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody (para [0114]);

VD2 is a second heavy chain variable domain (para [0016])obtained from a second parent antibody (para [0114]);

C is a heavy chain constant domain (para [0016]);

(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI (para [0016]), wherein said (XI)n is present; and

(X2)n is an Fc region (para [0016]), wherein said (X2)n is present (para [0016]); and wherein said second polypeptide chain comprises a second VDI-(XI)n-VD2-C(X2)n, wherein

VDI is a first light chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody (para [0114]);

VD2 is a second light chain variable domain (para [0016]) obtained from a second parent antibody (para [0114]);

C is a light chain constant domain (para [0016]);

(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI (Para [0016]), wherein said (XI)n is either

present or absent (para [0016]); and

(X2)n does not comprise an Fc region (para [0016]), wherein said (X2)n is present (para [0016]), wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens consisting of CD20 and CD-19; CD-20 (para [0017]).

Regarding claim 9, Wu further teaches the binding protein of claim 6, wherein the binding protein comprises two first polypeptide chains and two second polypeptide chains (para [0016]).

Regarding claim 10, Wu further teaches the binding protein of claim 1, wherein the Fc region is selected from the group consisting of native sequence Fc region and a variant sequence Fc region (para [0053]).

Regarding claim 11, Wu further teaches the binding protein of claim 10, wherein the Fc region is selected from the group consisting of an Fc region from an IgGI, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, and IgD (para [0118]).

Regarding claim 16, Wu further teaches the binding protein of claim 1, wherein said first and said second parent antibodies bind different epitopes on said antigen (para [0057]).

Supplemental Box

Regarding claim 17, Wu further teaches the binding protein of claim 1, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said first antigen with a potency different from the potency with which said second parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said second antigen (Table 13 shows potency differentiation for various antigens).

Regarding claim 19, Wu teaches the binding protein of claim 1, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, and said second parent antibody or antigen binding portion thereof, are selected from the group consisting of a human antibody, a CDR grafted antibody, and a humanized antibody (para [0114]).

Regarding claim 20, Wu further teaches the binding protein of claim 1, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof and said second parent antibody or antigen binding portion thereof, consist of a Fab fragment (para [0054]).

Regarding claim 21, Wu further teaches the binding protein of claim 1, wherein said binding protein possesses at least one desired property exhibited by said first parent antibody or antigen binding portion thereof, or said second parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0054]- binding specificity).

Regarding claim 22, Wu further teaches the binding protein of claim 21, wherein said desired property is selected from one or more antibody parameters (para [0054]- binding specificity).

Regarding claim 23, Wu further teaches the binding protein of claim 21, wherein said antibody parameters consisting of antigen specificity (para [0054])

Regarding claim 25, Wu teaches a DVD-Ig capable of binding two antigens (para [0042]) comprising four polypeptide chains, wherein first and third polypeptide chains comprise VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n, (para [0016]) wherein

VDI is a first heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0014]);

VD2 is a second heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0014]);

C is a heavy chain constant domain (para [0016]);

(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present (para [0016]); and

(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]); and

wherein second and fourth polypeptide chains comprise VDI-(XI)n-VD2-C(X2)n (para [0016]), wherein

VDI is a first light chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody (para [0014]);

VD2 is a second light chain variable domain (para [0016]) obtained from a second parent antibody (para [0014]);

C is a light chain constant domain (para [0016]);

(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present (para [0016]); and

(X2)n does not comprise an Fc region(para [0016]), wherein said (X2)n is present(para [0016]), wherein the DVD-Ig binds at least one antigen selected from the group consisting of CD-20, CD-19 (para [0167]).

Regarding claim 26, Wu teaches a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding two antigens (para [0016]) comprising the steps of a) obtaining a first parent antibody or antigen binding portion thereof, capable of binding a first antigen (para [0012]);
b) obtaining a second parent antibody or antigen binding portion thereof, capable of binding a second antigen (para [0012]);
c) constructing first and third polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (para [0016]), wherein

Supplemental Box

VD1 is a first heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from said first parent antibody (para [0014]);

VD2 is a second heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from said second parent antibody (para [0014]);

C is a heavy chain constant domain (para [0016]);

(Xl)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (Xl)n is present (para [0016]); and

(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]);

d) constructing second and fourth polypeptide chains comprising VDI-(Xl)n-VD2-C-(X2)n (para [0016]), wherein VDI is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody (para [0014]);

VD2 is a second light chain variable (para [0016]) domain obtained from said second parent antibody (para [0014]);

C is a light chain constant domain (para [0016]);

(Xl)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (Xl)n is present (para [0016]); and

(X2)n does not comprise an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]);

e) expressing said first, second, third and fourth polypeptide chains (para [0016]); such that a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding said first and said second antigen is generated (para [0016]), wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens selected from the group consisting of CD-20 and CD-19 (para [0017]).

Regarding claim 28, Wu further teaches the method of claim 26, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, and said second parent antibody or antigen binding portion thereof, are selected from the group consisting of a human antibody, a CDR grafted antibody, and a humanized antibody (para [0012]).

Regarding claim 29, Wu further teaches the method of claim 26, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, and said second parent antibody or antigen binding portion thereof, are selected from the group consisting of a Fab fragment (para [0054]).

Regarding claim 30, Wu further teaches the method of claim 26, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof possesses at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0054]- binding specificity).

Regarding claim 31, Wu further teaches the method of claim 26, wherein said second parent antibody or antigen binding portion thereof possesses at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0054]- binding specificity).

Regarding claim 32, Wu further teaches the method of claim 26, wherein the Fc region is a native sequence Fc region (para [0053])..

Regarding claim 33, Wu further teaches the method of claim 26, wherein the Fc region is selected from the group consisting of an Fc region from an IgGI, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, and IgD (para [0118]).

Regarding claim 34, Wu further teaches the method of claim 30, wherein said desired property is selected from one or more antibody parameters (para [0054]- binding specificity).

Regarding claim 35, Wu further teaches the method of claim 31, wherein said desired property is selected from one or more antibody parameters (para [0054]- binding specificity).

Regarding claim 36, Wu further teaches the method of claim 34, wherein said antibody parameters consisting of antigen specificity (para 10054]).

Supplemental Box

Regarding claim 37, Wu further teaches the method of claim 35, wherein said antibody parameters consists of antigen specificity (Para [0054]).

Regarding claim 39, Wu further teaches the method of claim 26, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said first antigen with a different potency than the potency with which said second parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said second antigen (Table 13 shows potency differentiation for various antigens).

Regarding claim 40, Wu teaches a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding two antigens with desired properties (para [0016]) comprising the steps of a) obtaining a first parent antibody or antigen binding portion thereof, capable of binding a first antigen and possessing at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0012]);
b) obtaining a second parent antibody or antigen binding portion thereof, capable of binding a second antigen and possessing at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0012]);
c) constructing first and third polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (para [0016]), wherein;

VD1 is a first heavy chain variable domain (para [0016])obtained from said first parent antibody (para [0014]);

VD2 is a second heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from said second parent antibody (para [0014]);

C is a heavy chain constant domain (para [0016]);

(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present (para [0016]); and

(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]);

d) constructing second and fourth polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (para [0016]), wherein;

VDI is a first light chain variable domain (para [0016]) obtained from said first parent antibody (para [0014]);

VD2 is a second light chain variable domain (para [0016]) obtained from said second parent antibody (para [0014]);

C is a light chain constant domain (para [0016]);

(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present (para [0016]); and

(X2)n does not comprise an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]);

e) expressing said first, second, third and fourth polypeptide chains (para [0016]); such that a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding said first and said second antigen (para [0016]) with desired properties is generated, wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens consisting of CD-20 and CD-19 (para [0017]).

Claims 12-15, 18 and 38 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Wu.

Regarding claim 12, Wu teaches the binding protein of claim 1, however fails to specify wherein said VDI of the first polypeptide chain and said VDI of the second polypeptide chain are obtained from the same parent antibody. Wu does teach wherein the variable domains are obtained from a parent antibody, however does not specify whether the variable domains are obtained from the same or different parent antibodies (para [0118]). Although not specified, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to experiment with various variable domains in order to determine if it is more advantageous to use variable domains from the same or different antibody.

Regarding claim 13, Wu teaches the binding protein of claim 1, however fails to teach wherein said VDI of the first polypeptide chain and said VDI of the second polypeptide chain are obtained from different parent antibody or antigen binding portion thereof. Wu does teach wherein the variable domains are obtained from a parent

Supplemental Box

antibody, however does not specify whether the variable domains are obtained from the same or different parent antibodies (para [0118]). Although not specified, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to experiment with various variable domains in order to determine if it is more advantageous to use variable domains from the same or different antibody.

Regarding claim 14, Wu teaches the binding protein of claim 1, however fails to teach wherein said VD2 of the first polypeptide chain and said VD2 of the second polypeptide chain are obtained from the same parent antibody or antigen binding portion thereof. Wu does teach wherein the variable domains are obtained from a parent antibody, however does not specify whether the variable domains are obtained from the same or different parent antibodies (para [0118]). Although not specified, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to experiment with various variable domains in order to determine if it is more advantageous to use variable domains from the same or different antibody.

Regarding claim 15, Wu teaches the binding protein of claim 1, however fails to teach wherein said VD2 of the first polypeptide chain and said VD2 of the second polypeptide chain are obtained from different parent antibody or antigen binding portion thereof. Wu does teach wherein the variable domains are obtained from a parent antibody, however does not specify whether the variable domains are obtained from the same or different parent antibodies (para [0118]). Although not specified, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to experiment with various variable domains in order to determine if it is more advantageous to use variable domains from the same or different antibody.

Regarding claim 18, Wu teaches the binding protein of claim 1, however fails to specify wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said first antigen with an affinity different from the affinity with which said second parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said second antigen. Wu does illustrate wherein the various antigens have varying potencies (Table 13) and thus it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the affinities would differ for each antibody binding portion.

Regarding claim 38, Wu teaches the method of claim 26, however fails to specify wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said first antigen with a different affinity than the affinity with which said second parent antibody or antigen binding ~ortion thereof, binds said second antigen. Wu does illustrate wherein the various antigens have varying potencies (Table 13) and thus it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the affinities would differ for each antibody binding portion.

Claim 2 lacks inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Wu in view of US 2007/0071745 A1 to Umana et al. (hereinafter "Umana").

Regarding claim 2, Wu teaches the binding protein of claim 1, however fails to teach wherein VDI and VD2 comprise an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 27. Umana teaches SEQ ID NO: 27 (SEQ ID NO: 57; pg 23, Table 6 "C2B8-VH"). In light of the fact that Umana teaches wherein the sequence is capable of binding to CD-20 (C2B8 is a rituximab anti-CD20 antibody para [0096]), it would have been obvious to include this binding sequence as part of the binding sequence motif VD1 and VD2 in order to bind CD-20, as outlined by Wu.

Claim 4 lacks inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Wu in view of US 7,317,091 B2 to Lazar et al. (hereinafter "Lazar").

Regarding claim 4, Wu teaches the binding protein of claim 3, however fails to teach wherein the VDI and VD2 light chain variable domain comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 28. Lazar teaches a variable light chain with 98.6% homology to SEQ ID NO: 28 (Figure 38A, anti-CD20 binding SEQ ID NO: 3). In light of the fact that Lazar teaches wherein the Fc variants may be modified for optimal binding (col 9, In 12-14) it would have would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize the general sequence taught by Lazar and experiment with further testing known at the time of the art to determine the best binding sequence for CD20 light chains.

Claims 7, 24 and 27 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Wu in view of Umana and further in view of Lazar.

Regarding claim 7, Wu teaches the binding protein of claim 6, however fails to teach wherein the VDI and VD2

Supplemental Box

heavy chain variable domains comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 27, and wherein the VDI and VD2 light chain variable domains comprise an am no acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 28. Umana teaches SEQ ID NO: 27 (SEQ ID NO: 57; pg 23, Table 6 "C2B8-VH"). In light of the fact that Umana teaches wherein the sequence is capabable of binding to CD-20 (C2B8 is a rituximab anti-CD20 antibody para [0096]), it would have been obvious to include this binding sequence as part of the binding sequence motif VD1 and VD2 in order to bind CD-20, as outlined by Wu.

Lazar teaches a variable light chain with 98.6% homology to SEQ ID NO: 28 (Figure 38A, anti-CD20 binding SEQ ID NO: 3). In light of the fact that Lazar teaches wherein the Fc variants may be modified for optimal binding (col 9, In 12-14) it would have would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize the general sequence taught by Lazar and experiment with further testing known at the time of the art to determine the best binding sequence for CD20 light chains.

Regarding claim 24, Wu teaches a DVD-Ig capable of binding two antigens (para [0042]) comprising four polypeptide chains (para [0016]), wherein first and third polypeptide chains comprise VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (para [0016]), wherein

VD1 is a first heavy chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0114]);

VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0114]);

C is a heavy chain constant domain (para [0016]);

(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI (para [0016]), wherein said (XI)n is present; and

(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016]); and

wherein second and fourth polypeptide chains comprise VDI-(XI)n-VD2-C(X2)n, wherein

VDI is a first light chain variable domain (para [0016]) obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0014]);

VD2 is a second light chain variable domain (para [0016]) obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0014]);

C is a light chain constant domain (para [0016]);

(XI)n is a linker with the proviso that it is not CHI, wherein said (XI)n is present (para [0016]); and

(X2)n does not comprise an Fc region, wherein said (X2)n is present (para [0016}), however falls to teach wherein the VD1 and VD2 heavy chain variable domains comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 27, and wherein the VDI and VD2 light chain variable domains comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 28. Umana teaches SEQ ID NO: 27 (SEQ ID NO: 57; pg.23, Table 6 "C2BS-VH"). In light of the fact that Umana teaches wherein the sequence is capable ol binding to CD-20 (C2B8 is a rituximab anti-CD20 antibody para [0096]), it would have been obvious to include this binding sequence as part ol the binding sequence motif VD1 and VD2 in order to bind CD-20, as outlined by Wu. Lazar teaches a variable light chain with 98.6% homology to SEQ ID NO: 28 (Figure 38A, anti-CD20 binding SEQ ID NO: 3). In light of the fact that Lazar teaches wherein the Fc variants may be modified for optimal binding (col 9, In 12-14) it would have would have been obvious to one ol ordinary skill in the art to utilize the general sequence taught by Lazar and experiment with further testing known at the time of the art to determine the best binding sequence for CD20 light chains.

Regarding claim 27, Wu teaches the method of claim 26, however fail to teach wherein the VDI and VD2 heavy chain variable domains comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 27 and wherein the VDI and VD2 light chain variable domains comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 28. Umana teaches SEQ ID NO: 27 (SEQ ID NO: 57; pg 23, Table 6

Supplemental Box

"C2B8-VH"). In light of the fact that Umana teaches wherein the sequence is capable of binding to CD-20 (C2B8 is a rituximab anti-CD20 antibody para [0096]), it would have been obvious to include this binding sequence as part of the binding sequence motif VD1 and VD2 in order to bind CD-20, as outlined by Wu.

Lazar teaches a variable light chain with 98.6% homology to SEQ ID NO: 28 (Figure 38A, anti-CD20 binding SEQ ID NO: 3). In light of the fact that Lazar teaches wherein the Fc variants may be modified lor optimal binding (col 9, In 12-14) it would have would have been obvious to one o| ordinary skill in the art to utilize the general sequence taught by Lazar and experiment with further testing known at the time of the art to determine the best binding sequence for CD20 light chains.

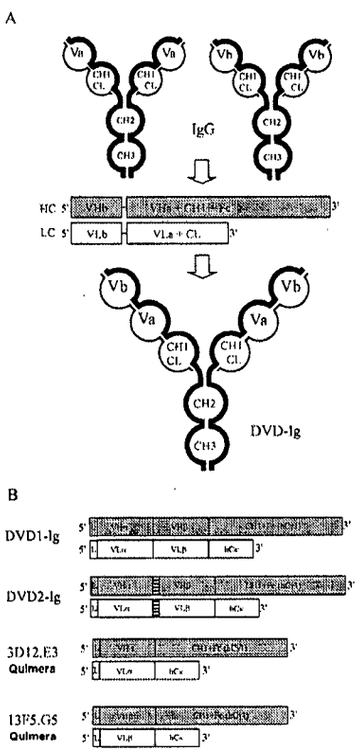
Claims 1-7 and 9-40 have industrial applicability under PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas diseñadas, con los métodos de preparación y específicamente con sus usos en la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de enfermedad.

Figura 1



INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS

Referencia con Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud es una solicitud no provisional que reivindica prioridad a la Solicitud Provisional U.S. Ser. No. 61/125,834, presentada el 29 de Abril de 2008, Solicitud Provisional U.S. Ser. No. 61/134,283, presentada el 8 de Julio de 2008, Solicitud Provisional U.S. Ser. No. 61/197,191, presentada el 23 de Octubre de 2008, y la Solicitud Provisional U.S. Ser. No. 61/199,009, presentada el 12 de Noviembre de 2008, cuyos contenidos están incorporados a la presente mediante referencia.

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas, métodos para prepararlas, y específicamente con sus usos específicos en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, cáncer, y otras enfermedades.

Antecedentes de la Invención

Las proteínas diseñadas, tales como los anticuerpos multiespecíficos capaces de unirse a dos o más antígenos son conocidas en la técnica. Tales proteínas de unión multiespecíficas pueden ser generadas usando fusión celular, conjugación química, o técnicas de ADN recombinante.

Se han producido anticuerpos biespecíficos usando tecnología de cuadroma (ver Milstein, C. y A.C. Cuello (1983) Nature 305(5934):537-40) con base en la fusión somática de dos líneas celulares de hibridoma diferentes que expresan anticuerpos monoclonales murinos (mAbs) con las especificidades deseadas del anticuerpo biespecífico. Debido al emparejamiento aleatorio de dos cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina (Ig) diferentes dentro de la línea celular de híbrido-hibridoma resultante (o cuadroma), se generan hasta diez especies de Ig diferentes, de las cuales solamente una es el anticuero biespecífico funcional. La presencia de subproductos disparejos, y los

rendimientos de producción significativamente reducidos, significan que se requieren procedimientos de purificación sofisticados.

Los anticuerpos biespecíficos pueden ser producidos también mediante conjugación química de dos mAbs diferentes (ver Staerz, U.D., et al. (1985) Nature 314(6012): 628-31). Este enfoque no produce preparación homogénea. Otros enfoques han usado conjugación química de dos mAbs diferentes o fragmentos de anticuerpo más pequeños (ver Brennan, M., et al. (1985) Science 229(4708): 81-3).

Otro método usado para producir anticuerpos biespecíficos es el acoplamiento de dos anticuerpos base con un entrecruzador hetero-bifuncional, pero los anticuerpos biespecíficos resultantes sufren de heterogeneidad molecular significativa debido a que la reacción del entrecruzador con los anticuerpos base no está dirigida al sitio. Para obtener preparaciones más homogeneas de anticuerpos biespecíficos, dos fragmentos Fab diferentes han sido entrecruzados químicamente en sus residuos de cisteína bisagra de una manera dirigida al sitio (ver Glennie, M.J., et al. (1987) J. Immunol. 139(7): 2367-75). Pero este método produce fragmentos Fab'2, no la molécula de Ig completa.

Se ha desarrollado una amplia variedad de otros formatos de anticuerpo biespecífico recombinante (ver Kriangkum, J., et al. (2001) Biomol. Eng. 18(2): 31-40). Entre ellos las moléculas Fv de cadena simple en tandem y diacuerpos, y varios derivados de las mismas, son los más ampliamente usados. Rutinariamente, la construcción de estas moléculas parte de dos fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) que reconocen antígenos diferentes (ver Economides, A.N., et al. (2003) Nat. Med. 9(1): 47-52). Las moléculas scFv en tandem (taFv) representan un formato sencillo que simplemente conecta las dos moléculas de scFv con un enlazante de péptido adicional. Los dos ragmentos scFv presentes en estas moléculas de scFv tandem forman entidades de plegamiento separadas. Se pueden usar varios enlazantes para conectar los dos fragmentos scFv y enlazantes con una longitud de hasta 63 residuos (ver Nakanishi, K., et al. (2001) Ann. Rev. Immunol. 19: 423-74). Aunque los fragmentos scFv base pueden ser normalmente expresados en

forma soluble en bacterias, sin embargo, se observa a menudo que las moléculas scFv en tandem forman agregados insolubles en bacterias. Por consiguiente, los protocolos de refolding o el uso de sistemas de expresión mamíferos son aplicados rutinariamente para producir moléculas scFv en tandem solubles. En un estudio reciente, se reportó una expression in vivo por conejos transgénicos y Ganado de un scFv tandem dirigido contra CD28 y un proteoglicano asociado con melanoma (ver Gracie, J.A., et al. (1999) J. Clin. Invest. 104(10): 1393-401). En este constructo, las dos moléculas de scFv estaban conectadas por un enlazante CH1 y se encontraron concentraciones en suero de hasta 100 mg/L de anticuerpo biespecífico. Se emplearon varias estrategias incluyendo variaciones del orden de dominio o usando enlazantes medios con diferentes longitudes o flexibilidad para permitir la expresión soluble en bacterias. Ahora unos pocos estudios han reportado expresión de moléculas scFv tanden solubles en bacterias (ver Leung, B.P., et al. (2000) J. Immunol. 164(12): 6495-502; Ito, A., et al. (2003) J. Immunol. 170(9): 4802-9; Karni, A., et al. (2002) J. Neuroimmunol. 125(1-2): 134-40) usando ya sea un enlazante Ala3 muy corto o enlazantes ricos en glicina/serina largos. En otro estudio reciente, el despliegue del fago de un repertorio de scFv tandem que contiene enlazantes medios aleatorizados con una lonitud de 3 o 6 residuos fue empleado para enriquecer aquellas moléculas que se producen en forma soluble y activa en bacterias. Este criterio produjo el aislamiento de una molécula scFv tandem con un enlazante de 6 residuos de amino ácido (ver Arndt, M. y J. Krauss (2003) Methods Mol. Biol. 207: 305-21). No es claro si esta secuencia de enlazante representa una solución general a la expresión soluble de moléculas scFv tandem. Sin embargo, este estudio demostró que el despliegue del fago de moléculas scFv tandem en combinación con mutagenesis dirigida es una herramienta poderosa para enriquecer estas moléculas, lo cual puede ser expresado en bacterias en una forma activa.

Los diacuerpos biespecíficos (Db) utilizan el formato de diacuerpo para la expresión. Los diacuerpos son producidos a partir de fragmentos scFv reduciendo la longitud del enlazante que conecta el dominio VH y VL hasta aproximadamente 5 residuos (ver Peipp, M. y T. Valerius (2002) Biochem. Soc. Trans. 30(4): 507-11). Esta reducción del tamaño del enlazante facilita la dimerización de dos cadenas de polipéptido mediante el emparejamiento entrecruzado de los dominios VH y VL. Los diacuerpos biespecíficos son

producidos expresando dos cadenas de polipéptido con, ya sea la estructura VHA-VLB y VHB-VLA (configuración VH-VL), o VLA-VHB y VLB-VHA (configuración VL-VH) dentro de la misma célula. Se ha producido una gran variedad de diferentes diacuerpos biespecíficos en el pasado y la mayoría de estos están expresados en forma soluble en bacterias. Sin embargo, un studio comparative reciente demuestra que la orientación de los dominios variables puede influir en la expresión y formación de sitios de unión activos (ver Mack, M. et al.(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92(15): 7021-5). Sin embargo, la expresión soluble en bacterias representa una ventaja importante sobre las moléculas scFv tandem. Sin embargo, como dos cadenas de polipéptido diferentes son expresadas en una sola célula, se pueden producir homodímeros inactivos junto con heterodímeros activos. Esto necesita la implementación de pasos de purificación adicionales con el fin de obtener preparaciones homogéneas de diacuerpos biespecíficos. Un enfoque para forzar la generación de diacuerpos biespecíficos es la producción de diacuerpos botón-en-ojal (ver Holliger, P., T. Prospero, y G. Winter (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90(14): 6444-8.18). Se demostró este enfoque para un diacuerpo biespecífico dirigido contra HER2 y CD3. Se introdujo un gran botón en el dominio VH intercambiando Val37 con Phe y Leu45 con Trp, y un agujero complementario se produjo en el dominio VL mutando Phe98 a Met y Tyr87 a Ala, ya sea en el dominio variable anti-HER2 o el anti-CD3. Usando este enfoque, la producción de diacuerpos biespecíficos podría aumentarse de 72% por el diacuerpo base a más del 90% por el diacuerpo botón-en-ojal. De manera importante, los rendimientos de producción solo disminuyeron ligeramente como un resultado de estas mutaciones. Sin embargo, se observó una reducción en la actividad de unión a antígeno para varios constructos. Así, este enfoque más bien elaborado requiere el análisis de varios constructos con el fin de identificar aquellas mutaciones que producen la molécula heterodimérica con actividad de unión no alterada. Adicionalmente, tal enfoque require la modificación mutacional de la secuencia de inmunoglobulina en la región constante, creando así la forma no native y no natural de la secuencia de anticuerpo, que puede producir inmunogenicidad aumentada, pobre estabilidad in vivo, así como farmacocinética indeseada.

Los diacuerpos de cadena sencilla (scDb) representan una estrategia alternativa para mejorar la formación de moléculas tipo diacuerpo biespecífico

(ver Holliger, P. y G. Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4): 128-30; Wu, A.M., et al. (1996) Immunotechnology 2(1): p. 21-36). Los diacuerpos de cadena sencilla biespecíficos son producidos conectando las dos cadenas de polipéptido formadoras de diacuerpo con un enlazante medio adicional con una longitud de aproximadamente 15 residuos de amino ácido. En consecuencia, todas las moléculas con un peso molecular correspondiente a diacuerpos de cadena sencilla monoméricos (50-60 kDa) son biespecíficos. Varios estudios han demostrado que los diacuerpos de cadena sencilla biespecíficos están expresados en bacterias en forma soluble y activa con la mayoría de moléculas purificadas presentes como monómeros (ver Holliger, P. y G. Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4): 128-30; Wu, A.M., et al. (1996) Immunotechnol. 2(1): 21-36; Pluckthun, A. y P. Pack (1997) Immunotechnol. 3(2): 83-105; Ridgway, J.B., et al. (1996) Protein Engin. 9(7): 617-21). Así, los diacuerpos de cadena sencilla combinan las ventajas de las scFvs tandem (todos los monómeros son biespecíficos) y los diacuerpos (expresión soluble en bacterias).

Más recientemente, los diacuerpos han sido fusionados a Fc para generar moléculas del tipo Ig, llamadas di-diacuerpos (ver Lu, D., et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(4): 2856-65). En adición, se ha descrito el constructo de anticuerpo multivalente que comprende dos repeticiones Fab en la cadena pesada de un IgG y que es capaz unirse a cuatro moléculas de antígeno (ver WO 0177342A1, y Miller, K., et al. (2003) J. Immunol. 170(9): 4854-61).

Existe una necesidad en la técnica de proteínas de unión multivalentes mejoradas capaces de unirse a dos o más antígenos. La solicitud de patente U.S. Serial No. 11/507,050 provee una familia novedosa de proteínas de unión capaces de unirse a dos o más antígenos con alta afinidad, las cuales son llamafas inmunoglobuilinas de dominio variable dual (DVD-Ig™). La presente invención prove proteínas de unión novedosas adicionales capaces de unirse a dos o más antígenos.

Resumen de la Invención

Esta invención se refiere a proteínas de unión multivalentes capaces de unirse a dos o más antígenos. La presente invención prove una familia

novedosa de proteínas de unión capaces de unirse a dos o más antígenos con alta afinidad.

En una realización, la invención prove una proteína de unión que comprende una cadena de polipéptido, en donde la cadena de polipéptido comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, C es un dominio constante, X1 representa un amino ácido o polipéptido, X2 representa una región Fc y n es 0 o 1. En una realización, el VD1 y VD2 en la proteína de unión son dominios variables de cadena pesada. En otra realización, el dominio variable de cadena pesada se selecciona del grupo que consist de un dominio variable de cadena pasada murino, un dominio variable de cadena pesada humano, un dominio variable de cadena pesada de CDR injertada, y un dominio variable de cadena pesada humanizado. En ya otra realización VD1 y VD2 son capaces de unirse al mismo antígeno. En otra realización VD1 y VD2 son capaces de unirse a diferentes antígenos. En aún otra realización, C es un dominio constante de cadena pesada. Por ejemplo, X1 es un enlazante con la condición que X1 no es CH1. Por ejemplo, X1 es un enlazante seleccionado del grupo que consiste de AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 4); SAKTTP (SEQ ID NO: 5); RADAAP (SEQ ID NO: 6); RADAAPTVS (SEQ ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEQ ID NO: 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 10); ADAAP (SEQ ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 12); TVAAP (SEQ ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 14); QPKAAP (SEQ ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 16); AKTTPP (SEQ ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 18); AKTTAP (SEQ ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 20); ASTKGP (SEQ ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 26). En una realización, X2 es una región Fc. En otra realización, X2 es una región Fc variante.

En una realización, la proteína de unión aquí revelada comprende una cadena de polipéptido, en donde la cadena de polipéptido comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena

pesada, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, C es un dominio constante de cadena pesada, X1 es un enlazante, con la condición que no sea CH1, y X2 es una región Fc.

En una realización, VD1 y VD2 en la proteína de unión son dominios variables de cadena ligera. En una realización, el dominio variable de cadena ligera se selecciona del grupo que consiste de un dominio variable de cadena ligera murino, un dominio variable de cadena ligera humano, un dominio variable de cadena ligera de CDR injertada, y un dominio variable de cadena ligera humanizado. En una realización, VD1 y VD2 son capaces de unirse al mismo antígeno. En otra realización VD1 y VD2 son capaces de unirse a diferentes antígenos. En una realización, C es un dominio constante de cadena ligera. En otra realización, X1 es un enlazante, con la condición que X1 no es CL1. En una realización, X1 es un enlazante seleccionado del grupo que consiste de AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 4); SAKTTP (SEQ ID NO: 5); RADAAP (SEQ ID NO: 6); RADAAPTVS (SEQ ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEQ ID NO: 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 10); ADAAP (SEQ ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 12); TVAAP (SEQ ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 14); QPKAAP (SEQ ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 16); AKTTPP (SEQ ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 18); AKTTAP (SEQ ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 20); ASTKGP (SEQ ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 22) GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 26). En una realización, la proteína de unión no comprende X2.

En una realización, tanto la cadena pesada variable como la ligera variable comprenden el mismo enlazante. En otra realización, la cadena pesada variable y la cadena ligera variable comprenden enlazantes diferentes. En otra realización, tanto la cadena pesada variable como la ligera variable comprenden un enlazante corto (aproximadamente 6 amino ácidos). En otra realización, tanto la cadena pesada variable como la ligera variable comprenden un enlazante largo (mayor de 6 amino ácidos). En otra realización, la cadena pesada variable comprende un enlazante corto y la

cadena ligera comprende un enlazante largo. En otra realización, la cadena pesada variable comprende un enlazante largo y la cadena ligera variable comprende un enlazante corto.

En una realización, la proteína de unión aquí revelada comprende una cadena de polipéptido, en donde dicha cadena de polipéptido comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es es un primer dominio variable de cadena ligera, VD2 es es un segundo dominio variable de cadena ligera, C es un dominio constante de cadena ligera, X1 es un enlazante, con la condición que no sea CH1, y X2 no comprenda una región Fc.

En otra realización, la invención provee una proteína de unión que comprende dos cadenas de polipéptido, en donde dicha pimera cadena de polipéptido comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, C es un dominio constante de cadena pesada, X1 es un enlazante, con la condición que no sea CH1, y X2 es una región Fc; y dicha segunda cadena de polipéptido comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera, VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera, C es un domino constante de cadena ligera, X1 es un enlazante, con la condición que no sea CH1, y X2 no comprenda una región Fc. En una realización particular, la proteína de unión de Dominio Variable Dual (DVD) comprende cuatro cadenas de polipéptido, en donde las primeras dos cadenas de polipéptido comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, respectivamente, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, C es un dominio constante de cadena pesada, X1 es un enlazante, con la condición que no sea CH1, y X2 es una región Fc; y las dos segundas cadenas de polipéptido comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n respectivamnte, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera, VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera, C es un dominio constande de cadena ligera, X1 es un enlazante, con la condición que no sea CH1, y X2 no comprende una región Fc. Tal proteína de Dominio Variable Dual (DVD) tiene cuatro sitios de unión a antígeno.

En otra realización, las proteínas de unión aquí reveladas son capaces de unirse a uno o más objetivos. En una realización, el objetivo es seleccionado del grupo que consiste de citoquinas, proteínas de superficie celular, enzimas y receptoes. En otra realización, la proteína de unión es capaz de modular una función biológica de uno o más objetivos. En otra realización, la proteína de unión es capaz de neutralizar uno o más objetivos. La proteína de unión de la invención es capaz de unirse a citoquinas seleccionadas del grupo que consiste de linfoquinas, monoquinas, hormonas de polipéptido, receptores, o marcadores de tumor. Por ejemplo, el DVD-Ig de la invención es capaz de unirse a dos o más de los siguientes: CD-20, CD-19, CD-80, CD-22, CD-40, CD-3, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), receptor de factor de crecimieno epidérmico (EGFR), factor 1,2 de crecimiento del tipo insulina (IGF1,2), recepor del factor de crecimiento del tipo insulina (IGF1R), tirosina quinasa del receptor de proteína estimulante de macrófago (RON), factor de crecimiento de hepatocito (HGF), factor de transición mesenquimatoso-epitelial (c-MET), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), homólogo 4 en Delta de Drosophila (DLL4), neuropilina 1 (NRP1), factor de crecimiento placentario (PLGF), homólogo 3 del oncógeno viral de leucemia eritroblástica aviar v-erb-b2 (ErbB3) (ver también Tabla 2). En una realización específica, la proteína de unión es capaz de unirse a pares de objetivos seleccionaos del grupo que consiste de CD-20 y CD-19; CD-20 y CD-80; CD-20 y CD-22; CD-20 y CD-40; CD-3 y HER-2; CD-3 y CD-19; EGFR y HER-2; EGFR y CD-3; EGFR e IGF1,2; EGFR e IGF1R; EGFR y RON; EGFR y HGF; EGFR y c-MET; HER-2 e IGF1,2; HER-2 e IGF1R; RON y HGF; VEGF y EGFR; VEGF y HER-2; VEGF y CD-20; VEGF e IGF1,2; VEGF y DLL4; VEGF y HGF; VEGF y RON; VEGF y NRP1; CD-20 y CD3; DLL-4 y PLGF; VEGF y PLGF; ErbB3 y EGFR; ErbB3 y HGF; HER-2 y ErbB3; c-Met y ErB3; PLGF y HER-2; HER-2 y HER-2.

En una realización, la proteína de unión capad de unirse a CD-20 y CD-19 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 99 y SEQ ID NO. 101; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 100 y SEQ ID NO. 102. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-20 y CD-19 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 99 y una

secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 100. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-20 y CD-19 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 101 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 102.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-20 y CD-3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 103 y SEQ ID NO. 105; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 104 y SEQ ID NO. 106. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-20 y CD-3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 103 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 104. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse CD-20 y CD-3 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 105 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 106.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-20 y CD-80 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 107 y SEQ ID NO. 109; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 108 y SEQ ID NO. 110. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-20 y CD-80 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 107 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 108. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-20 y CD-80 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 109 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 110.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-20 y CD-22 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 111 y SEQ ID NO. 113; y

una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 112 y SEQ ID NO. 114. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-20 y CD-22 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 111 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 112. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-20 y CD-22 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 113 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 114.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-20 y CD-40 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 115 y SEQ ID NO. 117; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 116 y SEQ ID NO. 118. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-20 y CD-40 comprises una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 115 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 116. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-20 y CD-40 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 117 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 118.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 1) y HER-2 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 119 y SEQ ID NO. 121; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 120 y SEQ ID NO. 122. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 1) y HER-2 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 119 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 120. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 1) y HER-2 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 121 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 122.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 1) y CD-19 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 123 y SEQ ID NO. 125; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 124 y SEQ ID NO. 126. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 1) y CD-19 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 123 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 124. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 1) y CD-19 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 125 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 126.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y HER-2 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 127 y SEQ ID NO. 129; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 128 y SEQ ID NO. 130. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y HER-2 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 127 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 128. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse EGFR (seq. 2) y HER-2 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 129 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 130.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y CD-3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 131 y SEQ ID NO. 133; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 132 y SEQ ID NO. 136. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y CD-3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 131 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 132. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y CD-3 (seq. 1) tiene una orientación inversa y

comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 133 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 134.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1,2 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 135 y SEQ ID NO. 137; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 136 y SEQ ID NO. 138. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1,2 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 135 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 136. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1,2 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 137 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 138.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 139 y SEQ ID NO. 140; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 141 y SEQ ID NO. 142. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 139 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 140. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 141 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 142.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 143 y SEQ ID NO. 145; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de

DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 144 y SEQ ID NO. 146. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 143 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 144. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 145 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 146.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 147 y SEQ ID NO. 149; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 148 y SEQ ID NO. 150. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 147 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 148. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 149 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 150.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 151 y SEQ ID NO. 153; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 152 y SEQ ID NO. 154. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 151 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 152. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 153 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 154.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 155 y SEQ ID NO. 157; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 156 y SEQ ID NO. 158. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 155 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 156. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 157 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 158.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 159 y SEQ ID NO. 161; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 160 y SEQ ID NO. 162. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 159 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 160. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 161 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 162.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 163 y SEQ ID NO. 165; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 164 y SEQ ID NO. 166. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 163 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 164. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 165 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 166.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 167 y SEQ ID NO. 169; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 168 y SEQ ID NO. 170. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 167 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 168. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 169 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 170.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 171 y SEQ ID NO. 173; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 172 y SEQ ID NO. 174. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 171 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 172. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 173 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 174.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 175 y SEQ ID NO. 177; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 176 y SEQ ID NO. 178. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 175 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 176. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 177 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 178.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 179 y SEQ ID NO. 181; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 180 y SEQ ID NO. 182. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 179 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 180. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 181 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 182.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 183 y SEQ ID NO. 185; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 184 y SEQ ID NO. 186.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 183 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 184. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 185 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 186.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 187 y SEQ ID NO. 189; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 188 y SEQ ID NO. 190. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 187 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 188. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 189 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 190.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 191 y SEQ ID NO. 193; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 192 y SEQ ID NO. 194. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 191 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 192. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO.193 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 194.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 195 y SEQ ID NO. 197; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 196 y SEQ ID NO. 198. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 195 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 196. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 197 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 198.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 199 y SEQ ID NO. 201; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 200 y SEQ ID NO. 202. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 199 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 200. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 201 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 202.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 203 y SEQ ID NO. 205; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 204 y SEQ ID NO. 206. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 203 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de

DVD de SEQ ID NO: 204. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y HGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 205 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 206.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y c-MET comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 207 y SEQ ID NO. 209; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 208 y SEQ ID NO. 210. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y c-MET comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 207 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 208. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y c-MET tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 209 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 210.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) e IGF1,2 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 211 y SEQ ID NO. 213; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 212 y SEQ ID NO. 214. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) e IGF1,2 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 211 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 212. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) e IGF1,2 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 213 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 214.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) e IGF1R comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 215 y SEQ ID NO.

217; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 216 y SEQ ID NO. 218. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) e IGF1R comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 215 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 216. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) e IGF1R tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 217 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 218.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a RON (seq. 1) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 219 y SEQ ID NO. 221; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 220 y SEQ ID NO. 222. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a RON (seq. 1) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 219 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 220. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a RON (seq. 1) y HGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 221 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 222.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y EGFR (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 223 y SEQ ID NO. 225; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 224 y SEQ ID NO. 226. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y EGFR (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 223 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 224. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y EGFR (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 225 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 226.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HER-2 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 227 y SEQ ID NO. 229; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 228 y SEQ ID NO. 230. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HER-2 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 227 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 228. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HER-2 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 229 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 230.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y CD-20 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 231 y SEQ ID NO. 233; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 232 y SEQ ID NO. 234. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y CD-20 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 231 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 232. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y CD-20 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 233 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 234.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) e IGF1,2 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 235 y SEQ ID NO. 237; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 236 y SEQ ID NO. 238. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) e IGF1,2 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 235 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 236. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF

(seq. 1) e IGF1,2 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 237 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 238.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 239 y SEQ ID NO. 241; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 240 y SEQ ID NO. 242. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 239 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 240. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 241 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 242.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 243 y SEQ ID NO. 245; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 244 y SEQ ID NO. 246. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 243 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 244. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 245 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 246.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO.

247 y SEQ ID NO. 249; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 248 y SEQ ID NO. 250. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 247 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 248. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 249 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 250.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 251 y SEQ ID NO. 253; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 252 y SEQ ID NO. 254. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 251 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 252. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 253 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 254.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 255 y SEQ ID NO. 257; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 256 y SEQ ID NO. 258. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 255 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 256. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 257 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 258.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y RON (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 259 y SEQ ID NO. 261; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 260 y SEQ ID NO. 262. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y RON (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 259 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 260. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y RON (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 261 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 262.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y NRP1 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 263 y SEQ ID NO. 265; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 264 y SEQ ID NO. 266. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y NRP1 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 263 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 264. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y NRP1 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 265 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 266.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a RON (seq. 2) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 267 y SEQ ID NO. 269; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 268 y SEQ ID NO. 270. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a RON (seq. 2) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 267 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 268. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a RON (seq. 2) y HGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 269 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 270.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a RON (seq. 2) y EGFR (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 271 y SEQ ID NO. 273; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 272 y SEQ ID NO. 274. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a RON (seq. 2) y EGFR (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 271 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 272. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a RON (seq. 2) y EGFR (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 273 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 274.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a RON (seq. 2) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 275 y SEQ ID NO. 277; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 276 y SEQ ID NO. 278. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a RON (seq. 2) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 275 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 276. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a RON (seq. 2) y VEGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 277 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 278.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y HER-2 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 279 y SEQ ID NO. 281; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 280 y SEQ ID NO. 282. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y HER-2 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 279 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 280. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y HER-2 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 281 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 282.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y CD-3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 283 y SEQ ID NO. 285; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 284 y SEQ ID NO. 286. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y CD-3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 283 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 284. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y CD-3 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 285 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 286.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) e IGF1R comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 287 y SEQ ID NO. 289; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 288 y SEQ ID NO. 290. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) e IGF1R comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 287 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ

ID NO: 288. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) e IGF1R tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 289 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 290.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y RON (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 291 y SEQ ID NO. 293; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 292 y SEQ ID NO. 294. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y RON (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 291 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 292. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y RON (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 293 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 294.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y RON (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 295 y SEQ ID NO. 297; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 296 y SEQ ID NO. 298. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y RON (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 295 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 296. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y RON (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 297 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 298.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 299 y SEQ ID

NO. 301; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 300 y SEQ ID NO. 302. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y HGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 299 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 300. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y HGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 301 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 302.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y c-MET comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 303 y SEQ ID NO. 305; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 304 y SEQ ID NO. 306. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y c-MET comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 303 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 304. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1 y c-MET tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 305 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 306.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 307 y SEQ ID NO. 309; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 308 y SEQ ID NO. 310. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 307 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 308. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y VEGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 309 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 310.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a NRP1 (seq. 2) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 311 y SEQ ID NO. 313; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 312 y SEQ ID NO. 314. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a NRP1 (seq. 2) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 311 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 312. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a NRP1 (seq. 2) y VEGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 313 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 314.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y CD-20 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 315 y SEQ ID NO. 317; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 316 y SEQ ID NO. 318. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y CD-20 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 315 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 316. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y CD-20 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 317 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 318.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y HER-2 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 319 y SEQ ID NO. 321; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 320 y SEQ ID NO. 322.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y HER-2 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 319 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 320. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y HER-2 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 321 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 322.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y CD-19 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 323 y SEQ ID NO. 325; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 324 y SEQ ID NO. 326. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y CD-19 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 323 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 324. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y CD-19 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 325 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 326.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y EGFR (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 327 y SEQ ID NO. 329; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 328 y SEQ ID NO. 330. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y EGFR (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 327 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 328. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse CD-3 (seq. 2) y EGFR (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 329 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 330.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y EGFR (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 331 y SEQ ID NO. 333; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 332 y SEQ ID NO. 334. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y EGFR (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 331 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 332. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a CD-3 (seq. 2) y EGFR (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 333 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 334.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) e IGF1,2 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 335 y SEQ ID NO. 337; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 336 y SEQ ID NO. 338. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) e IGF1,2 comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 335 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 336. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) e IGF1,2 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 337 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 338.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a DLL-4 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 339 y SEQ ID NO. 341; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 340 y SEQ ID NO. 342. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a DLL-4 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 339 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 340. En otra realización, la proteína de unión capaz de

unirse a DLL-4 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 341 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 342.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 343 y SEQ ID NO. 345; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 344 y SEQ ID NO. 346. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 343 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 344. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 345 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 346.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 347 y SEQ ID NO. 349; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 348 y SEQ ID NO. 350. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 347 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 348. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 349 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 350.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena

pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 351 y SEQ ID NO. 353; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 352 y SEQ ID NO. 354. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 351 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 352. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 353 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 354.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 355 y SEQ ID NO. 357; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 356 y SEQ ID NO. 358. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 355 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 356. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 357 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 358.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 359 y SEQ ID NO. 361; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 360 y SEQ ID NO. 362. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 359 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 360. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) tiene una orientación inversa y

comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 361 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 362.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 363 y SEQ ID NO. 365; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 364 y SEQ ID NO. 366. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 363 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 364. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 365 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 366.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 367 y SEQ ID NO. 369; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 368 y SEQ ID NO. 370. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 367 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 368. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 369 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 370.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 371 y

SEQ ID NO. 373; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 372 y SEQ ID NO. 374. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 371 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 372. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 373 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 374.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 375 y SEQ ID NO. 377; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 376 y SEQ ID NO. 378. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 375 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 376. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 377 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 378.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 379 y SEQ ID NO. 381; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 380 y SEQ ID NO. 382. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO.379 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 380. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 381 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 382.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 383 y SEQ ID NO. 385; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 384 y SEQ ID NO. 386. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 383 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 384. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 385 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 386.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 387 y SEQ ID NO. 389; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 388 y SEQ ID NO. 390. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 387 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 388. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 389 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 390.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 391 y SEQ ID NO. 393; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 392 y SEQ ID NO. 394. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 391 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 392. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 393 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 394.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 395 y SEQ ID NO. 397; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 396 y SEQ ID NO. 398. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 395 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 396. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 397 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 398.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 399 y SEQ ID NO. 401; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 400 y SEQ ID NO. 402. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 399 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 400. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 401 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 402.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 403 y SEQ ID NO. 405; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 404 y SEQ ID NO. 406. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 403 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 404. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 405 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 406.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 407 y SEQ ID NO. 409; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 408 y SEQ ID NO. 410. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO.407 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 408. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 409 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 410.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO.411 y SEQ ID NO. 413; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera

de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 412 y SEQ ID NO. 414. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 411 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 412. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 413 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 414.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 415 y SEQ ID NO. 417; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 416 y SEQ ID NO. 418. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 415 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 416. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 417 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 418.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 419 y SEQ ID NO. 421; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 420 y SEQ ID NO. 422. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 419 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 420. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 421 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 422.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 423 y SEQ ID NO. 425; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 424 y SEQ ID NO. 426. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 423 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 424. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 425 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 426.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 427 y SEQ ID NO. 429; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 428 y SEQ ID NO. 430. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 427 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 428. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 429 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 430.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 431 y SEQ ID NO. 433; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 432 y SEQ ID NO. 434. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 431 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 432. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 433 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 434.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 435 y SEQ ID NO. 437; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 436 y SEQ ID NO. 438. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 435 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 436. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 437 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 438.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 439 y SEQ ID NO. 441; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 440 y SEQ ID NO. 442. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 439 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 440. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 441 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 442.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 443 y SEQ ID NO. 445; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 444 y SEQ ID NO. 446. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 443 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 444. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 445 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 446.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 447 y SEQ ID NO. 449; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 448 y SEQ ID NO. 450. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 447 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 448. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 449 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 450.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 451 y SEQ ID NO. 453; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 452 y SEQ ID NO. 454. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 451 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 452. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 453 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 454.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 455 y SEQ ID NO. 457; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 456 y SEQ ID NO. 458. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 455 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 456. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 457 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 458.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 459 y SEQ ID NO. 461; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 460 y SEQ ID NO. 462. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 459 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 460. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 461 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 462.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 463 y SEQ ID NO. 465; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 464 y SEQ ID NO. 466. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 463 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 464. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 465 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 466.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 467 y SEQ ID NO. 469; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 468 y SEQ ID NO. 470. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 467 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 468. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 469 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 470.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 471 y SEQ ID NO. 473; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 472 y SEQ ID NO. 474. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 471 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 472. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 473 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 474.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 475 y SEQ ID NO. 477; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 476 y SEQ ID NO. 478. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 475 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 476. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 477 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 478.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 479 y SEQ ID NO. 481; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 480 y SEQ ID NO. 482. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 479 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 480. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 481 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 482.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 483 y SEQ ID NO. 485; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 484 y SEQ ID NO. 486. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 483 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 484. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 485 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 486.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 487 y SEQ ID NO. 489; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 488 y SEQ ID NO. 490. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 487 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 488. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 489 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 490.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 491 y SEQ ID NO. 493; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de

DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 492 y SEQ ID NO. 494. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 491 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 492. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 493 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 494.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 495 y SEQ ID NO. 497; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 496 y SEQ ID NO. 498. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 495 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 496. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 497 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 498.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 499 y SEQ ID NO. 501; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 500 y SEQ ID NO. 502. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 499 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 500. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 501 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 502.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 503 y SEQ ID NO. 505; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 504 y SEQ ID NO. 506. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 503 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 504. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 505 y una secuencia de aminó ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 506.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 507 y SEQ ID NO. 509; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 508 y SEQ ID NO. 510. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 507 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 508. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 509 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 510.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 511 y SEQ ID NO. 513; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 512 y SEQ ID NO. 514. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 511 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 512. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 513 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 514.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 515 y SEQ ID NO. 517; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 516 y SEQ ID NO. 518. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 515 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 516. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 517 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 518.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 519 y SEQ ID NO. 521; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 520 y SEQ ID NO. 522. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 519 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 520. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 521 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 522.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 523 y SEQ ID NO. 525; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 524 y SEQ ID NO. 526. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 523 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 524. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 525 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 526.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 527 y SEQ ID NO. 529; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 528 y SEQ ID NO. 530. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 527 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 528. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 529 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 530.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 531 y SEQ ID NO. 533; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 532 y SEQ ID NO. 534. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 531 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 532. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 533 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 534.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 535 y SEQ ID NO. 537; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 536 y SEQ ID NO. 538. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 535 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 536. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 537 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 538.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 539 y SEQ ID NO. 541; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 540 y SEQ ID NO. 542. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 539 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 540. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 541 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 542.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 543 y SEQ ID NO. 545; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 544 y SEQ ID NO. 546. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 543 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 544. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 545 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 546.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 547 y SEQ ID NO. 549; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 548 y SEQ ID NO. 550. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 547 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 548. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 4) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 549 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 550.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 551 y SEQ ID NO. 553; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de

DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO.552 y SEQ ID NO. 554. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 551 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 552. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 4) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 553 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 554.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 555 y SEQ ID NO. 557; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 556 y SEQ ID NO. 558. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 555 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 556. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 4) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 557 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 558.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 559 y SEQ ID NO. 561; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 560 y SEQ ID NO. 562. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 559 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 560. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y DLL-4 (seq. 4) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 561 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 562.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 563 y SEQ ID NO. 565; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 564 y SEQ ID NO. 566. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 563 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 564. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 4) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 565 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 566.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 567 y SEQ ID NO. 569; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 568 y SEQ ID NO. 570. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 567 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 568. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 4) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 569 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 570.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 571 y SEQ ID NO. 573; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 572 y SEQ ID NO. 574. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 571 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 572. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 4.) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 573 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 574.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 575 y SEQ ID NO. 577; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 576 y SEQ ID NO. 578. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 575 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 576. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y DLL-4 (seq. 4) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 577 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 578.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 579 y SEQ ID NO. 581; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 580 y SEQ ID NO. 582. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 579 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 580. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 4) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 581 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 582.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 583 y SEQ ID NO. 585; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 584 y SEQ ID NO. 586. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 583 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 584. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 4) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 585 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 586.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 587 y SEQ ID NO. 589; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 588 y SEQ ID NO. 590. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 587 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 588. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 4) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 589 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 590.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 591 y SEQ ID NO. 593; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 592 y SEQ ID NO. 594. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 4) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 591 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 592. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y DLL-4 (seq. 4) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 593 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 594.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 595 y SEQ ID NO. 597; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 596 y SEQ ID NO. 598. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 595 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 596. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 597 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 598.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 599 y SEQ ID NO. 601; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 600 y SEQ ID NO. 602. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 599 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 600. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 601 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 602.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 603 y SEQ ID NO. 605; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 604 y SEQ ID NO. 606. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 603 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 604. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 605 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 606.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 607 y SEQ ID NO. 609; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 608 y SEQ ID NO. 610. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 607 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 608. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 609 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 610.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 611 y SEQ ID NO. 613; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 612 y SEQ ID NO. 614. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 611 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 612. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 613 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 614.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 615 y SEQ ID NO. 617; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 616 y SEQ ID NO. 618. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 615 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 616. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 617 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 618.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 619 y SEQ ID NO. 621; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 622 y SEQ ID NO. 624. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 619 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 620. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 621 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 622.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 623 y SEQ ID NO. 625; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 624 y SEQ ID NO. 626. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 623 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 624. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 625 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 626.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 627 y SEQ ID NO. 629; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 628 y SEQ ID NO. 630. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 627 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 628. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 629 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 630.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 631 y SEQ ID NO. 633; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de

DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 632 y SEQ ID NO. 634. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 631 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 632. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 633 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 634.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 635 y SEQ ID NO. 637; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 636 y SEQ ID NO. 638. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 635 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 636. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 637 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 638.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 639 y SEQ ID NO. 641; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 640 y SEQ ID NO. 642. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 639 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 640. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 641 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 642.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 643 y SEQ ID NO. 645; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 644 y SEQ ID NO. 646. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 643 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 644. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 645 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 646.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 647 y SEQ ID NO. 649; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 648 y SEQ ID NO. 650. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 647 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 648. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 649 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 650.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 651 y SEQ ID NO. 653; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de

DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 652 y SEQ ID NO. 654. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 651 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 652. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 653 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 654.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 655 y SEQ ID NO. 657; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 656 y SEQ ID NO. 658. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 655 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 656. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 657 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 658.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 659 y SEQ ID NO. 661; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 660 y SEQ ID NO. 662. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 659 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 660. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 661 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 662.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 663 y SEQ ID NO. 665; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 664 y SEQ ID NO. 666. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 663 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 664. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 665 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 666.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 667 y SEQ ID NO. 669; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 668 y SEQ ID NO. 670. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 667 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 668. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 669 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 670.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 671 y SEQ ID NO. 673; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 672 y SEQ ID NO. 674. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 671 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 672. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 673 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 674.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 675 y SEQ ID NO. 677; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 676 y SEQ ID NO. 678. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 675 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 676. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 677 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 678.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 679 y SEQ ID NO. 681; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 680 y SEQ ID NO. 682. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 679 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 680. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 681 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 682.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 683 y SEQ ID NO. 685; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 684 y SEQ ID NO. 686. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 683 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 684. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 685 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 686.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 687 y SEQ ID NO. 689; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 688 y SEQ ID NO. 690. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 687 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 688. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 689 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 690.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 691 y SEQ ID NO. 693; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 692 y SEQ ID NO. 694. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 691 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 692. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 693 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 694

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 695 y SEQ ID NO. 697; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 696 y SEQ ID NO. 698. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 695 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 696. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 697 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 698.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 699 y SEQ ID NO. 701; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 700 y SEQ ID NO. 702. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 699 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 700. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 701 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 702.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 703 y SEQ ID NO. 705; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 704 y SEQ ID NO. 706. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 703 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 704. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 705 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 706.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 707 y SEQ ID NO. 709; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 708 y SEQ ID NO. 710. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 707 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 708. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 709 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 710.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 711 y SEQ ID NO. 713; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de

DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 712 y SEQ ID NO. 714. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 711 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 712. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 713 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 714.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 715 y SEQ ID NO. 717; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 716 y SEQ ID NO. 718. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 715 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 716. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 717 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 718.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 719 y SEQ ID NO. 721; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 720 y SEQ ID NO. 722. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 719 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 720. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 721 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 722.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 723 y SEQ ID NO. 725; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 724 y SEQ ID NO. 726. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 723 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 724. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 725 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 726.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 727 y SEQ ID NO. 729; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 728 y SEQ ID NO. 730. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 727 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 728. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 729 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 730.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 731 y SEQ ID NO. 733; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 732 y SEQ ID NO. 734. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 731 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 732. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 733 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 734.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 735 y SEQ ID NO. 737; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 736 y SEQ ID NO. 738. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 735 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 736. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 737 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 738.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 739 y SEQ ID NO. 741; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 740 y SEQ ID NO. 742. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 739 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 740. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 741 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 742.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 743 y SEQ ID NO. 745; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 744 y SEQ ID NO. 746. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 743 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 744. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 745 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 746.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 747 y SEQ ID NO. 749; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 748 y SEQ ID NO. 750. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 747 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 748. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 749 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 750.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 751 y SEQ ID NO. 753; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 752 y SEQ ID NO. 754. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 751 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 752. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 753 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 754.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 755 y SEQ ID NO. 757; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 756 y SEQ ID NO. 758. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 755 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 756. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 757 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 758.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 759 y SEQ ID NO. 761; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 760 y SEQ ID NO. 762. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 759 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 760. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 761 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 762.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 763 y SEQ ID NO. 765; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 764 y SEQ ID NO. 766. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 763 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 764. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 765 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 766.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 767 y SEQ ID NO. 769; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 768 y SEQ ID NO. 770. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 767 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 768. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 769 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 770.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 771 y SEQ ID NO. 773; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada

del grupo que consiste de SEQ ID NO. 772 y SEQ ID NO. 774. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 771 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 772. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 773 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 774.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 775 y SEQ ID NO. 777; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 776 y SEQ ID NO. 778. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 775 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 776. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 777 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 778.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 779 y SEQ ID NO. 781; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 780 y SEQ ID NO. 782. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 779 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 780. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 781 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 782.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 783 y SEQ ID NO. 785; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 784 y SEQ ID NO. 786. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 783 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 784. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 785 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 786.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 787 y SEQ ID NO. 789; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 788 y SEQ ID NO. 790. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 787 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 788. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 789 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 790.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 791 y SEQ ID NO. 793; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 792 y SEQ ID NO. 794. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 791 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de

DVD de SEQ ID NO: 792. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 793 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 794.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 795 y SEQ ID NO. 797; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 796 y SEQ ID NO. 798. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 795 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 796. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 797 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 798.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 799 y SEQ ID NO. 801; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 800 y SEQ ID NO. 802. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 799 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 800. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 801 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 802.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 803 y SEQ ID NO. 805; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 804 y SEQ ID NO. 806. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 803 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 804. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 805 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 806.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 807 y SEQ ID NO. 809; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 808 y SEQ ID NO. 810. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 807 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 808. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 809 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 810.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 811 y SEQ ID NO. 813; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 812 y SEQ ID NO. 814. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 811 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de

DVD de SEQ ID NO: 812. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 813 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 814.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 815 y SEQ ID NO. 817; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 816 y SEQ ID NO. 818. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 815 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 816. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 817 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 818.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 819 y SEQ ID NO. 821; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 820 y SEQ ID NO. 822. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 819 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 820. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 821 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 822.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 823 y SEQ ID NO. 825; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 824 y SEQ ID NO. 826. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 823 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 824. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 825 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 826.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 827 y SEQ ID NO. 829; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 828 y SEQ ID NO. 830. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 827 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 828. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 829 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 830.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 831 y SEQ ID NO. 833; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 832 y SEQ ID NO. 834. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 831 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 832. En otra realización, la proteína de unión capaz de

unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 833 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 834.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 835 y SEQ ID NO. 837; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 836 y SEQ ID NO. 838. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 835 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 836. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 837 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 838.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 839 y SEQ ID NO. 841; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 840 y SEQ ID NO. 842. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 839 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 840. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 841 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 842.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 843 y

SEQ ID NO. 845; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 844 y SEQ ID NO. 846. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 843 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 844. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 845 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 846.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 847 y SEQ ID NO. 849; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 848 y SEQ ID NO. 850. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 847 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 848. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 849 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 850.

En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y HER-2 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 851 y SEQ ID NO. 853; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 852 y SEQ ID NO. 854. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y HER-2 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 851 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 852. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y HER-2 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ

ID NO. 853 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 854.

En una segunda realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y HER-2 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 855 y SEQ ID NO. 857; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 856 y SEQ ID NO. 858. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y HER-2 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 855 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 856. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y HER-2 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 857 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 858.

En una tercera realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y HER-2 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 859 y SEQ ID NO. 861; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 860 y SEQ ID NO. 862. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y HER-2 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 859 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 860. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y HER-2 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 861 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 862.

En una cuarta realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y HER-2 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 863 y SEQ ID NO. 865; y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD

seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO. 864 y SEQ ID NO. 866. En una realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y HER-2 (seq. 2) comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 863 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 864. En otra realización, la proteína de unión capaz de unirse a HER-2 (seq. 1) y HER-2 (seq. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de amino ácido de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 865 y una secuencia de amino ácido de cadena ligera de DVD de SEQ ID NO: 866.

En otra realización, la invención provee una proteína de unión que comprende una cadena de polipéptido, en donde dicha cadena de polipéptido chain comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlazante, con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente. En una realización, la región Fc está ausente en la proteína de unión.

En otra realización, la invención provee una proteína de unión que comprende una candena de polipéptido, en donde dicha cadena de polipéptido comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente. En una realización, (X2)n está ausente en la proteína de unión.

En otra realización, la proteína de unión de la invención comprende cadenas de polipéptido primera y segunda, en donde dicha primera cadena de polipéptido comprede un primer VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; y en donde dicha segunda cadena de polipéptido comprende un segundo VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente. En otra realización, la proteína de unión comprende dos primeras cadenas de polipéptido y dos segundas cadenas de polipéptido. En aún otra realización, (X2)n está ausente en el segundo polipéptido. En ún otra realización, la región Fc, si está presente en el primer polipéptido, se selecciona del grupo que consiste de región Fc de secuencia nativa y una región Fc de secuencia variante. En aún otra realización, la región Fc se selecciona del grupo que consiste de una región Fc de un IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, e IgD.

En otra realización, la proteína de unión de la invención es un DVD-Ig capaz de unirse a dos antígenos, que comprende cuatro cadenas de polipéptido, en donde, las cadenas de polipéptido primera y tercera comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está

presente o ausente; y en donde las cadenas de polipéptido segunda y cuarta comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente.

La invención provee un método para preparar una proteína de unión DVD-Ig preseleccionando los anticuerpos base. En una realización, el método para preparar Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual capaz de unirse a dos antígenos comprende los pasos de a) obtener un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse a un primer antígeno; b) obtener un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse a un segundo antígeno; c) construir cadenas de polipéptido primera y tercera que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; d) construir cadenas de polipéptido segunda y cuarta que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de dicho segundo anticuerpo base o unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; e) expresar dichas cadenas de polipéptido primera, segunda, tercera y cuarta; de forma que se genera una Inmunoglobulina de Dominio Variable dual capaz de unirse a dicho primer y segundo antígeno.

En aún otra realización, la invención provee un método para generar una inmunoglobulina de Dominio Variable Dual capaz de unirse a dos antígenos con las propiedades deseadas, que comprende los pasos de a) obtener un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse a un primer antígeno y que posee al menos una propiedad deseada exhibida por la Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual; b) obtener un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse a un segundo antígeno y que posee al menos una propiedad deseada exhibida por la Inmunoglobulina de Dominio Variable dual; c) construir las cadenas de polipéptido primera y tercera que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; d) construir las cadenas de polipéptido segunda y cuarta que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; e) expresar dichas cadenas de polipéptido primera, seggunda, tercera y cuarta; de forma que se genere una Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual capaz de unirse a sicho primer y segundo antígenos con las propiedades deseadas.

En una realización, el VDI de las cadenas de polipéptido primera y segunda aquí reveladas, se obtiene del mismo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo. En otra realización, el VDI de las cadenas de polipéptido primera y segunda aquí reveladas se obtiene de diferentes anticuerpos base o porciones de unión a antígeno de los mismos. En otra realización, el VD2 de las cadenas de polipéptido primera y segunda aquí reveladas se obtiene del mismo anticuerpo base o porción de unión a antígeno

del mismo. En otra realización, el VD2 de las cadenas de polipéptido primera y segunda aquí reveladas se obtiene de diferentes anticuerpos base o porciones de unión a antígeno de los mismos.

En una realización, el primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, son el mismo anticuerpo. En otra realización, el primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, son anticuerpos diferentes.

En una realización, el primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une a un primer antígeno, y el segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une a un segundo antígeno. En una realización particular, el primer y segundo antígenos son el mismo antígeno. En otra realización, los anticuerpos base se unen a epítopos diferentes en el mismo antigeno. En otra realización, el primer y Segundo antígenos son antígenos diferentes. En otra realización, el primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une al primer antígeno con una potencia diferente a la potencia con la cual el segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une al segundo antígeno. En ya otra realización, el primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une al primer antígeno con una afinidad diferente de la afinidad con la cual el segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une al segundo antígeno.

En otra realización, el primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, son seleccionados del grupo que consiste de, anticuerpo humano, anticuerpo con CDR injertada, y anticuerpo humanizado. En una realización, las porciones de unión a antígeno son seleccionadas del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados mediante un puente de disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un brazo

sencillo de un anticuerpo, un fragmento dAb, región determinante de complementariedad (CDR) asilada, un anticuerpo de cadena sencilla, y diacuerpos.

En otra realización, la proteína de unión de la invención posee al menos una propiedad deseada exhibida por el primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, o el segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo. Alternativamente, el primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo y el segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo poseen al menos una propiedad deseada exhibida por la Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual. En una realización, la propiedad deseada se selecciona de uno o más parámetros de anticuerpo. En otra realización, los parámetros de anticuerpo son seleccionados del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad al antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítopo, estabilidad, solubilidad, eficiencia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada en tejido, y unión a antígeno ortólogo. En una realización la proteína de unión es multivalente. En otra realización, la proteína de unión es multiespecífica. Las proteínas de unión multivalentes y o multiespecíficas aquí descritas tienen propiedades deseables particularmente desde un punto de vista terapéutico. Por ejemplo, la proteína de unión multivalente y o multiespecífica puede (1) ser internalizada (y/o catabolizada) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al cual se unen los anticuerpos; (2) ser un anticuerpo agonista; y/o (3) inducir la muerte celular y/o apóptosis de una célula que expresa un antígeno al cual el anticuerpo multivalente es capaz de unirse. El "anticuerpo base" que provee al menos una especificidad de unión a antígeno de las proteínas de unión multivalentes y o multiespecíficas puede ser uno que es internalizado (y/o catabolizado) por una célula que espresa un antígeno al cual se une el anticuerpo; y/o puede ser un anticuerpo agonista, inductor de muerte celular, y/o inductor de apoptosis, y la proteína de unión multivalente y o multiespecífica aquí descrita puede mostrar mejora(s) en una o más de estas propiedades. Más aún, el anticuerpo base puede carecer de de una cualquiera o más de estas propiedades, pero puede estar dotado con ellas cuando se construye como una proteína de unión multivalente aquí descrita.

En otra realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad de asociación (Kon) a uno o más objetivos seleccionados del grupo que consiste de: al menos aproximadamente $10^2M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5M^{-1}s^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6M^{-1}s^{-1}$, medida mediante resonancia de plasmón superficial. En una realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad de asociación (Kon) a uno o más objetivos entre $10^2M^{-1}s^{-1}$ y $10^3M^{-1}s^{-1}$; entre $10^3M^{-1}s^{-1}$ y $10^4M^{-1}s^{-1}$; entre $10^4M^{-1}s^{-1}$ y $10^5M^{-1}s^{-1}$; o entre $10^5M^{-1}s^{-1}$ y $10^6M^{-1}s^{-1}$, medida mediante resonancia de plasmón superficial.

En otra realización la proteína de unión tiene una constante de velocidad de disociación (Koff) para uno o más objetivos, seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; máximo aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; máximo aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; y máximo aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, medida mediante resonancia de plasmón superficial. En una realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad de disociación (Koff) a uno o más objetivos de $10^{-3}s^{-1}$ a $10^{-4}s^{-1}$; de $10^{-4}s^{-1}$ a $10^{-5}s^{-1}$; o de $10^{-5}s^{-1}$ a $10^{-6}s^{-1}$, medida mediante resonancia de plasmón superficial.

En otra realización, la proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) a uno o más objetivos, seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente 10^{-7} M; máximo aproximadamente 10^{-8} M; máximo aproximadamente 10^{-9} M; máximo aproximadamente 10^{-10} M; máximo aproximadamente 10^{-11} M; máximo aproximadamente 10^{-12} M; y máximo 10^{-13} M. En una realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de disociación (K_D) a sus objetivos de 10^{-7} M a 10^{-8} M; de 10^{-8} M a 10^{-9} M; de 10^{-9} M a 10^{-10} M; de 10^{-10} a 10^{-11} M; de 10^{-11} M a 10^{-12} M; o de 10^{-12} a M 10^{-13} M.

En otra realización, la proteína de unión aquí descrita es un conjugado que comprende además un agente seleccionado del grupo que consiste de una molécula de inmunoadhesión, un agente de representación gráfica, un agente terapéutico, y un agente citotóxico. En una realización, el agente de representación gráfica es seleccionado del grupo que consiste de un radiomarcador, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador

luminescente, un marcador bioluminescente, un marcador magnético, y biotina. En otra realización, el agente de representación gráfica es un radiomarcador seleccionado del grupo que consiste de: ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, y ^{153}Sm. En ya otra realización, el agente terapéutico o citotóxico es seleccionado del grupo que consiste de un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, toxina, y un agente apoptótico.

En otra realización, la proteína de unión aquí descrita es una proteína de unión cristalizada y existe como un cristal. En una realización, el cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico libre de vehículo. En ya otra realización, la proteína de unión cristalizada tiene una vida media in vivo mayor que la contraparte soluble de dicha proteína de unión. En aún otra realización, la proteína de unión cristalizada retiene la actividad biológica.

En otra realización, la proteína de unión aqupi descrita está glicosilada. Por ejemplo, la glicosilación es un patrón de glicosilación humano.

Un aspecto de la invención se relaciona con un ácido nucleico aislado que codifica una cualquiera de las proteínas de unión aquí reveladas. Una realización adicional provee un vector que comprende el ácido nucleico aislado aquí revelado, en donde dicho vector es seleccionado del grupo que consiste de pcDNA; pTT (Durocher et al., Nucleic Acids Research 2002, Vol 30, No.2); pTT3 (pTT con sitio de clonación múltiple adicional; pEFBOS (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17); pBV; pJV; pcDNA3.1 TOPO, pEF6 TOPO y pBJ. En una realización, el vector es un vector revelado en la Solicitud de Patente US Serial No. 61/021,282.

En otro aspecto, una célula hospedera es transformada con el vector aquí revelado. En una realización, la célula hospedera es una célula procariótica. En otra realización, la célual hospedera es E.Coli. En una realización relacionada, la célula hospedera es una célula eucariótica. En otra realización, la célula eucariótica es seleccionada del grupo que consiste de

célula de protisto, célula animal, célula de planta y célula de hongo. En ya otra realización, la célula hospedera es una célula mamífera que incluye, pero no se limita a CHO, COS; NS0, SP2, PER.C6 o una célula de hongo tal como Saccharomyces cerevisiae; o una célula de insecto tal como Sf9.

En una realización, dos o más DVD-Igs, p.e., con diferentes especificidades, se producen en una sola célula hospedera recombinante. Por ejemplo, la expresión de una mezcla de anticuerpos ha sido llamada Oligoclonics™,(Merus B.V., The Netherlands) Patentes U.S. Nos. 7,262,028; 7,429,486.

Otro aspecto de la invención prove un método para producir una proteína de unión aquí revelada, que comprende cultivar una cualquiera de las células hospederas también aquí reveladas, en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir la proteína de unión. En una realización, 50%-75% de la proteína de unión producida por este método es una proteína de unión tetravalente específica dual. En una realización particular, 75%-90% de la proteína de unión producida por este método es una proteína de unión tetravalente específica dual. En una realización particular, 90%-95% de la proteína de unión producida es una proteína de unión tetravalente específica dual.

Una realización prove una composición para la liberación de una proteína de unión, en donde la composición comprende una formulación que a su vez comprende una proteína de unión cristalizada, como se reveló aquí, y un ingrediente, y al menos un vehículo polimérico. Por ejemplo, el vehículo polimérico es un polímero seleccionado de uno o más del grupo que consiste de: poli (ácido acrílico), poli (cianoacrilatos), poli (amino ácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (b-hidroxibutriato), poli (caprolactona), poli (dioxanona); poli (etilen glicol), poli ((hidroxipropil) metacrilamida, poli [(organo)fosfazeno], poli (orto ésteres), poli (vinil alcohol), poli (vinilpirrolidona), compolímeros de anhídrido maléico-alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados,

mezclas y copolímeros de los mismos. Por ejemplo, el ingrediente es seleccionado del grupo que consiste de albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil-β-ciclodextrina, metoxipolietilen glicol y polietileno glicol. Otra realización prove un método para el tratamiento de un mamífero que comprende el paso de administrar al mamífero una cantidad efectiva de la composición aquí revelada.

La invención también provee una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión, como se revela aquí y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno. Por ejemplo, el agente adicional es seleccionado del grupo que consiste de: un agente terapéutico, un agente de representación gráfica, un agente citotóxico, un inhibidor de angiogenesis (incluyendo, pero sin limitarse a un anticuerpo anti-VEGF o un VEGF-trap), un inhibidor de quinasa (incluyendo, pero sin limitarse a un inhibidor de KDR y TIE-2), un bloqueador de molécula de co-estimulación (incluyendo, pero sin limitarse a anti-B7.1, anti-B7.2, CTLA4-Ig, anti-CD20), un bloqueador de molécula de adhesión (incluyendo, pero sin limitarse a un anticuerpo anti-LFA-1, un ancitcuerpo anti-E/L selectina, un inhibidor de molécula pequeña), un anticuerpo anti-citoquina o fragmento funcional del mismo (incluyendo, pero sin limitarse a un anti-IL-18, un anti-TNF, y un anticuerpo anti-IL-6/receptor de citoquina), metotrexato, ciclosporina, rapamicina, FK506, un marcador detectable o reportero, un antagonista de TNF, un antireumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco anti-inflamatorio no esteroidal (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antisoriático, un corticosteriode, un esteroide anabólico, una eritropoietina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antisicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un esteriode beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

En otro aspecto, la invención prove un método para el tratamiento de un sujeto humano que sufre de un trastorno en el cual el objetivo, u objetivos, capaces de ser unidos por la proteína de unión aquí revelada es perjudicial,

que comprende administrar al sujeto humano una proteína de unión aquí revelada de forma que la actividad del objetivo, u objetivos en el sujeto humano es inhibida, y uno o más síntomas son aliviados o se logra el tratamiento. Por ejemplo, el trastorno se selecciona del grupo que comprende artritis, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis soriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, soriasis, dermatitis escleroderma, enfermedad de injerto versus hospedero, rechazo de trasplante de órgano, enfermedad immune aguda o crónica asociada con transplante de órgano, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasíticas, síndrome de inmunodeficiencia adqurido, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, malignancias, falla cardíaca, infarto al miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular esporádica tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de distress respiratorio del adulto (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía soriática, artropatía colítica ulcerativa, sinovitis enteropática, artropatía asociada con clamidia, yersinia y salmonela, espondiloartopatía, enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis, alergia atópica, enfermedad ampollar autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica positiva de Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis mialgica/Enfermedad del Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de célula gigante, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, Síndrome de Enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida, Enfermedades Relacionadas con la Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogamaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, falla ovaria, falla ovaria prematura, enfermedad de pulmón fibrótico, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad de tejido

conectivo asociada con enfermedad pulmonary intersticial, enfermedad de tejido conectivo mezclado asociada con enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada con lupus sistémico, enfermedad pulmonar asociada con dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada con enfermedad de Sjögren, enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis, enfermedad pulmonary intersticial inducida por fármaco, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrante linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo-1 (autoinmune clásica o hepatitis lupoide), hepatitis autoimmune tipo-2 (hepatitis de anticuerpo anti-LKM), hipoglicemia mediada autoimmune, resistencia a la insulina tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad immune aguda asociada con transplante de órgano, enfermedad immune crónica asociada con transplante de órgano, osteoartrosis, colangitis esclerosante primaria, soriasis tipo 1, soriasis tipo 2, ileucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritidas, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de lyme, lupus eritomatoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad de esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad de tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nudosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjörgren's, enfermedad de Takayasu/arteritis, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroide autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune goitrous (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixoedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitiligo enfermedad del hígado aguda, enfermedades crónicas del hígado, cirrosis alcohólica, lesión de hígado inducida por alcohol, colestasis, enfermedad del hígado idiosincrática, hepatitis inducida por fármaco, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por estreptococos del grupo B (GBS), trastornos mentales (p.e., depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas por Tipo Th2 y Tipo Th1, dolor agudo y crónico (dformas diferentes de dolor), y cánceres tales como pulmonar, de seno, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y cáncer rectal y

malignancias hematopoyéticas (leucemia y linfoma), Abetalipoprotemia, Acrocianosis, procesos parasíticos o infecciosos agudos y crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacterian aguda o crónica, pancreatitis aguda, falla renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos aéreos, complejo de demencia por SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo de aloinjerto, deficiencia de alfa-l-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de célula del cuerno anterior, terapia anti cd3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arteriosclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación atrial (sostenida o paroxismal), palpitación atrial, bloqueo atrioventricular, linfoma de célula B, rechazo de injerto óseo, rechazo de trasplante de médula espinal (BMT), bloqueo de rama, linfoma de Burkitt, quemaduras, arritmias cardíacas, síndrome de aturdimiento cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación de bypass cardiopulmonar, rechazo de trasplante de cartílago, degeneraciones corticales cerebelares, trastornos cerebelares, taquicardia caótica o auricular multifocal, trastornos asociados con quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), intoxicación crónica con salicilato, carcinoma colorrectal, falla cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis de contacto, cor pulmonale, enfermedad de arteria coronaria, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis negativa de cultivo, fibrosis quística, trastornos asociados con terapia de citoquina, Demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre de dengue hemorrágico, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad ateriosclerótica diabética, enfermedad de cuerpo de Lewy Difuso, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos de los ganglios basales, síndrome de Down en la edad media, trastornos de movimiento inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC, sensibilidad a fármaco, eccema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglottitis, infección por virus de epstein-barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y cerebelares, linfohistocitosis hematofagocítica familiar, rechazo de implante de timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos arteriales periféricos funcionales, sepsis fúngica, gangrena con gas, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, sepsis gram negativa, sepsis gram

positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de célula vellosa, enfermedad de Hallerrorden-Spatz, tiroiditis de hashimoto, fiebre del heno, rechazo de transplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias de rama His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimiento hiperquinético, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis hipersensible, hipertensión, trastornos de movimiento hipoquinético, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpo, astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza a, exposición a radiación ionizante, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesión de isquemia-reperfusión, ataque isquémico, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo de transplante de riñón, legionela, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo de trasplante de hígado, linfedema, malaria, linfoma maligno, histocitosis malignan, melanoma maligno, meningitis, meningococcemia, enfermedades metabólicas/idiopáticas, dolor de cabeza de migraña, trastorno de multi sistema mitocondrial, enfermedad de tejido conectivo mezclado, gamopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, micobacteria aviar intracellular, micobacteria tuberculosis, síndrome mielodisplástico, infarto al miocardio, trastornos isquémicos miocárdicos, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonary crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofias musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma diferente de hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos arteriales oclusivos, terapia okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos de orquitis/reversión de vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo de trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignancia, rechazo de transplante paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad pericárdica, enfermedad aterosclerotica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía de neumocistis carinii, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gamopatía monoclonal, y síndrome de cambios en la piel), síndrome post perfusión, síndrome post bombeo, síndrome de cardiotomía post-MI, preeclampsia, Parálisis de supranúcleo Progresiva, hipertensión

pulmonar primaria, terapia de radiación, fenómeno y enfermedad de Raynaud, enfermedad de Raynoud, enfermedad de Refsum, taquicardia QRS regular y angosto, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, demencia Senil del tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, choque, anemia de célula falciforme, rechazo de aloinjerto de piel, síndrome de cambios en la piel, rechazo de transplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelares, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, sincope, sífilis del sistema cardiovascular, anafalaxis sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arthritis reumatoide juvenil de aparición sistémica, célula T o FAB ALL, Telangiectasia, tromboangitis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, transplantes, trauma/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad del tipo, hipersensibilidad del tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades cardíacas valvulares, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis vital/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico vital asociado, síndrome de Wernicke-Korsakoff, enfermedad de Wilson, rechazo de xeno injerto de cualquier órgano o tejido, síndromes coronarios agudos, polineuritis idiopática aguda, poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still del adulto, alopecia areata, anafilaxis, síndrome de anticerpo anti-fosfolípido, anemia aplástica, arteriosclerosis, eccema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoimmune asociado con infección por estreptococo, enteropatía autoinmune, pérdida de audición autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, falla ovaria prematura autoinmune, blefaritis, bronquiéctasis, penfigoide ampollar, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolípido catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, penfigoide cicatricial, síndrome aislado clínicamente (cis) con riesgo de esclerosis multiple, conjuntivitis, trastorno siquiátrico de aparición enla niñez, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, diabetes mellitus, hernia de disco, prolapso de disco, anemia hemolític inmune inducida por fármaco, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, episcleritis, eritema multiforme, eritema multiforme importante, penfigoide gestational, síndrome de Guillain-Barré (GBS), fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad de Parkinson idiopática, neumonía intersticial idiopática, alergia mediada por IgE,

anemia hemolítica inmune, miositis de cuerpote inclusión, enfermedad inflamatoria ocular infecciosa, enfermedad desmilelinizante inflamatoria, enfermedad cardáca inflamatoria, enfermedad renal inflamatoria, IPF/UIP, iritis, queratitis, keratojuntivitis seca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, histiocitosis de célula de Langerhan, livedo reticularis, degeneración macular, poliangitis microscópica, morbus bechterev, trastornos de neurona motora, penfigoide de membrane mucosa, falla de órganos multiples, miastenia grave, síndrome mielodisplásico, miocarditis, trastornos de raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis diferente de A y B, neuritis óptica, osteolisis, cáncer de ovario, JRA pauciarticular, enfermedad oclusiva de arteria perifpérica (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD), arteri periférica, enfermedad (PAD), flebitis, poliarteritis nudosa (o periarteritis nudosa), policondritis, polimialgia reumática, poliosis, JRA poliarticular, síndrome de deficiencia poliendocrina, polimiositis, polimialgia reumática (PMR), síndrome post bombeo, Parkinsonismo primario, cáncer de próstata y rectal (leucmia y linfoma), prostatitis, aplasia de glóbulo rojo puro, insuficiencia adrenal primaria, neuromielitis óptica recurrente, restenosis, enfermedad cardíaca reumática, sapho (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostosis, y osteítis), escleroderma, amiloidosis secundaria, choque de pulmón, escleritis, ciática, insuficiencia adrenal secundaria, enfermedad de tejido conectivo asociada con silicona, dermatosis de sneddon-wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrólisis epidérmica tóxica, mielitis transversa, TRAPS (receptor de factor de necrosis de tumor, reacción alérgica tipo 1, diabetes tipo II, urticaria, neumonía intersticial usual (UIP), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH), degeneración macular húmeda, curación de heridas, artropatía asociada con yersinia y salmonela.

En una realización, las enfermedades que se pueden tratar o diagnosticar con las composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, cánceres primarios y metastásicos, incluyendo carcinomas de seno, colon, recto, pulmón, orofaríngeo, hipofaríngeo, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula y ductos biliares, intestino delgado, tracto urinario (incluyendo riñón, vejiga y urotelio), tracto genital femenino (incluyendo cervix, útero, y ovarios así como coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestational), tracto

genital masculino (incluyendo próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de célula germinal), glándulas endocrinas (incluyendo las glándulas tiroides, adrenal, y pituitaria), y piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluyendo aquellos que aparecen del hueso y tejidos blandos así como sarcoma de Kaposi), tumores del cerebro, nervios, ojos, y meninges (incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, Schwannomas, y meningiomas), tumores sólidos que surgen de malignancias hematopoyéticas tales como leucemias, y linfomas (linfomas de Hodgkin's y diferentes a Hodgkin).

En una realización, los anticuerpos de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos, se usan para tratar el cáncer o en la prevención de metástasis de los tumores aquí descritos, ya sea cuando se usan solos o en combinación con radioterapia y/o otros agentes quimioterapéuticos.

En otro aspecto la invención provee un método para el tratamiento de un paciente que sufre de un trastorno que comprende el paso de administrar una cualquiera de las proteínas de unión aquí reveladas antes, en forma concurrente, o después de la administración de un segundo agente, como rediscute aquí. En una realización particular el segundo agente se selecciona del grupo que consiste de budenosida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor IL-1, mAbs anti-IL-1β, anti-IL-6 o mAbs del receptor IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos de piridinil-imidazol, anticuerpos o agonistas de TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD-19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, AINEs, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adensosina, agentes agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de MAP quinasa, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β, inhibidores de la enzima convertidora de TNFα, inhibidores de la señalización de célula T, inhibidores de metaloproteinasa,

sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquina solubles, receptor de TNF p55 soluble, receptor de TNF p75 soluble, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citoquinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ.

En una realización particular, las composiciones farmacéuticas aquí revelada son administradas al paciente mediante al menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitalmente, intracelial, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácixo, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, y transdérmico.

Un aspecto de la invención prove al menos un anticuerpo anti-idiotipo a al menos una proteína de unión de la presente invención. El anticuerpo anti-idiotipo incluye cualquier proteína o peptide que contiene molécula que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina tal como, pero sin limitarse a, al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región de marco, o cualquier porción de la misma, que puede ser incorporada en una proteína de unión de la presente invención.

Breve Descripción de los dibujos

La Figura 1A es una representación esquemática de constructos (DVD)-Ig de Dominio Variable Dual y muestra la estrategia para la generación de un DVD-Ig a partir de dos anticuerpos base

La Figura 1B es una representación esquemática de constructos DVD1-Ig, DVD2-Ig, y dos anticuerpos mono-específicos quiméricos de los cones de hibridoma 2D13.E3 (anti-IL-1α) y 13F5.G5 (anti-IL-1β).

Descripción Detallada de la Invención

Esta invención se relaciona con proteínas de unión multivalentes y/o multiespecíficas capaces de unirse a dos o más antígenos. Específicamente, la invención se relaciona con inmunoglobulinas de dominio variable dual (DVD-Ig), y composiciones farmacéuticas de las mismas, así como ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante y células hospederas para preparar tales DVD-Igs. Los métodos para usar las DVD-Igs de la invención para detectar antígenos específicos, ya sea in vitro o in vivo también están abarcados por la invención.

A menos que aquí se defina de otra forma, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tendrán los significados comúnmente entendidos por los expertos en la técnica. El significado y alcance de los términos debe ser claro, sin embargo, en caso de ambiguedad latente, las definiciones aquí proporcionadas tendrán precedente sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Adicionalmente, a menos que el contexto lo requiera de otra forma, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. En esta solicitud, el uo de "or" significa "y/o" a menos que se declare de otra forma. Adicionalmente, el uso del término "incluyendo", así como otras forms, tales como "incluye" e "incluído", no es limitante. Adems, los términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se declare de otra forma.

En general, las nomenclaturas usadas en conexión con, y las técnicas de cultivo cellular y de tejido, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y proteína y química de ácido nucleico e hibridación aquí descritas son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención son llevados a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en varias referencias generales y más específicas que son citadas y discutidas a lo largo de la presente descripción, a menos que se indique de otra forma. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se

realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe aquí. Las nomenclaturas usadas en conexión con, y los procedimientos de laboratorio y las técnicas de química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica descritas aquí son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Las técnicas estándar se usan para sínteis química, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y liberación, y tratamiento de pacientes.

Que la presente invención puede ser entendida más fácilmente, los términos seleccionados se definen a continuación.

El término "polipéptido" como se usa aquí, se refiere a cualquier cadena polimérica de amino ácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan intercambiablemente con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de amino ácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteína y análogos de polipéptido de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico. El uso de "polipéptido" aquí pretende abarcar polipéptido y fragmentos y variantes (incluyendo fragmentos de variantes) de los mismos, a menos que se contradiga por el contexto. Para un polipéptido antigénico, un fragmento del polipéptido contiene opcionalmente al menos un epítopo contiguo o no lineal de polipéptido. Los límites precisos del al menos un fragmento de eopitopo pueden ser confirmados usando habilidad común en la técnica. El fragmento comprende al menos aproximadamente 5 amino ácidos contiguos, tales como al menos aproximadamente 10 amino ácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 amino ácidos contiguos, o al menos aproximadamente 20 amino ácidos contiguos. Un variante de polipéptido es como se describe aquí.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación no está naturalmente asociado con los components que lo acompañan en su estado nativo; es sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; está expresado por una célula de una especie diferente; o no se encuentra en la naturaleza. Así, un polipéptido que es sintetizado químicamente o sinterizado

en un sistema cellular dfferente de la celula de la cual se origina naturalmente, estará "aislado" de sus componentes asociados naturalmente. Una proteína puede también hacerse sustancialmente libre de components asociados naturalmente mediante aislamiento, usando técnicas de purificación de proteína bien conocidas en la técnica.

El término "recuperar" como se usa aquí, se refiere al proceso de hacer una especie química, tal como un polipéptido, sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, p.e., usando técnicas de purificación de proteína bien conocidas en la técnica.

"Actividad biológica" como se usa aqui, se refiere a una cualquiera o más propiedades biológicas inherentes de una molécula (ya sea presente naturalmente como se en cuentra in vivo, o proporcionada o habilitada por medios recombinantes). Las propiedades biológicas incluyen, pero no se limitan a unión del receptor; inducción de proliferación celular, inhibición del crecimiento celular, inducciones de otras citoquinas, inducción de apóptosis, y actividad enzimática. La actividad biológica también incluye actividad de una molécula de Ig.

Los términos "unión específica" o "específicamente unión", como se usan aquí, con referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (p.e., un determinante antigénico o epítopo) sobre la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de generalmente proteínas. Si un anticuerpo es específico para el epítopo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítopo A (o libre, no marcada A), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término "antcuerpo", como se usa aquí, se refiere ampliamente a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) comprendida de cuatro cadenas de

polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante, o derivación de la misma, que retiene las características de unión a epítopo esenciales de una molécula de Ig. Tales formatos de anticuerpo mutante, variante, o derivado son conocidos en la técnica. Cuyas realizaciones no limitantes se discuten a continuación.

En un anticuerpo de longitude total, cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La region constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. cada cadena ligera está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La region constante de cadena ligera está comprendida de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden estar adicionalmente divididas en regions de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones de marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres three CDRs y cuatro FRs, dispuestas de amino-terminales a carboxi-terminales en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (p.e., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA y IgY), clase (p.e., IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase.

El término "región Fc" se usa para definer la region C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que puede ser generada mediante digestión de papaína de un anticuerpo intacto. La region Fc puede ser una region Fc de secuencia native o una región Fc variante. La region Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y comprende opcionalmente un dominio CH4. Los reemplazos de residuos de amino ácido en la porción Fc para alterar la función efectora de anticuerpo son conocidos en la técnica (Winter, et al. Patentes US Nos 5,648,260 y 5,624,821). La porción Fc de un anticuerpo media varias funciones efectoras importantes p.e., inducción de citoquina, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y tasa de vida media/depuración de anticuerpo y complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para el anticuerpo terapeutico pero en otros casos podrían ser innecesarias o incluso nocivas,

dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos IgG humanos, particularmente IgG1 e IgG3, median ADCC y CDC por medio de la unión a FcγRs y complemento C1q, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son los components críticos que determinan la vida media circulante de los anticuerpos. En aún otra realización, al menos un residuo de amino ácido es reemplazado en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de forma que las funciones efectoras del anticuerpo son alteradas. La dimerizacipon de dos cadenas pesadas idpenticas de una inmunoglobulina es mediada por la dimerización de dominios CH3 y es estabilizada por los enlaces de disulfuro dentro de la región bisagra (Huber et al. Nature; 264: 415-20; Thies et al 1999 J Mol Biol; 293: 67-79.). La utación de los residuos de cisteína dentro de la region bisagra para evitar enlaces de disulfuro de cadena pesada-cadena pesada desestabilizará la dimerización de los dominios CH3. Los residuos respondables de la dimerización de CH3 han sido identificados (Dall'Acqua 1998 Biochemistry 37: 9266-73.). Por lo tanto, es posible generar un Ig medio monovalente. De manera interesante, estas moléculas de Ig medio monovalentes se han encontrado en la naturaleza para las subclases IgG e IgA (Seligman 1978 Ann Immunol 129: 855-70;Biewenga et al 1983 Clin Exp Immunol 51: 395-400). Se ha determinado que la estequiometría de FcRn: region Fc de Ig es 2:1 (West et al .2000 Biochemistry 39: 9698-708), y media Fc es suficiente para mediar la unión de FcRn (Kim et al 1994 Eur J Immunol; 24: 542-548.). Las mutaciones para alterar la dimerización del dominio CH3 pueden no tener un efecto adverso mayor en su unión a FcRn porque los residuos importantes para la dimerización de CH3 están localizados en la interfaz interna de la estructura de lámina b de CH3, mientras que la región responsable de la unión a FcRn está localizada en la interfaz exterior de los dominios CH2-CH3. Sin embargo, la molécula de Ig media puede tener cierta ventaja en la penetración de tejido debido a su menor tamaño que la de un anticuerpo regular. En una realización, al menos un residuo de amino ácido es reemplazado en la región constante de la proteína de unión de la invención, por ejemplo la región Fc, de forma que la dimerización de las cadenas pesadas es alterada, produciendo moléculas de DVD Ig medias. La actividad anti-inflamatoria de IgG es completamente dependiente de la sialilación del glicano enlazado a N del fragmento Fc de IgG. Se han determinado los requerimientos de glicano precisos para la actividad anti-inflamatoria, de forma que se puede crear un fragmento Fc de IgG1 apropiado, generando de esta forma un Fc de IgG1 sialilado totalmente

recombinante con potencia mejorada en gran medida (Anthony, R.M., et al. (2008) Science 320:373-376).

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se usa aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud total. Tales realizaciones de anticuerpo también pueden ser formatos biespecíficos, específicos duales o multi-específicos; específicamente la unión a dos o más antígenos diferentes. Ejemplos de los fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546, Winter et al., Publicación PCT WO 90/05144 A1 incorporada aquí mediante referencia), que comprende un dominio variable sencillo; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden ser unidos, usando métodos recombinants, mediante un enlazante sintético que les permite ser preparados como una sola cadena de proteína en la cual las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); ver p.e., Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla estén abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se abarcan otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalente, biespecíficos en los cuales los dominios VH y VL están expresados en una cadena de polipéptido sencilla, pero usando un enlazante que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (ver p.e., Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Tales porciones de unión a anticuerpo son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5). Adicionalmente, los anticuerpos de cadena sencilla también incluyen "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos Fv en tandem (VH-CH1-VH-CH1) los cuales, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995); y Patente US No. 5,641,870).

El término "proteína de unión multivalente" se usa a lo largo de esta descripción para denorar una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. En una realización, la proteína de unión multivalente es diseñada para tener los tres o más sitios de unión a antígeno, y generalmente no es un anticuerpo que se encuentra naturalmente. El término "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a dos o más objetivos relacionados o no relacionados. Las proteínas de unión de dominio variable dual (DVD) de la invención comprenden dos o más sitios de unión a antígeno y son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes. Los DVDs pueden ser monoespecíficos, p.e., capaces de unirse a un antígeno o multiespecíficos, p.e. capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas de unión DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena ligera son referidos como DVD-Ig. Cada mitad de un DVD-Ig comprende un polipéptido DVD de cadena pesada, y un polipéptido DVd de cadena ligera, y dos sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera con un total de 6 CDRs involucradas en la unión a antígeno por sitio de unión a antígeno

El término "anticuerpo biespecífico", como se usa aquí, se refiere a anticuerpos de longitud total que son generados mdiante tecnología de cuadrota (ver Milstein C. y A.C. Cuello, Nature, 1983. 305(5934): p. 537-40), mediante conjugación química de dos anticuerpos monoclonales diferentes (ver Staerz, U.D., et al., Nature, 1985. 314(6012): p. 628-31), o mediante bot-on-en-ojal o enfoques similares que introducen mutaciones en la región Fc (ver Holliger, P., T. Prospero, y G. Winter, Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(14):

p. 6444-8.18), produciendo múltiples especies diferentes de inmunoglobulina de las cuales solamente una es el anticuerpo biespecífico funcional. Mediante función molecular, un anticuerpo biespecífico se une a un antígeno (o epítopo) enuno de sus dos brazos de unión (un par de HC/LC), y se une a un antígeno diferente (o epítopo) en su segundo brazo (un par diferente de HC/LC). Mediante esta definición, un anticuerpo biespecífico tiene dos brazos de unión a antígeno distintos (tanto en especificidad como en secuencias de CDR), y es monovalente para cada antígeno al cual se une.

El término "anticuerpo específico dual", como se usa aquí, se refiere a anticuerpos de longitud total que se pueden unir a dos antígenos diferentes (o epítopos) en cada uno de sus dos brazoa de unión (un par de HC/LC) (ver publicación PCT WO 02/02773). En consecuencia, una proteína de unión específica dual tiene dos brazos de unión a antígeno idénticos, con especificidad idéntica y secuencias de CDR idpenticas, y es bivalente para cada antígeno al cual se une.

Un "sitio de unión a antpigeno funcional" de una proteína de unión es uno que es capaz de unirse a un antígeno objetivo. La afinidad de unión a antígeno del sitio de unión a antígeno no es necesariamente tan fuerte como el anticuerpo base del cual se deriva el sitio de unión a antígeno, pero la capacidad de unirse al antígeno debe ser mesurable usando uno cualquiera de una variedad de métodos conocidos para evaluar la unión de anticuerpo a un antígeno. Más aún, la afinidad de unión a antígeno de cada uno de los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo multivalente presente no necesita ser cuantitativamente iguales.

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células, que actúan en otra población de células como mediadores intracelulares. Ejemplos de tales citowuinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas de polipéptido tradicionales. Incluidas dentro de las citoquinas están la hormona del crecimiento tal como la hormona de crecimiento humano, la hormona de crecimiento humano N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteína tales como

hormona estimuladora de folículo (FSH), hormona estimuladora de tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblasto; prolactina; lactógeno placentario; factor alta y beta de necrosis de tumor; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado con gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento de nercio tales como NGF-alfa; factor de crecimiento de plaqueta; factor de crecimiento placentario, factores de crecimiento transformantes (TGFs) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento 1 y 11 del tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferon-alfa, -beta y -gama factores de estimulación de colonia (CSFs) tales como macrofago-CSF (M-CSF); macrófago granulocito-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-33; un factor de necrosis de tumor tales como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores de polipéptido incluyendo LIF y kit ligando (KL). Como se usa aquí, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

El término "enlazante" se usa para denotar polipéptidos que comprenden dos o más residuos de amino ácido unidos por enlaces de péptido y se usan para unir una o más porciones de unión a antígeno. Tales polipéptidos enlazantes son bien conocidos en la técnica (ver p.e., Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Enlazantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 4); SAKTTP (SEQ ID NO: 5); RADAAP (SEQ ID NO: 6); RADAAPTVS (SEQ ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEQ ID NO: 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 10); ADAAP (SEQ ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 12); TVAAP (SEQ ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 14); QPKAAP (SEQ ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 16); AKTTPP (SEQ ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 18); AKTTAP (SEQ ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 20); ASTKGP (SEQ ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID

NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 26).

Un "dominio constante de inmunoglobulina" se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Las secuencias de amino ácido de dominio constante de cadena pesada y cadena ligera de IgG humano son conocidas enla técnica.

El término "anticuerpo monoclonal " o "mAb" como se usa aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, p.e., los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se encuentran naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un solo antígeno. Adicionalmente, en contraste con las preparaciones de anticuerpo policlonal que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada mAb está dirigido contra un solo determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular.

El término "anticuerpo humano", como se usa aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variable y constante derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de amino ácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p.e., mutaciones introducidas aleatoriamente o mutagénesis específica de sitio in vitro o mediante mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDRs y en particular CDR3. Ssin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa aquí, no pretende incluir anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie mamífera, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias de marco humanas.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que son preparados, creados o aislados por medios recombinants, tales como anticuerpos expresados usando

un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedera (descrita mejor en la sección II C, más adelante), los anticuerpos aislados de una librería de anticuerpo humana combinacional, recombinante (Hoogenboom H.R. (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E. (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J.V., y Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), anticuerpos aislado de un animal (p.e., un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (ver, Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A. y Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al. (2000) Immunology Today 21:364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucre corte y empalme de secuencias de gen de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regions variables y constants derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes están sometidos a mitagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática in vivo) y por ende, las secuencias de amino ácido de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque son derivadas de y relacionadas con secuencias de VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpo humano in vivo.

Un anticerpo "madurado de afinidad" es un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDRs del mismo, que produce un mejoramiento en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, comparado con un anticuerpo base que no posee aquellas alteraciones. Anticuerpos madurados de afinidas ejemplares tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados de afinidad son producidos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. BidlTechnology 10:779-783 (1992) describe la maduración de afinidad mediante mezclado del dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos de marco se describe en: Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147- 155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); Hawkins et al, J.

Mol. BioL 226:889-896 (1992) y la mutación selectiva en posiciones de mutagénesis selectivas, contacto o posiciones de hipermutación con una actividad que mejora el residuo de amino ácido como se describe en la Patente US US 6914128B1.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie, y secuencias de región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas unidas a regiones constantes humanas.

El término "anticuerpo de CDR injertada" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie, pero en el cual las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL están reemplazadas con secuencias de CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas en las cuales una o más de las CDRs murinas (p.e., CDR3) ha sido reemplazada con secuencias de CDR humanas.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie no humana (p.e., un ratón) pero en las cuales al menos una porción de la secuencia de VH y/o VL ha sido alterada para ser más del "tipo humano", p.e., más similar a las secuencias variables de línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo de CDR injertada, en la cual las secuencias de CDR humanas son introducidas en las secuencias de VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias de CDR no humanas correspondientes. Además, un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o un variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región de marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de amino ácido de un anticuerpo humano y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de amino ácido de un anticuerpo no humano. Como se usa aquí, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de amino ácido al menos

80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de amino ácido de un a CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todo de al menos una, y típicamente dos dominios variables (Fab, Fab', F(ab')2, FabC, Fv) en el cual todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (p.e., anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones de marco son aquellas de una secuencia de concenso de inmunoglobulina humana. En una realización, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera, así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene solamente una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene solamente una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado contiene solamente un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

Los términos "numeración Kabat", "definiciones Kaba" y "marcación Kabat" se usan aquí intercambiablemente. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, se refiere a un sistema de numeración de residuos de amino ácido que son más variables (p.e. hipervariables) que otros residuos de amino ácido en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unióna antígeno del mismo (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad, Sci. 190:382-391 y, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health y Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable varía de las posiciones de amino ácido 31 a 35 para CDR1, posiciones de amino ácido 50 a 65 para CDR2, y posiciones de amino ácido 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable varía de las posiciones de amino ácido 24 a 34 para CDR1, posiciones de amino ácido 50 a 56 para CDR2, y posiciones de amino ácido 89 a 97 para CDR3.

Como se usa aquí, el término "CDR" se refiere a regiones determinantes de complementariedad dentro de secuencias variables de un anticuerpo. Existen tres CDRs en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, las cuales se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR" como se usa aquí, se refiere a un grupo de las tres CDRs que se encuentra en una sola región variable capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDRs han sido definidos de manera diferente de acuerdo con diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) provee no solo un sistema de numeración de residuos no ambiguo aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de residuo precisos que definen las tres CDRs. Estas CDRs pueden ser referidas como CDRs Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)) encontraron que ciertas sub-porciones dentro de las CDRs Kabat adoptan conformaciones de estructura de péptido casi idénticas, a pesar de tener gran diversidad a nivel de secuencia de amino ácido. Estas sub-porciones fueron designadas como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde "L" y "H" designan las refiones de cadena ligera y pesada, respectivamente. Estas regiones pueden ser referidas como CDRs Chothia, que tienen límites que se superponen con las CDRs Kabat. Otros límites que definen CDRs que se superponen con las CDRs Kabat han sido descritos por Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) y MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Aún otras definiciones de límite de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas presentes, pero sin embargo, se superponen con las CDRs Kabat, aunque pueden ser acortados o alargados en virtud de la predicción o hallazgos experimentales que regiduos o grupos de residuos particulares o incluso las CDRs enteras no afectan significativamente la unión a antígeno. Los métodos usados aquí pueden utilizar las CDRs definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque ciertas realizaciones usan las CDRs definidas por Kabat o Chothia.

Como se usa aquí, el término "marco" o "secuencia de marco" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDRs. Cebido a que la definición exacta de una secuencia de CDR puede ser determinada

mediante diferentes sistemas, el significado de una secuencia de marco está sometido a las diferentes interpretaciones correspondientes. Las seis CDRs (CDR-L1, -L2, y -L3 de cadena ligera y CDR-H1, -H2, y -H3 de cadena pesada) también se dividen en las regiones de marco en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) sobre cada cadena, en las cuales CDR1 está posicionada entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de marco, referida por otras, representa las FR's combinadas dentro de la región variable de una cadena de inmunoglobulina sencilla que se encuentra naturalmente. Como se usa aquí, una FR representa una de las cuatro sub-regiones, y las FRs representan dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región de marco.

Como se usa aquí, el término "gen de anticuerpo de línea germinal" o "fragmento de gen" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han sido sometidas al proceso de maduración que conduce al reárreglo genético y mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular. (Ver, p.e., Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por varias realizaciones de la presente invención provienen del reconocimiento que los genes de anticuerpo de línea germinal son más probables que los genes de anticuerpo maduros en conservar las estructuras de secuencia de amino ácido esenciales características de individuos en las especies, por ende, menos probables a ser reconocidas como de una fuente foránea cuando se usan terapéuticamente en esas especies.

Como se usa aquí, el término "neutralizante" se refiere a contrarrestar la actividad biológica de un antígeno cuando una proteína de unión se une específicamente al antígeno. En una realización, la proteína de unión neutralizante se une a la citoquina y reduce su actividasd biológica en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más.

El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad de unión y afinidad de un DVD-Ig para dos o más antígenos.

El término "epítopo" incluye cualquier determinante de polipéptido capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de célula T. En ciertas realizaciones, los determinantes de epítopo incluyen agrupacioes de superficie químicamente activas de moléculas tales como amino ácidos, cadenas laterales de azucar, fosforilo, o sulfonilo, y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítopo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce su antígeno objetivo en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Se dice que los anticuerpos "se unen al mismo epítopo" si los anticuerpos compiten cruzadamente (uno evita la unión o modula el efecto del otro). Adicionalmente, las definiciones estructurales de epítopos (superposición, similar, idéntico) son informativas, pero las definiciones funcionales son a menudo más relevantes porque abarcan parámetros estructurales (unión) y funcionales (modulación, competición).

El término "resonancia de plasmón superficial", como se usa aquí, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante detección de alteraciones de las concentraciones de proteína dentro de una matriz biosensora, por ejemplo usando el sistema BIAcore® (BIAcore International AB, una compañía GE Healthcare, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, ver Jönsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; y Johnnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

El término "K_{on}", como se usa aquí, pretende referirse a la constante de velocidad de asociación para asociación de una proteína de unión (p.e., un anticuerpo) al antígeno para formar el, p.e., complejo anticuerpo/antígeno como es conocido en la técnica. La "K_{on}" también es conocida por los términos "constante de velocidad de asociación", o "k_a", usadas aquí intercambiablemente. Este valor indica que la velocidad de unión de un anticuerpo a su antígeno objetivo o la velocidad de formación del complejo entre un anticuerpo y antígeno también se muestra mediante la siguiente ecuación:

Anticuerpo ("Ab") + Antígeno ("Ag")→Ab-Ag.

El término "K_{off}", como se usa aquí, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación para disociación, o "constante de velocidad de disociación", de una proteína de unión (p.e., un anticuerpo) del, p.e., complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica. Este valor indica la velocidad de disociación de un anticuerpo de su antígeno objetivo o separación del complejo Ab-Ag en el tiempo en el anticuerpo libre y antígeno como se muestra en la siguiente ecuación:

Ab + Ag←Ab-Ag.

El término "K_D" como se usa aquí, pretende referirse a la "constante de disociación en equilibrio", y se refiere al valor obtenido en una medida de titulación en equilibrio, o dividiendo la constante de velocidad de disociación (k_{off}) entre la constante de velocidad de asociación (k_{on}). La constante de velocidad de asociación, la constante de velocidad de disociación y la constante de disociaciónen equilibrio se usan para representar la afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno. Los métodos para determinar las constantes de velocidad de asociación y disociación son bien conocidas en la técnica. El uso de técnicas basadas en fluorescencia ofrece alta sensibilidad y la capacidad de examinar muestras en amortiguadores fisiológicos en equilibrio. Se pueden usar otros enfoques experimentales e instrumentos tales como ensayo BIAcore® (análisis de interacción biomolecular) (p.e., instrumento disponible en BIAcore International AB, una compañía GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Adicionalmente, también se puede usar un ensayo KinExA® (Kinetic Exclusion Assay), disponible en Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

"Marcador" y "mercador detectable" significa una mitad unida a un compañero de unión específico, tal como un anticuerpo o un analito, p.e., para hacer que la reacción entre los miembros de un par de unión específico, tal como un anticuerpo y un analito, detectable, y el compañero de unión específico, p.e., anticuerpo o analito, de forma que el marcado es referido como "marcado detectablemente". Así, el término "proteína de unión marcada" como se usa aquí, se refiere a una proteína con un marcador incorporado que provee la identificación de la proteína de unión. En una realización, el marcados es un marcador detectable que puede producir una señal que es

detectable por medios visuales o instrumentales, p.e., incorporación de un amino ácido radiomarcado o unión a un polipéptido de mitades de biotinilo que pueden ser detectadas por avidina marcada (p.e., estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada por métodos ópticos o colorimétricos). Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p.e., ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, o ^{153}Sm); cromógenos, marcadores fluorescentes (p.e., FITC, rodamina, lantanida fosforo), marcadores enzimáticos (p.e., peroxidada de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminescentes; grupos biotinilo; epítopos de polipéptido predeterminados reconocidos por un reportero secundario (p.e., secuencias de par cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas de epítopo); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio. Ejemplos representativos de marcadores empleados comúnmente para inmunoensayos incluyen mitades que producen luz, p.e., compuestos de acridinio, y mitades que producen fluorescencia, p.e., fluoresceína. Otros marcadores se describen en la presente. En este aspecto, la mitad en sí puede no estar marcada detectablement, pero pueden volverse detectables a la reacción con aún otra mitad. El uso de "marcado detectablemente" pretende abarcar el último tipo de marcado detectable.

El término "conjugado" se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, enlazado químicamente a una segunda mitad química, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se usa aquí para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos. En una realización, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, toxina de pertusis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colcicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracin diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Cuando se emplean en el contexto de un inmunoensayo, el anticuerpo conjugado puede ser un anticuerpo marcado detectablemente usado como el anticuerpo de detección.

Los términos "cristal" y "cristalizado" como se usa aquí, se refieren a una proteína de unión (p.e., un anticuerpo), o porción de unión a antígeno del mismo, que existe en la forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado líquido cristalino. Los cristales están compuestos de arreglos regulares, en repetición, tridimensionales de átomos, iones, moléculas (p.e., proteínas tales como anticuerpos), o ensambles moleculares (p.e.,complejos antígeno/anticuerpo). Estos arreglos tridimensionales están dispuestos de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que son bien entendidas en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción que se repite en un cristal se llama la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en un arreglo que se conforma en una simetría cristalográfica bien definida provee la "celda unitaria" del cristal. La repetición de la celda unitaria por traducciones regulares en todas las tres dimensiones proporciona el cristal. Ver Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)."

El término "polinucleotido" significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN mono y dicatenarias.

El término "polinucléotido aislado" singifica un polinucleótido (p.e., de origen genómico, ADNc, o sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" no está asociado con toda o una porción de un polinucleótido con el cual el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está operablemente unido a un polinucleótido al que no está enlazado en la naturaleza; o no se encuentra en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "vector", pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha estado enlazada. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a una asa de ADN dicatenario circular

en el cual se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde segmentos de ADN adicionales pueden ser ligados en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedera en la cual son introducidos (p.e., vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores mamíferos episomales). Otros vectores (p.e., vectores mamíferons no episomales) pueden estar integrados en el genoma de una célula hospedera a la introducción en la célula hospedera, y de esta forma son replicados junto con el genoma hospedero. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están están operativamente enlazados. Tales vectores son referidos aquí como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en la forma de plásmidos. En la presente descripción, "plásmido" y "vector" se pueden usar intercambiablemente porque el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p.e., retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno asociados), que sirven funciones equivalentes.

El término "enlazado operablemente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera dispuesta. Una secuencia de control "enlazada operablemente" a una secuencia de codificación está ligada de forma que la expresión de la secuencia de codificación se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "enlazadas operablemente" incluyen tanto secuencias de control de expresión que están contiguas con el gen de interés como secuencias de control de expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de expresión" como se usa aquí se refiere a secuencias de polinucleótido que son necesarias para efectuar la expresión y procesamiento de las secuencias de codificación a las cuales están ligadas. Las secuencias de control de expresión incluyen iniciación, terminación de transcripción apropiadas, secuencias promotoras y potenciadoras; señales de procesamiento de ARN eficientes tales como señales de corte y empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias

que mejoran la eficiencia de traducción (p.e., secuencia de consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de proteína; y cuando se desea, secuencias que potencian la secreción de proteína. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedero; en procariotes, tales secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión ribosómico, y secuencia de terminación de transcripción; en eucariotes, generalmente tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de compañero de fusión.

"Transformación", se refiere a cualquier proceso mediante el cual el ADN exógeno entra a una célula hospedera. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales usando varios métodos bien conocidos en la técnica. La transformación se puede basar en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico foráneas en una célula hospedera procariótica o eucariótica. El método se selecciona con base en la célula hospedera que está siendo transformada y puede incluir, pero no se limita a, infección viral, electroporación, lipofección, y bombardeo de partícula. Tales células "transformadas" incluyen células establemente transformadas en las cuales el ADN insertado es capaz de replicación ya sea como un plásmido de relicación autónomo o como parte del cromosoma hospedero. También incluyen células que se expresan transitoriamente el ADN o ARN insertado por perídos de tiempo limitados.

El término "célula hospedera recombinante" (o simplemente "célula hospedera"), pretende referirse a una célula en la cual el ADN exógeno ha sido introducido. Se deberá entender que tales términos pretenden referirse no solamente a la célula sujeto particular, sino a la progenie de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en las generaciones posteriores debido a cualquier mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula base, pero está aún incluida en el alcance del término "célula hospedera" como se usa aquí. En una realización, las células hospederas incluyen células procarióticas y eucarióticas seleccionadas de

cualquiera de los Reinos de la vida. En otra realización, las células eucarióticas incluyen células de protisto, fúngicas, de planta y animal. En otra realización, las células hospederas incluyen, pero no se limitan a la línea celular procariótica E.Coli; líneas celulares mamíferas CHO, HEK 293, COS, NS0, SP2 y PER.C6; la línea celular de insecto Sf9; y la célula fúngica Saccharomyces cerevisiae.

Se pueden usar técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótido, y cultivo y transformación de tejido (p.e., electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica, o como se describe aquí. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden ser generalmente realizados de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas sin citadas y discutidas a lo largo de la presente descripción. Ver p.e., Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que está aquí incorporada mediante referencia para cualquier propósito.

"Organismo transgénico", como se conoce en la técnica, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgen, en donde el transgen introducido en el organismo (o un ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no está naturalmente expresado enel organismo. Un "transgen" es un constructo de ADN, que está establemente y operablemente integrado en el genoma de una célula de la cual se desarrolla el organismo transgénico, dirigiendo la expresión de un producto de gen codificado en uno o má tipos de células o tejidos del organismo transgénico.

El término "regular" y "modular" se usan intercambiablemente, y, como se usan aquí, se refieren a un cambio o una alteración de la actividad de una molécula de interés (p.e., la actividad biológica de una citoquina). La modulación puede ser un aumento o un descenso de la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula de interés. Las actividades y funciones ejemplares de una molécula incluyen, pero no se limitan a, característica de

unión, actividad enzimática, activación del receptor celular, y transducción de señal.

Correspondientemente, el término "modulador" es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (p.e., la actividad biológica de una citoquina). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o descenso de la magnitud de una cierta actividad o función de una molécula comparada con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del modulador. En ciertas realizaciones, un modulador es un inhibidor, que disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Inhibidores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, carbohidratos o moléculas orgánicas pequeñas. Los pepticuerpos están descritos en, p.e., WO01/83525.

El término "agonista" se refiere a un modulador que, cuando se contacta con una molécula de interés, causa un aumento en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula comparada con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del agonista. Agonistas particulares de interés pueden incluir, pero no se limitan a, polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, o cualquier otra molécula que se une al antígeno.

El término "antagonista" o "inhibitor" se refiere a un modulador que, cuando se contacta con una molécula de interés, causa una disminución en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula comparada con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del antagonista. Antagonistas particulares de interés incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica del antígeno. Los antagonistas e inhibidores de antígenos pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, o cualquier otra molécula, que se une al antígeno.

Como se usa aquí, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la severidad y/o duración de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, evitar el avance de un trastorno, causar la regresión de un trastorno, evitar la recurrencia,

desarrollo, aparición o progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o potenciar o mejorar el efecto profiláctico o terapeutico de otra terapia (p.e., agente profiláctico o terapéutico).

"Paciente" y "sujeto" se puede usar intercambiablemente aquí para referirse a un animal, tal como un mamífero, incluyendo un primate (por ejemplo, un humano, un mico, y un chimpancé), un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un conejillo de indias, un gato, un perro, una rata, un ratón una ballena), un pájaro (p.e., un pato o un ganzo), y un tiburón. Preferiblemente, el paciente o sujeto es un humano, tal como un humano que está siendo tratado o evaluado para una enfermedad, trastorno o condición, un humano en riesgo de una enfermedad, trastorno o condición, un humano que tiene una enfermedad, trastorno o condición, y/o humano que está siendo tratado para una enfermedad, trastorno o condición.

El término "muestra", como se usa aquí, se usa en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", como se usa aquí, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia de una cosa viviente o inidialmente cosa viviente. Tales cosas vivientes incluyen, pero no se limitan a, humanos, ratones, ratas, micos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, (p.e., sangre entera), plasma, suero, orina, fluido amniótico, fluido sinovial, células endoteliales, leucocitos, monocitos, otras células, órganos, tejidos, médula espinal, glandulas linfáticas y bazo.

"Componente", "componentes" y "al menos un componente" se refieren a un anticuerpo de captura, un ancicuerpo de detección o conjugado, un control, un calibrador, una serie de calibradores, un panel de sensibilidad, un recipiente, un amortiguador, un diluyente, una sal, una enzima, un co-factor para una enzima, un reactivo de detección, un reactivo/solución de pretratamiento, un sustrato (p.e., como una solución), una solución de detención, y similares, que se pueden incluir en un kit para ensayo de una muestra de prueba, tal como una orina, suero o muestra de plasma del paciente, de acuerdo con los métodos descritos aquí y otros métodos conocidos en la técnica. Así, enel contexto de la presente revelación, "al menos un componente", "componente" y

"componentes" pueden incluir un polipéptido u otro analito como antes, tal como una composición que comprende un analito tal como polipéptido, que está opcionalmente inmovilizado en un soporte sólido, tal como mediante unión a un anticuerpo anti-analito (p.e., anti-polipéptido). Algunos componentes pueden estar en solución o liofilizados para reconstitución para uso en un ensayo.

"Control" se refiere a una composición conocida por no ser un analito ("control negativo") o contener analito ("control positivo"). Un control positivo puede comprender una concentración conocida de analito. "Control", "control positivo" y "calibrador" se puede usar aquí intercambiablemente para referirse a una composición que comprende una concentración conocida de analito. Se puede usar un "control positivo" para establecer características de realización de ensayo y es un indicador útil de la integridad de los reactivos (p.e., analitos).

"Corte predeterminado" y "nivel predeterminado" se refiere generalmente a un valor de corte de ensayo que se usa para evaliar los resultados de eficacia de diagnóstico/pronóstico/terapéutica comparando los resultados del ensayo contra el corte/nivel predeterminado, en donde el corte/nivel predeterminado ya ha sido enlazado o asociado con varios parámetros clínicos (p.e., severidad de enfermedad, progresión/no progresión/mejoramiento, etc.). Aunque la presente revelación puede proporcionar niveles predeterminados ejemplares, es bien conocido que los valores de corte pueden variar dependiendo de la naturaleza del inmunoensayo (p.e., anticuerpos empleados, etc.). Está además bien dentro de la habilidad ordinaria de aquel de la técnica adaptar la revelación presente para otros inmunoensayos para obtener valores de corte específicos de inmunoensayo para quellos otros inmunoensayos basados en esta revelación. Mientras que el valor preciso del corte/nivel predeterminado puede variar entre esayos, las correlaciones aquí descritas (si las hay) deben ser generalmente aplicables.

"Reactivo de pretratamiento" p.e., reactivo de lisis, precipitación y/o solubilización, como se usa en un ensayo de diagnóstico aquí descrito es uno que lisa cualquier célula y/o solubiliza cualquier analito que está presente en una muestra de prueba. El pretratamiento no es necesario para todas las muestras, como se describe aquí adicionalmente. Entre otras cosas, la solubilización del analito (p.e., polipéptido de interés) puede suponer la

liberación del analito de cualquier proteína de unión endógena presente en la muestra. Un reactivo de pretratamiento puede ser homogéneo (no requiere un paso de separación) o heterogéneo (que requiere un paso de separación). Con el uso de un reactivo de pretratamiento heterogéneo hay remoción de cualquier proteína de unión de analito precipitado de la muestra de prueba antes de proceder al siguiente paso del ensayo.

"Reactivos de control de calidad" en el contexto de inmunoensayos y kits aquí descritos, incluyen, pero no se limitan a, calibradores, controles, y páneles de sensibilidad. Típicamente se usa un "calibrador" o "estándar" (p.e., uno o más, tales como una pluralidad) con el fin de establecer curvas de calibración (estándar) para interpolación de la concentración de un analito, tal como un anticuerpo o un analito. Alternativamente, se puede usar un solo calibrador, que está cerca de un corte positivo/negativo predeterminado. Se pueden usar múltiples calibradores (p.e., más de un calibrador o una cantidad variable de calibradores en conjunto con el fin de comprender un "panel de sensibilidad."

"Riesgo" se refiere a la posibilidad o probabilidad que ocurra un evento particular particular ya sea en el presente o en algún punto en el futuro. "Estratificación del riesgo" se refiere a un arreglo de factores de riesgo clínicos conocidos que permiten a los médicos clasificar pacientes en riesgo bajo, moderado, alto o más alto de desarrillar una enfermedad, trastorno o condición particular.

"Específico" y "especificidad" en el contexto de una interacción entre miembros de un par de unión específico (p.e., un antígeno (o fragmento del mismo) y un anticuerpo (o fragmento antigénicamente reactivo del mismo)) se refiere a la reactividad selectiva de la interacción. La frase "se une específicamente a" y frases análogas se refieren a la habilidad de los anticuerpos (o fragmentos antigénicamente reactivos de los mismos) para unirse específicamente al analito (o un fragmento del mismo) y no se unen específicamente a otra entidades.

"Compañero de unión específica" es un miembro de un par de unión específica. Un par de unión específica comprende dos moléculas diferentes, que se unen específicamente entre sí por medios químicos o físicos. Por lo tanto, además de los pares de unión específicos de antígeno y anticuerpo de

los inmunoensayos comunes, otros pares de unión específica pueden incluir biotina y avidina (o estreptavidina), carbohidratos y lectinas, secuencias de nucleotido complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores y enzimas, inhibidores de enzima y enzimas, y similares. Adicionalmente, los pares de unión específica pueden incluir miembros que son análogos de los miembros de unión específica originales, por ejemplo, un analito-análogo. Los miembros de unión específica inmunoreactivos incluyen antígenos, fragmentos de antígeno, y anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales y policlonales así como complejos, fragmentos, y variantes (incluyendo fragmentos de variantes) de los mismos, ya sea asilados o producidos recombinantemente.

"Variante" como se usa aquí significa un polipéptido que difiere de un polipéptido dado (p.e., IL-18, BNP, NGAL o polipéptido de VIH o anticuerpo anti-polipéptido) en la secuencia de amino ácido por la adición (p.e., inserción), deleción, o sustitución conservativa de amino ácidos, pero que retiene la actividad biológica del polipéptido dado (p.e., un IL-18 variante puede competir con el anticuerpo anti-IL-18 para unión a IL-18). Una sustitución conservativa de un amino ácido, p.e., reemplazo de un amino ácido con un amino ácido diferente de propiedades similares (p.e., hidrofilicidad y grado y distribución de regiones cargadas) es reconocido en la técnica como que involucra típicamente un cambio menor. Estos cambios menores pueden ser identificados, en parte, considerando el índice hidropático de los amino ácidos, como se entiende en la técnica (ver, p.e., Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982)). El índice hidropático de un amino ácido se basa en una consideración de su hidrofobicidad y carga. Se conoce en la técnica que los amino ácidos de índices hidropáticos similares pueden ser sustituidos y aún retienen la función de proteína. En un aspecto, los amino ácidos que tienen índices hidropáticos de ± 2 están sustituidos. La hidrofilicidad de los amino ácidos también se puede usar para revelar las sustituciones que producirían proteínas que retienen la función biológica. Una consideración de la hidrofilicidad de los amino ácidos en el contexto de un péptido permite el cálculo de la hidrofilicidad promedio local más grande de ese péptido, una medida útil que ha sido reportada para correlacionarse bien con la antigenicidad y la inmunogenicidad (ver, p.e., Patente U.S. No. 4,554,101, la cual está aquí incorporada mediante referencia). La sustitución de amino ácidos que tienen valores de hidrofilicidad similares pueden producir péptidos que retienen la actividad biológica, por

ejemplo inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. En un aspecto, las sustituciones se realizan con amino ácidos que tienen valores de hidrofilicidad entre ± 2 entre sí. Tanto el índice de hidrofilicidad como el valor de hidrofilicidad de los amino ácidos están influenciados por la cadena lateral particular de ese amino ácido. Consistente con esa observación, se entiende que las sustituciones de amino ácido que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud relativa de los amino ácidos, y particularmente las cadenas laterales de aquellos amino ácidos, revelado por la hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga, tamaño, y otras propiedades. "Variante" también se puede usar para describir un polipéptido o fragmento del mismo que ha sido procesado diferencialmente, tal como mediante proteólisis, fosforilación, u otra modificación post-traduccional, aunque reitene su anticipad biológica o reactividad de antígeno, p.e., la capacidad de unirse a IL-18. El uso de "variante" aquí pretende abarcar fragmentos de un variante a menos que se contradiga de otra forma por el contexto.

I. Generación de proteína de unión de DVD

La invención se relaciona con proteínas de unión de Dominio Variable Dual capaces de unirse a uno o más objetivos y métodos para preparaslas. En una realización, la proteína de unión comprende una cadena de polipéptido, en donde dicha cadena de polipéptido comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, C es un dominio constante, X1 representa un amino ácido o polipéptido, X2 representa una región Fc y n es 0 o 1. La proteína de unión de la invención puede ser generada usando varias técnicas. La invención provee vectores de expresión, células hospederas y métodos para generar la proteína de unión.

A. Generación de anticuerpos monoclonales base

Los dominios variables de la proteína de unión de DVD pueden ser obtenidos a partir de anticuerpos base, incluyendo policlonales y mAbs capaces de unirse a los antígenos de interés. Estos anticuerpos pueden encontrarse naturalmente o pueden ser generados mediante tecnología recombinante.

Los MAbs se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en el arte, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinante, y despliegue del fago, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los mAbs pueden ser producidos usando técnicas de hibridoma que incluyen aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies y T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (dichas referencias incorporadas mediante referencia en su totalidad). El término "anticuerpo monoclonal" como se usa aquí no está limitado a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico, o de fago, y no del método mediante el cual se produce. Los hibridomas son seleccionados, clonados y seleccionados adicionalmente para las características deseadas, incluyendo crecimiento de hibridoma robusto, alta producción de anticuerpo y características de anticuerpo deseables, discutidas en el Ejemplo 1 siguiente. Los hibridomas pueden ser cultivados y expandidos in vivo en animales singenéicos, en animales que carecen de un sistema inmune, p.e., ratones desnudos, o en cultivo celular in vitro. Los métodos para seleccionar, clonar y expandir los hibridomas son bien conocidos por los expertos en la técnica. En una realización particular, los hibridomas son hibridomas de ratón. En otra realización, los hibridomas son producidos en una especia no humana, no ratón tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, en los cuales un mieloma no secretor humano está fusionado con una célula humana que expresa un anticuerpo capaz de unirse a un antígeno específico.

Los mAbs recombinantes también son generados de linfocitos simples aislados usando un procedimiento referido en la técnica como el método de anticuerpo de linfocito seleccionado (SLAM), como se describe en la Patente U.S. No. 5,627,052, Publicación PCT WO 92/02551 y Babcock, J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848. En este método, se identifican las células simples que secretan los anticuerpos de interés, p.e., linfocitos derivados de un animal inmunizado, y los ADNc de región variable de cadena pesada y ligera son rescatados de las células mediante transcriptasa reversa-PCR y estas regiones variables pueden ser luego expresadas, en el contexto

de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (p.e., regiones constantes humanas), en células hospederas mamíferas, tales como células COS o CHO. Las células hospederas transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados in vivo, pueden entonces someterse a análsis adicionales y selección in vitro, por ejemplo filtrando las células transfectadas para aislar las células que expresan anticuerpos al antígeno de interés. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden ser además manipuladas in vitro, tal como mediante métodos de maduración de afinidad in vitro tales como los descritos en la publicación PCT WO 97/29131 y Publicación PCT WO 00/56772.

Los anticuerpos monoclonales también son producidos inmunizando un animal no humano que comprende algunos, o todos los puntos de inmunoglobulina humana con un antígeno de interés. En una realización, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón diseñada que comprende fragmentos grandes de los puntos de inmunoglobulina humana y es deficiente en producción de anticuerpo de ratón. Ver, p.e., Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994) y Patentes de los estados unidos Nos. 5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598 y 6,130,364. Ver también WO 91/10741, publicada el 25 de Julio de 1991, WO 94/02602, publicada el 3 de Febrero de 1994, WO 96/34096 y WO 96/33735, ambas publicadas el 31 de Octubre de 1996, WO 98/16654, publicada el 23 de Abril de 1998, WO 98/24893, publicada el 11 de Junio de 1998, WO 98/50433, publicada el 12 de Noviembre de 1998, WO 99/45031, publicada el 10 de Septiembre de 1999, WO 99/53049, publicada el 21 de Octubre de 1999, WO 00 09560, publicada el 24 de Febrero de 2000 y WO 00/037504, publicada el 29 de Junio de 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano tipo adulto de anticuerpos totalmente humanos, y genera anticuerpos monoclonales humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpo humano a través de la introducción de fragmentos YAC de configuración de línea germinal de tamaño de megabase de los puntos de cadena pesada humana y x puntos de cadena ligera. Ver Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), cuyas revelaciones están aquí incorporadas mediante referencia.

Los métodos in vitro también se pueden usar para preparar los anticuerpos base, en donde una librería de anticuerpo es seleccionada para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para tal selección de librerías de anticuerpo recombinantde son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos en, por ejemplo, Ladner et al. Patente U.S. No. 5,223,409; Kang et al. Publicación PCT No. WO 92/18619; Dower et al. Publicación PCT No. WO 91/17271; Winter et al. Publicación PCT No. WO 92/20791; Markland et al. Publicación PCT No. WO 92/15679; Breitling et al. Publicación PCT No. WO 93/01288; McCafferty et al. Publicación PCT No. WO 92/01047; Garrard et al. Publicación PCT No. WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; y Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982, publicación de solicitud de Patente US 20030186374, y Publicación PCT No. WO 97/29131, cuyos contenidos de cada una están incorporados aquí mediante referencia.

Los anticuerpos base de la presente invención también pueden ser generados usando varios métodos de despliegue del fago conocidos enla técnica. En los métodos de despliegue del fago, los dominios del anticuerpo funcionales son mostrados sobre la superficie de partículas de fago las cuales portan las secuencias de polinucleótido que los codifican. En un particular, tal fago puede ser utilizado para mostrar los dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o librería de anticuerpo combinacional (p.e., humana o murina). El fago que expresa un dmino de unión a antígeno que se une al antígeno de interés puede ser seleccionado o identificado con antígeno, p.e., usando antígeno marcado o antígeno enlazado o capturado en una superficie sólida o lecho. El fago usado en estos métodos es típicamente fago filamentoso que incluye los dominios de unión fd y M13 expresados del fago con dominios de anticuerpo Fv estabilizado con Fab, Fv o disulfuro fusionados recombinantemente a cualquiera del gen II del fago o proteína del gen VIII. Ejemplos de métodos de despliegue del fago que se pueden usar para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos revelados

en Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); Solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Pat U.S. Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780, 225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108; cada una de las cuales está incorporada aquí mediante referencia en su totalidad.

Como se describe en las presentes referencias, después de la selección del fago, las regiones que codifican el anticuerpo en el fago pueden ser asiladas y usadas para generar anticuerpos enteros que incluyen anticuerpos humanos y cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresados en cualquier hospedero deseado, incluyendo células mamíferas, células de insecto, células de planta, levadura, y bacterias, p.e., descritas en detalle más adelante. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')2 también pueden ser empleadas usando métodos conocidos en la técnica, tales como los revelados en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); y Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); y Better et al., Science 240:1041-1043 (1988) (dichas referencias incorporadas mediante referencia en su totalidad). Ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fvs de cadena sencilla y anticuerpos incluyen aquellos descritos en la Pat. U.S. 4,946,778 y 5,258, 498; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); y Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988).

Alternativo a la selección de librerías de anticuerpo recombinantes mediante despliegue del fago, se pueden aplicar otras metodologías conocidas en la técnica para seleccionar grandes librerías combinacionales para la identificación de anticuerpos base. Un tipo de sistema de expression alternative es uno en el cual la librería de anticuerpo recombinante es expresada cp,p fuciones ARN-proteína, descritas en la Publicación PCT No. WO 98/31700 de Szostak y Roberts, y en Roberts, R.W. y Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 94:12297-12302. En este sistema, se crea una fusion covalente entre

un ARNm y el péptido o proteína que lo codifica por traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que portan puromicina, un antibiótico aceptor peptidilo, en su entremo 3'. Así, un ARNm específico puede ser enriquecido de una mezcla compleja de ARNm (p.e., una librería combinacional) con base en las propiedades del péptido o proteína codificada, p.e., anticuerpo, o porción del mismo, tal como unión del anticuerpo, o porción del mismo, al antígeno de especificidad dual. Las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos, o porciones de los mismos, recuperadas de la selección de tales librerías pueden ser expresadas por medios recombinantes aquí descritos (p.e., en células hospederas mamíferas) y, más aún, pueden ser sometidas a maduración de afinidad adicional mediante rondas adicionales de selección de fusiones de ARNm-péptido en las cuales se han introducido mutaciones en la(s) secuencia(s) originalmente seleccionada(s), o por otros métodos para afinidad de maduración *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se describe aquí.

En otro enfoque, los anticuerpos base también pueden ser generados usando métodos de despliegue en levadura conocidos en la técnica. En los métodos de despliegue en levadura, se usan métodos genéticos para atar dominios de anticuerpo a la pared celular de la levadura y mostrarlos sobre la superficie de la levadura. En particular, tal lavedura puede ser utilizada para mostrar los dominios de unión a antígeno expresados a partir de un reprtorio o librer+ia de anticuerpo combinacional (p.e., humana o murina). Ejemplos de métodos de despliegue en levadura que se pueden usar para preparer los anticuerpos base incluyen aquellos revelados en Wittrup, et al. Patente U.S. No. 6,699,658 incorporada aquí mediante referencia.

Los anticuerpos aquí descritos pueden ser modificados adicionalmente para generar anticuerpos base con CDR injertada y humanizados. Los anticuerpos base de CDR injertada comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano, en donde una o más regiones CDR de V_H y/o V_L son reemplazadas con secuencias de CDR de anticuerpos murinos capaces de unirse al antígeno de interés. Una secuencia de marco de cualquier anticuerpo humano puede servir como la plantilla para el injerto de CDR. Sin embargo, el reemplazo de cadena recta en tal marco a menudo conduce a alguna pérdida de afinidad de unión al antígeno. En cuanto

más homólogo es un anticuerpo humano al anticuerpo murino original, menos pobable es la posibilidad que combinando las CDRs murinas con el marco humano se introducirán distorsiones en las CDRs que podrían reducir la afinidad. Por lo tanto, en una realización, el marco variable humano que es elegido para reemplazar el marco variable murino además de las CDRs tiene al menos una identidad de secuencia del 65% con el marco de región variable del anticuerpo murino. En una realización, las regions variables humana y murina, además de las CDRs tienen al menos 70% de identidad de secuencia. En una realización particular, que las regiones variables humans y murina, además de las CDRs tiene al menos 75% de identidad de secuencia. En otra realización, las regions variables humana y murina, además de las CDRs tienen menos 80% de identidad de secuencia. Los métodos para producer tales anticuerpos son conocidos en la técnica (ver EP 239,400; publicación PCT WO 91/09967; Pat. U.S. Nos. 5,225,539; 5,530,101; y 5,585,089), enchapado o revestimiento (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994)), y mezclado de cadena (Pat. U.S. No. 5,565,352); y anticuerpos anti-idiotípicos.

Los anticuerpos humanizados con moléculas de anticuerpo de especie no humana que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de la especie no humana, y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Las secuencias de Ig humana conocidas están reveladas, p.e., www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immuno- logy.html.www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.- html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html-; www.nal.usda.gov/awic/pubs/anticuerpo/; www.m.ehime-u.acjp/.about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin-

ks.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP- Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; anticuerpo.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), cada una totalmente incorporada aquí mediante referencia. Tales secuencias importadas se pueden usar para reducir la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión, afinidad, velocidad on, velocidad off, avidez, especificidad, mida media, o cualquier otra característica adecuada, conocida en la técnica.

Los residuos de marco en las regiones de marco usadas pueden estar sustituidos con el residuo correspondiente del anticuerpo dondador de CDR para alterar, p.e., mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones de marco son identificadas mediante métodos bien conocidos en la técnica, p.e., mediante modelamiento de las interacciones de CDR y residuos de marco para identificar los residuos de marco importantes para la union a antígeno y comparación de secuencia para identificar residuos de marco inusuales en posiciones particulares. (Ver, p.e., Queen et al., Pat U.S. No. 5,585,089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), las cuales estás incorporadas aquí mediante referencia en su totalidad). Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas de computadora que ilustran y muestras estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite el análisis de el papel probable de los residuos

en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, p.e., el análisis de residuos que incluyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden ser seleccionados y combinados a partir de secuencias de consenso e importación de forma que se logra la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada para el(los) antígeno(s) objetivo,. En general, los residuos de CDR están directamente y en su mayoría sustancialmente involucrados en la influencia de unión a antígeno. Los anticuerpos pueden ser humanizados usando una variedad de técnicas conocidas en el arte, tales como, pero sin limitarse a aquellas descritas en Jones et al., *Nature* 321:522 (1986); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994); publicación PCT WO 91/09967, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592,106; EP 519,596, EP 239,400, Pat. U.S. Nos. 5,565,332, 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567, cada una enteramente incorporada aquí mediante referencia, incluídas las referencias allí citadas.

B. Criterios para seleccionar anticuerpos monoclonales base

Una realización de la invención se relaciona con la selección de anticuerpos base con al menos una o más propiedades deseadas en la molécula de DVD-Ig. En una realización, la propiedad deseada se selecciona de uno o más parámetros de anticuerpo. En otra realización, los parámatros de anticuerpo son seleccionados del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad al antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítopo, estabilidad, solubilidad, eficiencia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada en tejido, y unión a antígeno ortóloga.

B1. Afinidad al Antígeno

La afinidad deseada de un mAb terapéutico puede depender de la naturaleza del antígeno, y el punto final terapéutico deseado. En una realización, los anticuerpos monoclonales tienen mayors afinidades (Kd = 0.01 – 0.50 pM) cuando bloquean la interacción de una citoquina-receptor de citoquina porque tal interacción es usualmente una interacción de alta afinidad (p.e., rangos <pM – <nM). En tales casos, la afinidad del mAb para su objetivo debe ser igual o major que la afinidad de la citoquina (ligando) para su receptor. Por otra parte, el mAb con menor afinidad (rango > nM) podría ser terapéuticamente efectivo p.e., para depuración de proteínas circulantes potencialmente patogénicas p.e., anticuerpos monoclonales que se unen a, secuentran, y limpian especies circulantes de A-β amiloide. En otros casos, la reducción de la afinidad de un mAb de alta afinidad existente mediante mutagenesis dirigida al sitio o usando un mAb con menor afinidad para su objetivo, se podría usar para evitar efectos secundarios potenciales p.e., un mAb de alta afinidad puede secuestrar/neutralizar todos los objetivos previstos, depletando/eliminando completamente de esta forma la(s) función(es) de la proteína objetivo. En este escenario, un mAb de baja afinidad puede secuestrar/neutralizer una fracción del objetivo que puede ser responsable de los síntomas de la enfermedad (los niveles patológicos o sobre producidos), permitiendo así que una fracción del objetivo continue realizando sus funciones fisiológicas normales. Por lo tanto, puede ser posible reducir la Kd para ajustar la dosis y/o reducir efectos secundarios. La afinidad del mAb base podría jugar un papel en el marcado apropiado de moléculas de superficie celular para lograr el resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, si un objetivo es expresado sobre células de cancer con alta densidad y sobre células normales con baja densidad, un mAb de menor afinidad se unirá a un múmero mayor de objetivos sobre células de tumor que células normales, produciendo la eliminación de célula de tumor mediante ADCC o CDC, y por lo tanto, podría tener efectos terapéuticamente deseables. Así, la selección de un mAb con afinidad deseada puede ser relevante para objetivos solubles y de superficie.

La señalización mediante un receptor a la interacción con su ligando puede depender de la afinidad de la interacción receptor-ligando. Igualmente, es concebible que la afinidad de un mAb para un receptor de superficie podría determinar la naturaleza de la señalización intracelular y si el mAb puede

liberar una señal agonista o antagonista. La naturaleza basada en afinidad de la señalización mediada por mAb puede tener un impacto de su perfil de efecto secundario. Por lo tanto, la afinidad deseada y las funciones deseadas de los anticuerpos monoclonales deseados requiere ser determinada cuidadosamente mediante experimentación in vitro e in vivo.

El Kd deseado de una proteína de unión (p.e., un anticuerpo) puede ser determinado experimentalmente dependiendo del resultado terapéutico deseado. En una realización, se seleccionan los anticuerpos base con afinidad (Kd) para un antígeno particular igual a, o mejor que la afinidad deseada de la DVD-Ig para el mismo antígeno. La afinidad de unióna antígeno y la cinética son evaluadas mediante Biacore u otra término similar. En una realización, cada anticuerpo base tiene una constante de disociación (Kd) a su antígeno seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente 10^{-7} M; máximo aproximadamente 10^{-8} M; máximo aproximadamente 10^{-9} M; máximo aproximadamente 10^{-10} M; máximo aproximadamente 10^{-11} M; máximo aproximadamente 10^{-12} M; y máximo 10^{-13} M. El primer anticuerpo base del cual se obtiene VD1 y el segundo anticuerpo base del cual se obtiene VD2 pueden tener afinidad similar o diferente (K_D) para el antígeno respectivo. Cada anticuerpo base tiene una constante de velocidad de asociación (Kon) al antígeno seleccionado del grupo que consiste de: al menos aproximadamente $10^2M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5M^{-1}s^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6M^{-1}s^{-1}$, medida mediante resonancia de plasmón superficial. El primer anticuerpo base del cual se obtiene VD1 y el segundo anticuerpo base del cual se obtiene VD2 pueden tener cconstante de velocidad de asociación (Kon) similar o diferente para el antígeno respectivo. En una realización, cada anticuerpo base tiene una constante de velocidad de disociación (Koff) al antígeno seleccionado del grupo que consiste de: máximo aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; máximo aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; máximo aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; y máximo aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, medida mediante resonancia de plasmón superficial. El primer anticuerpo base del cual se obtiene VD1 y el segundo anticuerpo base del cual se obtiene VD2 pueden tener constantes de velocidad de disociación (Koff) similares o diferentes para el antígeno respectivo.

B2. Potencia

La afinidad/potencia deseada de los anticuerpos monoclonales base dependerá del resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, par alas interacciones receptor-ligando (R-L) la afinidad (kd) es igual o mejor que la kd R-L (rango pM). Para la depuración simple de una proteína circulante patológica, la kd podría estar en un rango nM bajo p.e., depuración de varias especies de péptido A-β circulante. Adicionalmente, la kd también dependerá de si el objetivo expresa múltiples copias del mismo epítopo, p.e, un mAb que marca epítopo conformacional en oligómeros Aβ.

Cuando VD1 y VD2 se unen al mismo antígeno, pero diferentes epítopos, la DVD-Ig contendrá 4 sitios de unión para el mismo antígeno, aumentando así la avidez y por ende, el kd aparente de la DVD-Ig. En una realización, se eligen anticuerpos base con kd igual o menor que la deseada en la DVD-Ig. Las consideraciones de afinidad de un mAb base también pueden depender de si la DVD-Ig contiene cuatro o más sitios de unión a antígeno idénticos (p.e; una DVD-Ig de un solo mAb). En este caso, la kd aparente sería mayor que el mAb debido a avidez. Tales DVD-Igs se pueden emplear para enlazar cuzadamente el receptor de superficie, aumentar la potencia de neutralización, potenciar la depuración de proteínas patológica, etc.

En una realización, se seleccionan anticuerpos base con potencia de neutralización para antígeno específico igual o mejor que el potencial de neutralización deseado de la DVD-Ig para el mismo antígeno. La potencia de neutralziación puede ser evaluada mediante un bioensayo dependiente del objetivo en donde las céluñas del tipo apropiado producen una señal medible (p.e. proliferación o producción de citoquina) en respuesta a la estimulación del objetivo, y la neutralización del objetivo por el mAb puede reducir la señal de una manera dependiente de la dosis.

B3. Funciones Biológicas

Los anticuerpos monoclonales pueden realizar potencialmente varias funciones. Algunas de estas funciones están listadas en la Tabla 1. Estas funciones pueden ser evaluadas tanto por ensayos in vitro (p.e., ensayos basados en células y ensayos bioquímicos) y modelos animales in vivo.

Tabla 1: Algunas Aplicaciones Potenciales para los Anticuerpos Terapéuticos

Objetivo (Clase)	Mecanismo de acción (objetivo)
Soluble (citoquinas, otras)	Neutralización de la actividad (p.e., una citoquina) Potenciar Depuración (p.e., oligómeros Aβ) Aumento de vida media (p.e., GLP 1)
Superficie Celular (Receptores, otros)	Agonista (p.e., GLP1 R; EPO R; etc.) Antagonista (p.e., integrinas; etc.) Citotóxica (CD 20; etc.)
Depósitos de proteína	Potenciar depuración/degradación (p.e., placas Aβ, depósitos amiloides)

Los MAbs con funcines distintas descritas en los ejemplos presentes en la Tabla 1 pueden ser seleccionados para lograr resultados terapeuticos deseados. Dos o más anticuerpos monoclonales base pueden entonces sel usados en el formato DVD-Ig para lograr dos funciones distintas en una sola molécula de DVD-Ig. Por ejemplo, una DVD-Ig puede ser generada seleccionando un mAb base que neutralice la función de una citoquina específica, y seleccionando un mAb base que potencie la depuración de una proteína patológica. Igualmente, podemos seleccionar dos anticuerpos monoclonales base que reconocen dos receptors de superficie cellular diferentes, un mAb con una función agonista sobre un receptor y el otro mAb con una función antagonista sobre un receptor diferente. Estos dos anticuerpos monoclonales seleccionados, cada uno con una function distinta, se pueden usar para construir una sola molécula de DVD-Ig que poseerá las dos funciones distintas (agonista y antagonista) de los anticuerpos monoclonales seleccionados en una sola molécula. Igualmente, se pueden usar dos anticuerpos monoclonales antagonísticos a los receptors de superficie celular cada uno bloqueando la unión de los ligandos de receptor respectivos (p.e.,EGF e IGF) en un formato de DVD-Ig. Inversamente A la inversa, se puede seleccionar un mAb anti-receptor antagonístico (p.e., anti-EGFR) y un mAb mediador anti-soluble neutralizante (p.e., anti-IGF1/2) para preparar una DVD-Ig.

B4. Reconocimiento de Epítopo:

Diferentes regiones de proteínas pueden realizar diferentes funciones. Por ejemplo, regions específicas de una citoquina interactúan con el receptor de citoquina para provocar la activación, mientras que otras regiones de la proteína pueden ser requeridas para estabilizar la citoquina. En este caso, se puede seleccionar un mAb que se une específicamente a la región (regiones) de interacción del receptor en la citoquina, y de esta forma bloquear la interacción citoquina-receptor. En algunos casos, por ejemplo, se pueden seleccionar ciertos receptores de quimioquina que se unen a múltiples ligandos, un mAb que se une al epítopo (región sobre el receptor de quimioquina) que interactúa con solamente un ligando. En otros casos, los anticuerpos monoclonales se pueden unir a epítopos sobre un objetivo que no es responsible directamente de las funciones fisiológicas de la proteína, pero la unión de un mAb a estas regiones podría interferir con las funciones fisiológicas (hidrancia estérica) o alterar la conformación de la proteína de forma que la proteína no puede funcionar (mAb a los receptores con múltiples ligandos que alteran la conformación del receptor de forma que ninguno de los ligandos se puede unir). También se han identificado anticuerpos monoclonales anti-citoquina que no bloquean la unión de la citoquina a su receptor, pero bloquean la transducción de señal (p.e., 125-2H, un mAb anti-IL-18).

Ejemplos de funciones de epítopos y mAb incluyen, pero no se limitan a, bloqueo de la interacción Receptor-Ligando (R-L) (neutralizando el mAb que se une al sition de interacción de R); hidrancia estérica que produce unión a R disminuida o no unión. Un Ab se puede unir al objetivo en un sitio diferente al sitio de unión al receptor, pero aún interfiere con la unión al receptor y las funciones del objetivo mediante la inducción del cambio conformacional y eliminación de la función (p.e., Xolair), unión a R pero bloqueando la señalización (125-2H).

En una realización, el mAb base necesita marcar el epítopo apropiado para máxima eficacia. Tal epítopo debe ser conservado en la DVD-Ig. El epítopo de unión de un mAb puede ser determinado mediante varios enfoques, incluyendo co-cristalografía, proteólisis limitada del complejo mAb-antígeno más mapeo de péptido espectrométrico de masas (Legros V. et al 2000 Protein Sci. 9:1002-10), librerías de péptido de fago desplegado (O'Connor KH et al

2005 J Immunol Methods. 299:21-35), así como mutagénesis (Wu C. et al . 2003 J Immunol 170:5571-7).

B5. Propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas:

El tratamiento terapeutico con anticuerpos requiere a menudo la administración de altas dosis, a menudo varios mg/kg (debido a una baja potencia sobre una base en masa, como consecuencia de un pero molecular grande). Con el fin de acomodarse a la satisfacción del paciente y para dirigir adecuadamente las terapias de enfermedad crónica y el tratamiento de paciente externo, es deseable la administración subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.) de los mAbs terapéuticos. Por ejemplo, el volumen máximo deseable para la administración s.c. es ~1.0 mL, y por consiguiente, las concentraciones de >100 mg/mL son deseables para limitar el número de inyecciones por dosis. En una realización, el anticuerpo terapeutico es administrado en una dosis. El desarrollo de tales formulaciones está restringido, sin embargo, por las interacciones proteína-proteína (p.e., agregación, que aumenta potencialmente los riesgos de inmunogenicidad) y por limitaciones durante el procesamiento y liberación (p.e., viscosidad). En consecuencia, las grandes cantidades requeridas para eficacia clínica y las restricciones de desarrollo asociada limitan la explotación total del potencial de la formulación de anticuerpo y la administración s.c. en regímenes de dosis alta. Es obvio que las propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas de una molécula de proteína y la solución de proteína sean de importancia, p.e., características de estabilidad, solubilidad y viscosidad.

B5.1. Estabilidad:

Una formulación de anticuerpo "estable" es una en la cual el anticuerpo allí retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica al almacenamiento. La estabilidad puede ser medida a una temperature seleccionada por un período de tiempo seleccionado. En una realización, el anticuerpo en la formulación es estable a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) o a 40°C por al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2-8°C por al menos 1 año, por al menos 2 años. Adicionalmente, en una realización, la formulación es estable después de la congelación (a, p.e., -70°C) y descongelación de la formulación, de aquí en

adelante referida como un "ciclo de congelación/descongelación". En otro ejemplo, una formulación "estable" puede ser una en donde menos de aprocimadamente 10% y menos de aproximadamente 5% de la proteína está presente como un agregado en la formulación.

Es deseable una DVD-Ig estable in vitro a varias temperaturas por un período de tiempo prolongado. Esto se puede lograr por selección rápida de mAbs base estables in vitro a temperatura elevada, p.e., a 40°C por 2-4 semanas, y luego evaluando la estabilidad. Durante el almacenamiento a 2-8°C, la proteína revela la estabilidad por al menos 12 meses, p.e., al menos 24 meses. La estabilidad (% de molécula monomérica, intacta) puede ser evaluada usando varias técnicas tales como cromatografía de intercambio de catión, cromatografía por exclusión de tamaño, SDS-PAGE, así como pruebas de bioactividad. Para una lista más detallada de técnicas analíticas que se pueden emplear para analizar las modificaciones covalentes y conformacionales, favor ver Jones, A. J. S. (1993) Analytical methods for the assessment of protein formulations y delivery systems. In: Cleland, J. L.; Langer, R., editors. Formulation and delivery of peptides and proteins, 1st edition, Washington, ACS, pg. 22-45; y Pearlman, R.; Nguyen, T. H.(1990) Analysis of protein drugs. In: Lee, V. H., editor. Peptide and protein drug delivery, 1st edition, New York, Marcel Dekker, Inc., pg. 247-301.

Heterogeneidad y formación de agregado: la estabilidad del anticuerpo puede ser tal que la formulación puede revelar menos de aproximadamente 10%, y, en una realización, menos de aproximadamente 5%, en otra realización, menos de aproximadamente 2%, o, en una realización, entre el rango de 0.5% a 1.5% o menos en el material de anticuerpo GMP que está presente como agregado. La cromatografía de exclusion de tamaño es un método que es sensible, reproducible, y muy robusto para la detección de agregados de proteína.

Además de niveles de agregado bajos, el anticuerpo debe, en una realización, ser químicamente estable. La estabilidad química puede ser determinada mediante cromatografía de intercambio iónico (p.e., cromatografía de intercambio aniónico o catiónico), cromatografía de interacción hidrofóbica,

u otros métodos tales como enfoque isoeléctrico o electroforesis capilar. Por ejemplo, la estabilidad química del anticuerpo puede ser tal que después de almacenamiento de al menos 12 meses a 2-8°C, el pico que representa el anticuerpo no modificado en una cromatografía de intercambio catiónico puede aumentar en no más del 20%, en una realización, no más del 10%, o, en otra realización, no más del 5% comparada con la solución de anticuerpo antes de la prueba de almacenamoento.

En una realización, los anticuerpos base muestran integridad estructural; correcta formación de enlace de disulfuro, y correcto plegamiento: la inestabilidad química debido a cambios de la estructura secundaria o terciaria de un anticuerpo pueden afectar la actividad del anticuerpo. Por ejemplo, la estabilidad indicada por la actividad del anticuerpo puede ser tal que después de almacenamiento de al menos 12 meses a 2-8°C, la actividad del anticuerpo puede disminuir en no más del 50%, en una realización, no más del 30%, o incluso no más del 10%, o en una realización, no más del 5% o 1% comparada con la solución de anticuerpo antes de la prueba de almacenamiento. Se pueden emplear ensayos de unión a antígeno adecuados para determinar la actividad del anticuerpo.

B5.2. Solubilidad:

La "solubilidad" de un mAb se correlaciona con la producción IgG monomérico plegado correctamente. La solubilidad de la IgG puede, por consiguiente, ser evaluada mediante HPLC. Por ejemplo, IgG soluble (monomérico) dará lugar a un solo pico en la cromatográfica de HPLC, mientras que el insoluble (p.e., multimérico y agregado) dará lugar a una pluralidad de picos. Un experto en la técnica pordrá, por consiguiente, detectar un aumento o descenso de la solubilidad de una IgG usando técnicas de HPLC de rutina. Para una lista más exhaustiva de técnicas analíticas que se pueden emplear para analizar la solublidad (ver Jones, A. G. Dep. Chem. Biochem. Eng., Univ. Coll. London, London, UK. Editor(s): Shamlou, P. Ayazi. Process. Solid-Liq. Suspensions (1993), 93-117. Publisher: Butterworth-Heinemann, Oxford, UK y Pearlman, Rodney; Nguyen, Tue H, Advances in Parenteral Sciences (1990), 4 (Pept. Protein Drug Delivery), 247-301). La solubilidad de un mAb terapéutico es crítica para la formulación a alta concentración a menudo

requerida para dosificación adecuada. Como se indicó aquí, se pueden requerir solubilidades de >100 mg/mL para acomodar la dosificación de anticuerpo eficiente. Por ejemplo, la solubilidad del anticuerpo puede ser de no menos de aproximadamente 5 mg/mL en la fase de investigación temprana, en una realización no menos de aproximadamente 25 mg/mL en etapas de ciencia de proceso avanzadas, o en una realización, no menos de aproximadamente 100 mg/mL, o en una realización, no menos de aproximadamente 150 mg/mL. Es obvio para un experto en la técnica que las propiedades intrínsecas de una molécula de proteína son importantes las propiedades fisico-químicas de la solución de proteína, p.e., estabildad, solubilidad, viscosidad. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que existe una amplia variedad de excipientes que se pueden usar como aditivos para afectar benéficamente las características de la formulación de proteína final. Estos excipientes pueden incluir: (i) solventes líquidos, cosolventes (p.e.,alcoholes tal como etanol); (ii) agentes amortiguadores (p.e., fosfato, acetato, citrato, amortiguadores de amino ácido); (iii) azúcares o alcoholes de azúcar (p.e., sacarosa, trehalosa, fructosa, rafinosa, manitol, sorbitol, dextranos); (iv) surfactantes (p.e., polisorbato 20, 40, 60, 80, poloxámeros); (v) modificadores de isotonicidad (p.e., sales tales como NaCl, azúcares, alcoholes de azúcar); y (vi) otros (p.e., preservantes, agentes quelantes, antioxidantes, sustancias quelantes (p.e., EDTA), polímeros biodegradables, moléculas vehículo (p.e., HSA, PEGs)

La viscosidad es un parámetro de alta importancia con respecto a la fabricación de anticuerpo y procesamiento de anticuerpo (p.e., diafiltración/ultrafiltración), processos de llenado-acabado (aspectos de bombeo, aspectos de filtración) y aspectos de liberación (por medio de jeringa, liberación de dispositivo sofisticado). Las bajas viscosidades permiten que la solución liquida del anticuerpo tenga una mayor concentración. Esto permite que la misma dosis pueda ser administrada en volúmenes más pequeños. Los volúmenes de inyección pequeños conlleva la ventaja de menor dolor en las sensaciones de inyección, y las soluciones no necesariamente tienen que ser isotónicas para reducir el dolor por la inyección en el paciente. La viscosidad de la solución de anticuerpo puede ser tal que a velocidades de corte de 100 (1/s) la viscosidad de la solución de anticuerpo esté por debajo de 200 mPa s, en una realización, por debajo de 125 mPa s, en otra realización por debajo de 70

mPa s, y en ya otra realización, por debajo de 25 mPa s o incluso por debajo de 10 mPa s.

B 5.3. Eficiencia de producción

La generación de una DVD-Ig que sea expresada eficientemente en células mamíferas, tales como células de ovario de hámster Chino (CHO), requerirá, en una realización, dos anticuerpos monoclonales base que están ellos mismos expresados eficientemente en células mamíferas. El rendimiento de producción de una línea mamífera estable (p.e. CHO) debe estar por encima de aproximadamente 0.5g/L, en una realización por encima de aproximadamente 1g/L, y en otra realización, en el rango de aproximadamente 2-5 g/L o más (Kipriyanov SM, Little M. 1999 Mol Biotechnol. 12:173-201; Carroll S, Al-Rubeai M. 2004 Expert Opin Biol Ther. 4:1821-9).

La producción de anticuerpos y proteínas de fusión de Ig en células mamíferas está influenciada por varios factores. El diseño del vector de expresión mediante la incorporación de promotores fuertes, potenciadores y marcadores de selección puede maximizar la transcripción del gen de interés a partir de una copia del vector integrado. La identificación de los sitios de integración del vector que son permisivos para altos niveles de transcripción de gen pueden aumentar la expresión de proteína de un vector (Wurm et al, 2004, Nature Biotechnology , 2004, Vol/Iss/Pg. 22/11 (1393-1398)). Adicionalmente, los niveles de producción están afectados por la relación de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y varios pasos en el proceso de ensamble y secreción de proteína (Jiang et al. 2006, Biotechnology Progress, Jan-Feb 2006, vol. 22, no. 1, p. 313-8).

B 6. Inmunogenicidad

La administración de un mAb terapéutico puede producir cierta incidencia de una respuesta inmune (p.e., la formación de anticuerpos endógenos dirigidos contra el mAb terapéutico). Elementos potenciales que pueden inducir la inmunogenicidad deben ser analizados durante la selección de los anticuerpos monoclonales base, y se deben tomar las medidas para reducir tal riesgo con el fin de optimizar los anticuerpos monoclonales base

antes de la construcción de la DVD-Ig. Se ha encontrado que los anticuerpos derivados de ratón son altamente inmunogénicos en los pacientes. La generación de anticuerpos quiméricos comprendidos de regiones variables de ratón y constantes humanas presenta un siguiente paso lógico para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos (Morrison y Schlom, 1990). Alternativamente, la inmunogenicidad puede ser reducida transfiriendo las secuencias de CDR murinas en un marco de anticuerpo humano (reformado/injerto de CDR/humanización), descrita para un anticuerpo terapéutico por Riechmann et al., 1988. Otro método es referido como "regeneramiento" o "enchapado", partiendo con los dominios de ligero y pesado de roedor, solamente los qamino ácidos de marco accesibles en la superficie son alterados a humanos, mientras que la CDR y los amino ácidos enterrados permanecen en el anticuerpo de roedor base (Roguska et al., 1996). En otro tipo de humanización, en lugar de injertar las CDRs enteras, una técnica injerta solamente las "regiones determinantes de especificidad" (SDRs), definidas como el subconjunto de residuos de CDR que están involucrados en la unión del anticuerpo a su objetivo (Kashmiri et al., 2005). Esto requiere la identificación de las SDRs ya sea mediante análisis de estructuras tridimensionales disponibles de complejos anticuerpo-objetivo o análisis mutacional de los residuos de CDR del anticuerpo para determinar cual interactúa con el objetivo. Alternativamente, los anticuerpos totalmente humanos pueden tener inmunogenicidad reducida comparados con los anticuerpos murinos, quiméricos o humanizados.

Otro enfoque para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos es la eliminación de ciertas secuencias específicas que se predice que son inmunogénicas. En un enfoque, después que una primera generación biológica ha sido probada en humanos y se encontró que era inaceptablemente inmunogénica, los epítopos de célula B pueden ser mapeados y luego alterados para evitar la detección inmune. Otro enfoque usa métodos para predecir y remover epítopos de célula T potenciales. Se han desarrollado métodos por computadora para rastrear e identificar las secuencias de péptido de terapéuticos biológicos con el potencial de unirse a proteínas MHC (Desmet et al., 2005). Alternativamente, se puede usar un método basado en célula dendrítica humana para identificar epítopos de célula T $CD4^+$ en alérgenos de proteínas potenciales (Stickler et al., 2005; S.L. Morrison y J. Schlom, Important

Adv. Oncol. (1990), pp. 3–18; Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. y Winter, G. "Reshaping human antibodies for therapy." Nature (1988) 332: 323-327; Roguska-M-A, Pedersen-J-T, Henry-A-H, Searle-S-M, Roja-C-M, Avery-B, Hoffee-M, Cook-S, Lambert-J-M, Blättler-W-A, Rees-A-R, Guild-B-C. A comparison of two murine mAbs humanized by CDR-grafting y variable domain resurfacing. Protein engineering, {Protein-Eng}, 1996, vol. 9, p. 895-904; Kashmiri-Syed-V-S, De-Pascalis-Roberto, Gonzales-Noreen-R, Schlom-Jeffrey. SDR grafting--a new approach to antibody humanization. Methods (San Diego Calif.), {Methods}, May 2005, vol. 36, no. 1, p. 25-34; Desmet-Johan, Meersseman-Geert, Boutonnet-Nathalie, Pletinckx-Jurgen, De-Clercq-Krista, Debulpaep-Maja, Braeckman-Tessa, Lasters-Ignace. Anchor profiles of HLA-specific péptidos: analysis by a novel affinity scoring method y experimental validation. Proteins, 2005, vol. 58, p. 53-69; Stickler-M-M, Estell-D-A, Harding-F-A. CD4+ T-cell epítopo determination using unexposed human donor peripheral blood mononuclear cells. Journal of immunotherapy 2000, vol. 23, p. 654-60.)

B 7. Eficacia In vivo

Para generar una molécula de DVD-Ig con evicacia in vivo deseada, es importante generar y seleccionar mAbs con eficacia in vivo igualmente deseada cuando se dan en combinación. Sin embargo, en algunos casos la DVD-Ig puede mostrar eficacia in vivo que no puede ser lograda con la combinación de dos mAbs separados. Por ejemplo, una DVD-Ig puede acercar dos objetivos en proximidad conduciendo a una actividad que no puede ser lograda con la combinación de dos mAbs separados. Las funciones biológicas deseables adicionales se describen aquí en la sección **B3**. Los anticuerpos base con características deseables en la molécula de DVD-Ig se pueden seleccionar con base en factores tales como t ½ farmacocinética; distribución de tejido; objetivos solubles versus de superficie celular; y concentración del objetivo-soluble/densidad–superficie.

B 8. Distribución de tejido In vivo

Para generar una molécula de DVD-Ig con distribución de tejido in vivo deseada, en una realización, se deben seleccionar mAbs base con perfil de distribución de tejido in vivo similar deseada. Alternativamente, con base en el

mecanismo de la estrategia de marcado específico dual, esto puede algunas veces no requerirse para seleccionar mAbs base con la distribución de tejido in vivo similarmente deseada cuando se dan en combinación. Por ejemplo, en el caso de una DVD-Ig enla cual un componente de unión marca la DVD-Ig a un sitio expecífico trayendo así al segundo componente de unión al mismo sitio objetivo. Por ejemplo, una especificidad de unión de una DVD-Ig podría marcar el páncreas (células de islote) y la otra especificidad podría llevar GLP1 al páncreas para inducir insulina.

B 9. Isotipo:

Para generar una molécula de DVD-Ig con propiedades deseadas incluyendo, pero sin limitarse a, Isotipo, funciones efectoras y mida media circulante, en una realización, se seleccionan mAbs base con funciones efectoras Fc apropiadas dependiendo de la utilidad terapéutica y el punto final terapéutico deseado. Existen cino clases o isotipos de cadena pesada principal, algunos de los cuales tiene varios sub-tipos, y estos determinan las funciones efectoras de una molécula de anticuerpo. Estas funciones efectoras residen en la región bisagra, dominios CH2 y CH3 de la molécula de anticuerpo. Sin embargo, los residuos en otras partes de una molécula de anticuerpo también pueden tener efectos en las funciones efectoras. Las funciones efectoras Fc de la región bisagra incluyen: (i) citotoxicidad celulas dependiente de anticuerpo, (ii) unión de complemento (C1q), activación y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), (iii) fagocitosis/depuración de complejos antígeno-anticuerpo, y (iv) liberación de citoquina en algunos casos. Estas funciones efectoras Fc de una molécula de anticuerpo son mediadas a través de la interacción de la región Fc con un conjunto de receptores de superficie celular específicos de clase. Los anticuerpos del isotipo IgG1 son los más activos mientras que IgG2 e IgG4 tienen funciones efectoras mínimas o ninguna. Las funciones efectoras de los anticuerpos IgG están mediadas a través de interacciones con tres tipos de receptor Fc celular estructuralmente homólogos (y subtipos) (FcgR1, FcgRII y FcgRIII). Estas fuciones efectoras de una IgG1 pueden ser eliminadas mediante mutación de residuos de amino ácido específicos en la región de bisagra inferior (p.e.,L234A, L235A) que son requeridos para la unión de FcgR y C1q. Los residuos de amino ácido en la región Fc, en particular los dominios CH2-CH3, también determinan la vida media circulante de la molécula de anticuerpo. Esta función Fc está mediada a

través de la unión de la región Fc al receptor Fc neonatal (FcRn) el cual es responsable de reciclar las moléculas de anticuerpo de lisosomas ácidos de vuelta a la circulación general.

Si un mAb debe tener una actividad a un isotipo inactivo dependerá del punto final terapéutico deseado para un anticuerpo. Algunos ejemplos de uso de isotipos y resultado terapéutico deseado se listan a continuación:

a) Si el punto final deseado es neutralización funcional de una citoquina soluble, entonces se puede usar un isotipo inactivo;

b) Si el resultado deseado es depuración de una proteína patológica, se puede usar un isotipo activo;

c) Si el resultado deseado es depuración de agregados de proteína, se puede usar un isotipo activo;

d) Si el resultado deseado es antagonizar un receptor de superficie, se usa un isotipo inactivo (Tysabri, IgG4; OKT3, IgG1 mutada);

e) Si el resultado deseado es eliminar las células objetivo, se usa un isotipo activo (Herceptina, IgG1 (y con funciones efectoras potenciadas); y

f) Si el resultado deseado es limpiar proteínas de la circulación sin entrar al SNC, se puede usar un isotipo IgM (p.e., depuración de especies de péptido Ab circulante).

Las funciones efectoras de Fc de un mAb base pueden ser determinadas mediante varios métodos in vitro bien conocidos en la técnica.

Como se discutió, la selección del isotipo, y por ende, las funciones efectoras, dependerá del punto funal terapéutico deseado. En casos en donde se desea la simple neutralización de un objetivo circulante, por ejemplo el bloqueo de las interacciones receptor-ligando, las funciones efectoras pueden no requerirse. En tales casos, son deseables los isotipos o mutaciones en la región Fc de un anticuerpo que elimina las funciones efectoras. En otros casos, cuando la eliminación de células objetivo es el punto final terapéutico, por ejemplo, la eliminación de células de tumos, son deseables los isotipos o mutaciones o desfucosilación en la región Fc que potencia las funciones efectoras (Presta GL, Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656, 2006; Satoh M., Iida S., Shitara K. Expert Opinion Biol. Ther. 6:1161-1173, 2006). Igualmente,

dependiendo de la utilidad terapéutica, la vida media circulante de una molécula de anticuerpo puede ser reducida/prolongada modulando las interacciones anticuerpo-FcRn mediante la introducción de mutaciones específicas en la región Fc (Dall'Acqua WF, Kiener PA, Wu H. J. Biol. Chem. 281:23514-23524, 2006; Petkova SB., Akilesh S., Sproule TJ. et al. Internat. Immunol. 18:1759-1769, 2006; Vaccaro C., Bawdon R., Wanjie S et al. PNAS 103:18709-18714, 2007).

La información publicada sobre los diferentes residuos que pueden influir en las diferentes funciones efectoras de un mAb terapéutico normal, pueden necesitar ser confirmadas para la DVD-Ig. Puede ser posible que en un formato de DVD-Ig, residuos adicionales (diferentes) en la región Fc, diferentes a los identificados para la modulación de funciones efectoras del anticuerpo monoclonal, puedan ser importantes.

En general, la decisión en cuanto a cuales funciones efectoras Fc (isotipo) serán críticas en el formato de DVD-Ig final dependerá de la indicación de la enfermedad, objetivo terapéutico, punto final terapéutico deseado y consideraciones de seguridad. A continuación se listan regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera apropiadas, ejemplares incluyendo, pero sin limitarse a:

- IgG1 – alotipo: G1mz
- IgG1 mutante – A234, A235
- IgG2 – alotipo: G2m(n-)
- Kappa – Km3
- Lambda

Estudios de Receptor Fc y C1q: La posibilidad de la citotoxicidad mediada por célila dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotixicidad dependidente de complemento (CDC) indeseadas por el complejamiento del anticuerpo a cualquier objetivo sobreexpresado sobre membranas celulares puede quedar sin efecto mediante las mutaciones de región bisagra (por ejemplo, L234A, L235A). Se espera que estos amino ácidos sustituidos presentes en la región bisagra de IgG1 del mAb, produzcan unión disminuida del mAb a los receptores Fc humanos (pero no FcRn), porque se cree que la unión a FcgR ocurre dentro de los sitios de superposición sobre la región

bisagra de IgG1. Esta característica del mAb puede conducir a un perfil de seguridad mejorado solbre los anticuerpos que contienen una IgG tipo salvaje. La unión del mAb a los receptores Fc humanos puede ser determinadamediante experimentos de citometría de flujo usando líneas celulares (p.e.,THP-1, K562) y una línea celular CHO diseñada que expresa FcgRIIb (u otros FcgRs). Comparado con los anticuerpos monoclonales de control de IgG1, los mAb muestran unión reducida a FcgRI y FcgRIIa mientras que la unión a FcgRIIb no se afecta. La unión y activación de C1q por los complejos inmunes antígeno/IgG desencadena la cascada de complemento clásica con las consecuentes respuestas inflamatoria y/o inmunoreguladora. El sitio de unión a C1q en la IgGs ha sido localizado en los residuos dentro de la región bisagra de IgG. La unión a C1q a concentraciones en aumento de mAb fue evaluado mediante ELISA de C1q. Los resultados demuestran que el mAb no es capaz de unirse a C1q, como se espera cuando se compara con la unión de una IgG1 de control tipo salvaje. En general, la mutación de región bisagra L234A, L235A deroga la unión del mAb a FcgRI, FcgRIIa y C1q pero no afecta la interacción del mAb con FcgRIIb. Estos datos sugieren que in vivo, el mAb con Fc mutante interactuará normalmente con el FcgRIIb inhibidot, pero probablemente fallará para interactuar con la activación de los receptores de FcgRI y FcgRIIa o C1q.

Unión a FcRn Humano: El receptor neonatal (FcRn) es responsible de transportar la IgG a través de la placenta y controlar la vida media catabólica de las moléculas de IgG. Podría ser deseable aumentar la vida media terminal de un anticuerpo para mejorar la eficacia, reducir la dosis o frecuencia de administración, o mejorar la localización al objetivo. Alternativamente, podría ser ventajoso hacer lo inverso, esto es, disminuir la vida media terminal de un anticuerpo para reducir la exposición del cuerpo entero o mejorar las relaciones de unión a objetivo-no objetivo. El diseño de la interacción entre IgG y su receptor salvaje, FcRn, ofrece una forma de aumentar o disminuir la vida media terminal de la. Las proteínas en la circulación, incluyendo IgG, son recuperadas en la fase fluida mediante micropinocitosis por ciertas células, tales como las del endotelio vascular. La IgG se puede unir a FcRn en endosomas bajo condiciones ligeramente ácidas (pH 6.0–6.5) y puede reciclarse a la superficie celular, en donde es liberada bajo condiciones casi neutras (pH 7.0–7.4). El mapeop del sitio de unión de la región Fce n FcRn80, 16, 17 mostró que dos residuos de histidina que son conservados a lo largo de las especies, His310 y His435, son responsables de la dependiencia del pH de esta interacción.

Usando tecnología de despliegue del fago, se identificó una mutación de región Fc de ratón que aumenta la unión a FcRn y extiende la vida media de la IgG de ratón (ver Victor, G. et al.; Nature Biotechnology (1997), 15(7), 637-640). Las mutaciones de región Fc que aumentan la afinidad de unión de la IgG humana para FcRn a pH 6.0, pero no a pH 7.4, también han sido identificadas (ver Dall'Acqua William F, et al., Journal of Immunology (2002), 169(9), 5171-80). Más aún, en un caso, también se observó un aumento dependiente de pH similar en la unión (de hasta 27 veces) para FcRn de rhesus, y esto produjo un aumento de dos veces la vida media en suero en monos rhesus comparada con la IgG base (ver Hinton, Paul R. et al., Journal of Biological Chemistry (2004), 279(8), 6213-6216). Estos hallazgos indican que es posible prolongar la vida media en plasma de terapéuticos de anticuerpo diseñando la interacción de la región Fc con FcRn. Inversamente, las mutaciones de la región Fc que atenúan la interacción con FcRn pueden reducir la vida media del anticuerpo.

B.10 Farmacocinética (PK):

Para generar una molécula de DVD-Ig con perfil farmacocinético deseado, en una realización, se seleccionan mAbs base con perfil farmacocinético igualmente deseado. Una consideración es que la respuesta inmunogénica a los anticuerpos monoclonal (pe, HAHA, respuesta de anticuerpo anti-human humano; HACA, respuesta de anticuerpo anti-quimérico humano) complica más la farmacocinética de estos agentes terapéuticos. En una realización, se usan anticuerpos monoclonales con inmunogenicidad mínima o sin esta, para construir moléculas de DVD-Ig de forma que las DVD-Igs resultantes también tendrán inmunogenicidad mínima o no tendrán. Algunos de los factores que determinan la PK de un mAb incluyen, pero no se limitan a, propiedades intrínsecas de los mAb (secuencia de amino ácido VH); inmunogenicidad; unión a FcRn y funciones Fc.

El perfil PK de los anticuerpos monoclonales base seleccionados puede ser fácilmente determinado en roedores porque el perfil PK en roedores se correlaciona bien con (o predice de forma cercana) el perfil PK de anticuerpos monoclonales en monos cynomolgus y humanos. El perfil PK es determinado como se describe en la sección de Ejemplos 1.2.2.3.A.

Después que se seleccionan anticuerpos monoclonales base con características de PK deseadas (y otras propiedades funcionales deseadas discutidas aquí), se construye la DVD-Ig. Como las moléculas de DVD-Ig contienen dos dominios de unión a antígeno de dos anticuerpos monoclonales base, también se evaluan las propiedades PK de la DVD-Ig. Por lo tanto, mientras se determinan las propiedades PK de la DVD-Ig, se pueden emplear ensayos PK que determinan el perfil PK con base en la funcionalidad de ambos dominios de unión a antígeno derivados de 2 anticuerpos monoclonales base. El perfil PK de una DVD-Ig puede ser determinado como se describe en el Ejemplo 1.2.2.3.A. Factores adicionales que pueden afectar el perfil PK de la DVD-Ig incluyen la orientación del dominio de unión a antígeno (CDR); Tamaño del enlazante; e interacciones Fc/FcRn. Las características PK de los anticuerpos base pueden ser evaluados valorando los siguientes parámetros: absorción, distribución, metabolismo y excreción.

Absorción: A la fecha, la administración de anticuerpos monoclonales terapéuticos is por rutas parenterales (p.e., intravenosa [IV], subcutánea [SC], o intramuscular [IM]). La absorción de un mAb en la circulación sistémica después de administración SC o IM desde el espacio intersticial en principalmente a través de la ruta linfática. La degradación proteolítica, presistémica, saturable, puede producir biodisponibilidad absoluta variable después de la administración extravascular. Usualmente, aumentos en biodisponibilidad absoluta con dosis en aumento de anticuerpos monoclonales pueden ser observadas debido a la capacidad proteolítica saturada a mayores dosis. El proceso de absorción para un mAb es usualmente bastante lenta porque el fluido linfático se drena lentamente en el sistema vascular, y la duración de la absorción puede ocurrir durante varias horas a varios días. La biodisponibilidad absoluta de los anticuerpos monoclonales después de la administración SC varía generalmente de 50% a 100%.

Distribución: Después de la administración IV, los anticuerpos monoclonales siguen usualmente un perfil de tiempo a concentración en suero (o plasma) bifásico, que empieza con una rápida fase de distribución, seguida por una lenta fase de eliminación. En general, un modelo farmacocinético biexponencial es el que mejor describe esta clase de perfil farmacocinético. El volumen de distribución en el compartimiento central (Vc) para un mAb es

usualmente igual o ligeramente mayor que el volumen en plasma (2-3 litros). Un patrón bifásico distinto en perfil de concentración en suero (plasma) versus tiempo puede no ser obvio con otras rutas de administración parenterales, tales como IM o SC, porque la fase de distribución de la curva de tiempo a concentración en suero (plasma) está enmascarada por la porción de absorción larga. Muchos factores, incluyendo las propiedades fisicoquímicas, captación mediada por receptor específico de sitio y orientado al sitio, capacidad de unión de tejido, y dosis de mAb pueden influir en la biodistribución de un mAb. Algunos de estos factores pueden contribuir con la no linealidad de la biodistribución para un mAb.

Metabolismo y Excreción: Debido al tamaño molecular, los anticuerpos monoclonales intactos no se excretan en la orina mediante el riñón. Ellos son principalmente inactivados mediante el metabolismo (p.e., catabolismo). Para los anticuerpos monoclonales terapéuticos basados de IgG, las vidas mediad varían típicamente desde horas o 1-2 días a más de 20 días. La eliminación de un mAb puede estar afectada por muchos factores, incluyendo, pero sin limitarse a, afinidad para el receptor FcRn, inmunogenicidad del mAb, el grado de glicosilación del mAb, la susceptibilidad para el mAb a proteólisis, y la eliminación mediada por receptor.

B.11 Patrón de reactividad cruzada en tejido en especies humanas y tox:

El patrón de tinción idéntico sugiere que se puede evaluar la toxicidad humana potencial en especies tox. Las especies tox son aquellos animales en los cuales se estudia la toxicidad no relacionada.

Los anticuerpos individuales son seleccionados para cumplir dos criterios. (1) Tinción de tejido adecuada para la expresión conocida del objetivo del anticuerpo. (2) Patrón de tinción similar entre los tejidos de las especies humana y tox del mismo órgano.

Criterio 1: Las inmunizaciones y/o selecciones de anticuerpo emplean típicamente antígenos recombinantes o sintetizados (proteínas, carbohdratos u

otras moléculas). La unión a la contraparte natural y la selección contra antígenos no relacionados son a menudo parte del embido de selección para anticuerpos terapéuticos. Sin embargo, la selección contra una multitud de antígenos es a menudo poco práctica. Por lo tanto, los estudios de reactividad cruzada en tejidos humanos de todos los órganos importantes sirven para regular la unión no deseada del anticuerpo a cualquier antígeno no relacionado.

Criterio 2: Los estudios de reactividad cruzada en tejido comparativos con tejidos de especies humana y tox (monos cynomolgus, perro, posiblemente roedores y otros, los mismos 36 o 37 tejidos están siendo evaluados como en el estudio humano) ayudan a validad la selección de una especie tox. En los estudios de reactividad cruzada en tejido típicos sobre secciones de tejidos congeladas, los anticuerpos terapéuticos pueden demostrar la unión esperada al antígeno conocido y/o en un menor grado, la unión a tejidos basados ya sea en interacciones de bajo nivel (unión no específica, unión de bajo nivel a antígenos similares, interacciones basadas en carga de bajo nivel etc.). En cualquier caso, la especie animal de toxicología más relevante es aquella con el mayor grado de coincidencia de unión al tejido humano y animal.

Los estudios de reactividad cruzada en tejido siguen las guías reguladoras apropiadas incluyendo la Guía III/5271/94 EC CPMP "Producción y control de calidad de mAbs" y la 1997 US FDA/CBER "Puntos a considerar en la Fabricación y Prueba de productos de Anticuerpo Monoclonal para Uso humano". Las criosecciones (5 µm) de tejidos humanos obtenidos en autopsia o biopsia fueron fijados y secados en portaobjetos. Se realizó la tinción con peroxidasa de secciones de tejido, usando el sistema avidina-biotina. La Guía de FDA "*Points to Consider in the Manufacture y Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use*". Referencias relevantes incluyen Clarke J 2004, Boon L. 2002a, Boon L 2002b, Ryan A 1999.

Los estudios de reactividad cruzada en tejido se hacen a menudo en dos etapas, incluyendo la primera etapa criosecciones de 32 tejidos (típicamente: Glándula Adrenal, Tracto Gastrointestinal, Proótata, Vejoga, Corazón, Músculo Esquelético, Células Sanguíneas, Riñón, Piel, Médula Osea, Hígado, Médula Espinal, Seno, Pulmón, Bazo, Cerebelo, Ganglio linfático, Testículos, Corteza

Cerebral, Ovario, Timo, Colon, Páncreas, Tiroide, Endotelio, Paratiroide, Uréter, Ojo, Pituitario, Útero, Trompa de Falopio y Placenta) de un donante humano. En la seunga fase se realiza un estudio de reactividad cruzada completo con hasta 38 tejidos (incluyendo adrenal, sangre, vaso sanguíneo, médula ósea, cerebelo, cerebro, cérvix, esófago, ojo, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, ganglio linfático, glándula mamaria del seno, ovario, oviducto, páncreas, paratiroide, nervio periférico, pituitario, placenta, próstata, glándula salivar, piel, intestino delgado, médula espinal, bazo, estómago, músculo estriado, testículos, timo, tiroide, amígdala, uréter, vejiga urinaria, y útero) de 3 adultos no relacionados. Los estudios se hacen típicamente a dos niveles de dosis como mínimo.

El anticuerpo terapéutico (p.e. artículo de prueba) y el anticuerpo de control de isotipo coincidente pueden ser biotinilados para detección del complejo avidina-biotina (ABC); otros métodos de detección pueden incluir detección de anticuerpo terciario para un artículo de prueba marcado con FITC (u otro), o precompletar con una IgG anti-humana marcada para un artículo de prueba no marcado.

Brevemente, las criosecciones (de aproximadamente 5 µm) de tejidos humanos obtenidas en autopsia o biopsia son fijadas y secadas en portaobjetos. La tinción con peroxidasa de las secciones de tejido se realiza usando el sistema avidina-biotina. Primero (en caso de un sistema de detección precomplejante), el artículo de prueba es incubado con la IgG anti-humana biotinilada secundaria y desarrollado en el complejo inmune. El complejo inmune a la concentración final de 2 y 10 µg/mL de artículo de prueba, es agregado sobre secciones de tejido en portaobjetos y luego las secciones de tejido reaccionaron por 30 minutos con un kit de avidina-biotina-peroxidasa. Posteriormente, se aplicó DAB (3,3'-diaminobencidina), un sustrato para la reacción de peroxidasa, por 4 minutos para la tinción de tejido. Se usan perlas de Antígeno-Sefarosa como secciones de tejido de control positivo.

Cualquier tinción es juzgada como esperada (p.e., consistente con la expresión de antígeno) o reactividad inesperada con base en la expresión

conocida del antígeno objetivo en cuestión. Cualquier tinción juzgada específica se le da un puntaje para intensidad y frecuencia. Los estudios de competencia o bloqueo de antígeno o suero pueden ayudar adicionalmente a determinar si la tinción observada es específica o no específica.

Si se encuentra que dos anticuerpos seleccionados cumplen los criterior de selección– tinción de tejido apropiada, coincidencia de tinción entre tejido específico humano y de animal de toxicología– pueden ser seleccionados para la generación de la DVD-Ig.

El estudio de reactividad cruzada en tejido debe ser repetido con el constructo de DVD-Ig final, pero aunque estos estudios siguen el mismo protocolo aquí indicado, son más complejos de evaluar porque cualquier unión puede provenir de cualquiera de los dos anticuerpos base, y cualquier unión no explicada debe ser confirmada con estudios de competencia de antígeno complejos.

Será fácilmente obvio que la realización compleja de estudios de reactividad cruzada en tejido con una molécula multiespecífica como una DVD-Ig es simplificada en gran medida si los dos anticuerpos base son seleccionados para (1) carecer de hallazgos de reactividad cruzada en tejido inesperada y (2) similitud apropiada de hallazgos de reactividad cruzada en tejido entre los tejidos de las especies humana y de animal de toxicología correspondientes.

B.12 Especificidad y selectividad:

Para generar una molécula de DVD-Ig con la especificidad y selectividad deseadas, se necesita generar y seleccionar mAbs base con el perfil de especificidad y selectividad igualmente deseado.

Los estudios de unión para especificidad y selectividad con una DVD-Ig pueden ser complejos debido a los cuatro o más sitios de unión, dos cada uno para cada antígeno. Brevemente, los estudios de unión usando ELISA, BIAcore, KinExA u otros estudios de interacción con una DVD-Ig deben

monitorear la unión de uno, dos o más antígenos a la molécula de DVD-Ig. Aunque la tecnología de BIAcore puede resolver la unión independiente secuencia de múltiples antígenos, métodos más tradicionales, incluyendo ELISA o técnicas más modernas como KinExA no pueden. Por lo tanto, la caracterización cuidadosa de cada anticuerpo base es crítica. Después qye cada anticuerpo individual ha sido caracterizado para especificidad, la confirmación de retención de especificidad de los sitios de unión individuales en la molécula de DVD-Ig se simplifica en gran medida.

Es bastante obvio que el complejo que se somete a la determinación de especificidad de una DVD-Ig se simplifica en gran medida si los dos anticuerpos base son seleccionados para especificidad antes de ser combinados en una DVD-Ig.

Los estudios de interacción antígeno–anticuerpo pueden formar muchas formas, incluyendo muchos estudios de interacción proteína proteína clásicos, incluyendo ELISA (asayo inmunosorbente ligado a enzima), espectrometría de masas, entrecruzamiento químico, SEC con dispersión de luz, diálisis en equilibrio, permeación de gel, ultrafiltración, cromatografía de gel, SEC analítica de gran zona, ultracentrifugación micropreparativa (equilibrio de sedimentación), métodos espectroscópicos, microcalorimetría de titración, equilibrio de sedimentación (en ultracentrífuga analítica), velocidad de sedimentación (en centrífuga analítica), resonancia de plasmón superficial (incluyendo BIAcore). Referencias relevantes incluyen "Current Protocols in Protein Science", John E. Coligan, Ben M. Dunn, David W. Speicher, Paul T, Wingfield (eds.) Volumen 3, capítulos 19 y 20, publicada por John Wiley & Sons Inc., y referencias allí incluidas y "Current Protocols in Immunology", John E. Coligan, Barbara E. Bierer, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (eds.) publicada por John Wiley & Sons Inc y referencias relevantes allí incluidas.

Liberación de Citoquina en Sangre Entera: La interacción del mAb con células sanguíneas humanas puede ser investigada mediante un ensayo de liberación de citoquina (Wing, M. G. Therapeutic Immunology (1995), 2(4), 183-190; "Current Protocols in Pharmacology", S.J. Enna, Michael Williams, John W. Ferkany, Terry Kenakin, Paul Moser, (eds.) publicado por John Wiley

& Sons Inc; Madhusudan, S. Clinical Cancer Research (2004), 10(19), 6528-6534; Cox, J. Methods (2006), 38(4), 274-282; Choi, I. European Journal of Immunology (2001), 31(1), 94-106). Brevemente, varias concentraciones de mAb son incubadas con sangre entera humana por 24 horas. La concentración evaluada debe cubrir un amplio rango incluyendo concentraciones finales que imitan los niveles en sangre típicos en pacientes (incluyendo, pero sin limitarse a 100 ng/ml – 100 μg/ml). Después de la incubación, los sobrenadantes y los lisados de célula fueron analizados para la presencia de IL-1Rα, TNF-α, IL-1b, IL-6 e IL-8. Los perfiles de concentración de citoquina generados para el mAb fueron comparados con perfiles producidos por un control de IgG humana negativa y un control de LPS o PHA positivo. El perfil de citoquina mostrado por el mAb tanto de los sobrenadantes de célula como lisados de célula fue comparable con la IgG humana de control. En una realización, el anticuerpo monoclonal no interactúa con las células de sangre humanas para liberar espontáneamente citoquinas inflamatorias.

Los estudios de liberación de citoquina para un complejo DVD-Ig son complejos debido a los cuatro o más sitios de unión, dos de cada uno para cada antígeno. Brevemente, los estudios de liberación de citoquina aquí descritos miden el efecto de la molécula de DVD-Ig entera en la sangre entera u otros sistemas celulares, pero puede resolver cual porción de la molécula provoca la liberación de citoquina. Una vez detectada la liberación de citoquina, la pureza de la preparación de DVD-Ig debe ser determinada, porque algunos componentes celulares co-purificadores pueden causar la liberación de citoquina por ellos mismos. Si la pureza no es el asunto, se pueden necesitar del empleo de fragmentación de la DVD-Ig (incluyendo, pero sin limitarse a remoción de la porción Fc, separación de sitios de unión, etc.), mutagénesis del sitio de unión y otros métodos para deconvolucionar cualquier observación. Será obvio que este complejo que se somete es en gran medida simplificado si los dos anticuerpos base son seleccionados para carecer de liberación de citoquina antes de ser combinados en una DVD-Ig.

B.13 reactividad cruzada con otras especies para estudios toxicológicos:

En una realización, los anticuerpos individuales seleccionados con suficiente reactividad cruzada para especies tox apropiadas, por ejemplo, mono cynomolgus. Los anticuerpos base necesitan unirse a objetivos de especies ortólogos (p.e. mono cynomolgus) y producir respuesta apropiada (modulación, neutralización, activación). En una realización, la reactividad cruzada (afinidad/potencia) a objetivos de especies ortólogas debe estar entre 10 veces el objetivo humano. En la práctica, los anticuerpos base son evaluados para múltiples especies, incluyendo ratón, rata, perro, mono (y tros primates no humanos), así como especies de modelo de enfermedad (p.e., oveja para modelo de asma). La reactividad cruzada aceptable a especies tox de los anticuerpos monoclonales base permite estudios de toxicología futuros de DVD-Ig-Ig en la misma especie. Por esta razón, los dos anticuerpos monoclonales base deben tener reactividad cruzada aceptable para una especie tox común, permitiendo por ende estudios de toxicología de la DVD-Ig en la misma especie.

Los mAbs base pueden ser seleccionados de varios mAbs capaces de unirse a objetivos específicos y bien conocidos enla técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a anticuerpo anti-TNF (Patente US No. 6,258,562), anticuerpo anti-IL-12 y/o anti-IL-12p40 (Patente US No. 6,914,128); anticuerpo anti-IL-18 (US 2005/0147610 A1), anti-C5, anti-CBL, anti-CD147, anti-gp120, anti-VLA-4, anti-CD11a, anti-CD18, anti-VEGF, anti-CD40L, anti CD-40 (p.e., ver WO2007124299) anti-Id, anti-ICAM-1, anti-CXCL13, anti-CD2, anti-EGFR, anti-TGF-beta 2, anti-HGF, anti-cMet, anti DLL-4, anti-NPR1, anti-PLGF, anti-ErbB3, anti-E-selectina, anti-Fact VII, anti-Her2/neu, anti-F gp, anti-CD11/18, anti-CD14, anti-ICAM-3, anti-RON, anti CD-19, anti-CD80 (p.e., ver WO2003039486, anti-CD4, anti-CD3, anti-CD23, anti-beta2-integrina, anti-alfa4beta7, anti-CD52, anti-HLA DR, anti-CD22 (p.e., ver Patente US NO: 5,789,554), anti-CD20, anti-MIF, anti-CD64 (FcR), anti-TCR alfa beta, anti-CD2, anti-Hep B, anti-CA 125, anti-EpCAM, anti-gp120, anti-CMV, anti-gpIIbIIIa, anti-IgE, anti-CD25, anti-CD33, anti-HLA, anti-IGF1,2, anti IGFR, anti-VNRintegrina, anti-IL-1alfa, anti-IL-1beta, anti-receptor IL-1, anti-receptor IL-2, anti-IL-4, anti-receptor IL-4, anti-IL5, anti-receptor IL-5, anti-IL-6, anti-IL-8, anti-IL-9, anti-IL-13, anti-receptor IL-13, anti-IL-17, y anti-IL-23 (ver Presta LG. 2005 Selection, design, y engineering of therapeutic antibodies J Allergy Clin Immunol. 116:731-6 y http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/anticuerpos.html).

Los mAbs base también pueden ser seleccionados a partir de varios anticuerpos terapéuticos aprobados para uso en ensayosclínicos, o en desarrollo para uso clínico. Tales anticuerpos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, rituximab (Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche) (ver por ejemplo Pat. U.S. No. 5,736,137), un anticuerpo anti-CD20 quimérico aprobado para tratar lintoma diferente de Hodgkin; HuMax-CD20, un anti-CD20 actualmente en desarrollo por Genmab, un anticuerpo anti-CD20 descrito en la Pat. U.S. No. 5,500,362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel), y PRO70769 (PCT/US2003/040426, titulado "Immunoglobulin Variants and Uses Thereof"), trastuzumab (Herceptin®, Genentech) (ver por ejemplo Pat. U.S. No. 5,677,171), un anticuerpo anti-Her2/neu humanizado aprovado para tratar cáncer de seno; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg®), actualmente en desarrollo por Genentech; un antcuerpo anti-Her2 descrito en la Pat. U.S. No. 4,753,894; cetuximab (Erbitux®, Imclone) (Pat U.S. No. 4,943,533; PCT WO 96/40210), un anticuerpo anti-EGFR quimérico en ensayos clínicos para una variedad de cánceres; ABX-EGF (Pat. U.S. No. 6,235,883), actualmente en desarrollo por Abgenix-Immunex-Amgen; HuMax- EGFr (U.S. Ser. No. 10/172,317), actualmente en desarrollo por Genmab; 425, EMD55900, EMD62000, y EMD72000 (Merck KGaA) (Pat. U.S. No. 5,558,864; Murthy et al. 1987, Arch Biochem Biophys. 252(2):549-60; Rodeck et al., 1987, J Cell Biochem. 35(4):315-20; Kettleborough et al., 1991, Protein Eng. 4(7):773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (PCT WO 95/20045; Modjtahedi et al., 1993, J. Cell Biophys. 1993, 22(1-3):129-46; Modjtahedi et al., 1993, Br J Cancer. 1993, 67(2):247-53; Modjtahedi et al, 1996, Br J Cancer, 73(2):228-35; Modjtahedi et al, 2003, Int J Cancer, 105(2):273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canada y Centro de Immunologia Molecular, Cuba (Pat. U.S. No. 5,891,996; Pat. U.S. No. 6,506, 883; Mateo et al, 1997, Immunotechnology, 3(1):71-81); mAb-806 (Ludwig Institue for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci USA. 100(2):639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (PCT WO 0162931A2); y SC100 (Scancell) (PCT WO 01/88138); alemtuzumab (Campath®, Millenium), un mAb humanizado actualmente aprobado para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de célula B; muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por Ortho Biotech/Johnson & Johnson, ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), un anticuerpo anti-CD20 desarrollado por IDEC/Schering AG, gemtuzumab ozogamicin

(Mylotarg®), un anticuerpo anti-CD33 (proteína p67) desarrollado por Celltech/Wyeth, alefacept (Amevive®), una fusión anti-LFA-3 Fc desarrollada por Biogen), abciximab (ReoPro®), desarrolado por Centocor/Lilly, basiliximab (Simulect®), desarrollado por Novartis, palivizumab (Synagis®), desarrollado por Medimmune, infliximab (Remicade®), un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Centocor, adalimumab (Humira®), un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Abbott, Humicade®, un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Celltech, golimumab (CNTO-148), un anticuerpo TNF totalmente humano desarrollado por Centocor, etanercept (Enbrel®), una fusión TNF p75 receptor Fc desarrollada por Immunex/Amgen, lenercept, una fusión p55TNF receptor Fc desarrollada previamente por Roche, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD147 en desarrollo por Abgenix, ABX-IL8, un anticuerpo anti-IL8 en desarrollo por Abgenix, ABX-MA1, un anticuerpo anti-MUC18 en desarrollo por Abgenix, Pemtumomab (R1549, 90Y-muHMFG1), un anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, Therex (R1550), un anticuerpo anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, AngioMab (AS1405), en desarrollo por Antisoma, HuBC-1, en desarrollo por Antisoma, Tioplatino (AS1407) en desarrollo por Antisoma, Antegren® (natalizumab), un anticuerpo anti-alfa-4-beta-1 (VLA-4) y alfa-4-beta-7 en desarrollo por Biogen, mAb VLA-1, un anticuerpo de integrina anti-VLA-1 en desarrollo por Biogen, mAb LTBR, un anticuerpo anti-receptor beta de linfotoxina (LTBR) en desarrollo por Biogen, CAT-152, un anticuerpo anti-TGF-β2 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology, ABT 874 (J695), un anticuerpo anti-IL-12 p40 en desarrollo por Abbott, CAT-192, un anticuerpo anti-TGFβ1 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology y Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxina1 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B® un anticuerpo anti-Blys en desarrollo por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences Inc., TRAIL-R1mAb, un anticuerpo anti-TRAIL-R1 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences, Inc. , Avastin® bevacizumab, rhuMAb-VEGF), un anticuerpo anti-VEGF en desarrollo por Genentech, un anticuerpo anti-familia del receptor HER en desarrollo por Genentech, Anti-Tissue Factor (ATF), un anticuerpo anti-Factor de Tejido en desarrollo por Genentech, Xolair® (Omalizumab), un anticuerpo anti-IgE en desarrollo por Genentech, Raptiva® (Efalizumab), un anticuerpo anti-CD11a en desarrollo por Genentech y Xoma, Anticuerpo MLN-02 (inicialmente LDP-02), en desarrollo por Genentech y Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, un anticuerpo anti-CD4 en desarrollo por Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo

anti-IL15 en desarrollo por Genmab y Amgen, HuMax-Inflam, en desarrollo por Genmab y Medarex, HuMax-Cancer, un anticuerpo anti-Heparanasa I en desarrollo por Genmab y Medarex y Oxford GcoSciences, HuMax-Linfoam, en desarrollo por Genmab y Amgen, HuMax-TAC, en desarrollo por Genmab, IDEC-131, y anticuerpo anti-CD40L en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (Clenoliximab), un anticuerpo anti-CD4 en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, un anticuerpo anti-CD80 en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, un anticuerpo anti-CD23 en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos anti-factor de migración de macrófago (MIF) en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, BEC2, un anticuerpo anti-idiotípico en desarrollo por Imclone, IMC-1C11, un anticuerpo anti-KDR en desarrollo por Imclone, DC101, un anticuerpo anti-flk-1 en desarrollo por Imclone, anticuerpos anti-VE cadherina en desarrollo por Imclone, CEA-Cide® (labetuzumab), un anticuerpo anti-antígeno carcinoembriónico (CEA) en desarrollo por Immunomedics, LymphoCide® (Epratuzumab), un anticuerpo anti-CD22 en desarrollo por Immunomedics, AFP-Cide, en desarrollo por Immunomedics, Myelomacide, en desarrollo por Immunomedics, LkoCide, en desarrollo por Immunomedics, Prostacide, en desarrollo por Immunomedics, MDX-010, un anticuerpo anti-CTLA4 en desarrollo por Medarex, MDX-060, un anticuerpo anti-CD30 en desarrollo por Medarex, MDX-070 en desarrollo por Medarex, MDX-018 en desarrollo por Medarex, Osidem® (IDM-1), y anticuerpo anti-Her2 en desarrollo por Medarex e Immuno-Designed Molecules, HuMax®-CD4, un anticuerpo anti-CD4 en desarrollo por Medarex y Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 en desarrollo por Medarex y Genmab, CNTO 148, un anticuerpo anti-TNFα en desarrollo por Medarex y Centocor/J&J, CNTO 1275, un anticuerpo anti-citoquina en desarrollo por Centocor/J&J, MOR101 y MOR102, anticuerpos anti-molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1) (CD54) en desarrollo por MorphoSys, MOR201, un anticuerpo anti-receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblasto (FGFR-3) en desarrollo por MorphoSys, Nuvion® (visilizumab), un anticuerpo anti-CD3 en desarrollo por Protein Design Labs, HuZAF®, un anticuerpo anti-gama interferon en desarrollo por Protein Design Labs, Anti-α 5β1 Integrina, en desarrollo por Protein Design Labs, anti-IL-12, en desarrollo por Protein Design Labs, ING-1, un anticuerpo anti-Ep-CAM en desarrollo por Xoma, Xolair® (Omalizumab), un anticuerpo anti-IgE humanizado desarrollado por Genentech y Novartis, y MLN01, un anticuerpo anti-integrina Beta2 en desarrollo por Xoma, todas las referencias aquí citadas en este párrafo están expresamente incorporadas

aquí mediante referencia. En otra realización, los terapéuticos incluyen KRN330 (Kirin); anticuerpo huA33 (A33, Ludwig Institute for Cancer Research); CNTO 95 (alfa V integrinas, Centocor); MEDI-522 (alfa Vβ3 integrina, Medimmune); volociximab (alfa Vβ1 integrina, Biogen/PDL); mAb 216 humano (epítopo glicosilado de célula B, NCI); BiTE MT103 (CD19 x CD3 biespecífico, Medimmune); 4G7xH22 (célulaBxFcgammaR1 biespecífico, Medarex/Merck KGa); rM28 (CD28 x MAPG biespecífico, Patente US No. EP1444268); MDX447 (EMD 82633) (CD64 x EGFR biespecífico, Medarex); Catumaxomab (removab) (EpCAM x anti-CD3 biespecífico, Trion/Fres); Ertumaxomab (HER2/CD3 biespecífico, Fresenius Biotech); oregovomab (OvaRex) (CA-125, ViRexx); Rencarex® (WX G250) (anhidrasa carbónica IX, Wilex); CNTO 888 (CCL2, Centocor); TRC105 (CD105 (endoglin), Tracon); BMS-663513 (agonista CD137, Brystol Myers Squibb); MDX-1342 (CD19, Medarex); Siplizumab (MEDI-507) (CD2, Medimmune); Ofatumumab (Humax-CD20) (CD20, Genmab); Rituximab (Rituxan) (CD20, Genentech); veltuzumab (hA20) (CD20, Immunomedics); Epratuzumab (CD22, Amgen); lumiliximab (IDEC 152) (CD23, Biogen); muromonab-CD3 (CD3, Ortho); HuM291 (CD3 receptor fc, PDL Biopharma); HeFi-1, CD30, NCI); MDX-060 (CD30, Medarex); MDX-1401 (CD30, Medarex); SGN-30 (CD30, Seattle Genentics); SGN-33 (Lintuzumab) (CD33, Seattle Genentics); Zanolimumab (HuMax-CD4) (CD4, Genmab); HCD122 (CD40, Novartis); SGN-40 (CD40, Seattle Genentics); Campath1h (Alemtuzumab) (CD52, Genzyme); MDX-1411 (CD70, Medarex); hLL1 (EPB-1) (CD74.38, Immunomedics); Galiximab (IDEC-144) (CD80, Biogen); MT293 (TRC093/D93) (colágeno clivado, Tracon); HuLuc63 (CS1, PDL Pharma); ipilimumab (MDX-010) (CTLA4, Brystol Myers Squibb); Tremelimumab (Ticilimumab, CP-675,2) (CTLA4, Pfizer); HGS-ETR1 (Mapatumumab) (agonista DR4 TRAIL-R1, Human Genome Science /Glaxo Smith Kline); AMG-655 (DR5, Amgen); Apomab (DR5, Genentech); CS-1008 (DR5, Daiichi Sankyo); HGS-ETR2 (lexatumumab) (agonista DR5 TRAIL-R2, HGS); Cetuximab (Erbitux) (EGFR, Imclone); IMC-11F8, (EGFR, Imclone); Nimotuzumab (EGFR, YM Bio); Panitumumab (Vectabix) (EGFR, Amgen); Zalutumumab (HuMaxEGFr) (EGFR, Genmab); CDX-110 (EGFRvIII, AVANT Immunotherapeutics); adecatumumab (MT201) (Epcam , Merck); edrecolomab (Panorex, 17-1A) (Epcam, Glaxo/Centocor); MORAb-003 (folato receptor a, Morphotech); KW-2871 (gangliosida GD3, Kyowa); MORAb-009 (GP-9, Morphotech); CDX-1307 (MDX-1307) (hCGb, Celldex); Trastuzumab (Herceptina) (HER2, Celldex); Pertuzumab (rhuMAb 2C4) (HER2 (DI),

Genentech); apolizumab (HLA-cadena beta DR, PDL Pharma); AMG-479 (IGF-1R, Amgen); anti-IGF-1R R1507 (IGF1-R, Roche); CP 751871 (IGF1-R, Pfizer); IMC-A12 (IGF1-R, Imclone); BIIB022 (IGF-1R , Biogen); Mik-beta-1 (IL-2Rb (CD122), Hoffman LaRoche); CNTO 328 (IL6, Centocor); Anti-KIR (1-7F9) (receptor del tipo Ig de célula asesina (KIR), Novo); Hu3S193 (Lewis (y), Wyeth, Ludwig Institute of Cancer Research); hCBE-11 (LTßR, Biogen); HuHMFG1 (MUC1, Antisoma/NCI); RAV12 (epítopo de carbohidrato enlazado a N, Raven); CAL (proteína relacionada con la hormona paratiroide (PTH-rP), University of California); CT-011 (PD1, CureTech); MDX-1106 (ono-4538) (PD1, Medarex/Ono); MAb CT-011 (PD1, Curetech); IMC-3G3 (PDGFRa, Imclone); bavituximab (fosfatidilserina, Peregrine); huJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); muJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); GC1008 (TGFb (pan) inhibdtor (IgG4), Genzyme); Infliximab (Remicade) (TNFa, Centocor); A27.15 (receptor de transferrina, Salk Institute, INSERN WO 2005/111082); E2.3 (receptor de transferrina, Salk Institute); Bevacizumab (Avastin) (VEGF, Genentech); HuMV833 (VEGF, Tsukuba Research Lab-WO/2000/034337, University of Texas); IMC-18F1 (VEGFR1, Imclone); IMC-1121 (VEGFR2, Imclone).

B. Construcción de moléculas de DVD:

La molécula de inmunoglobulina de dominio variable dual (DVD-Ig) está diseñada de forma que dos dominios variables de cadena ligera (VL) diferentes de los dos anticuerpos monoclonales base diferentes están enlazadas en tandem directamente o mediante un enlazante corto mediante técnicas de ADN recombinantes, seguidas por el dominio constante de cadena ligera. Igualmente, la cadena pesada comprende dos dominios variables de cadena pesada (VH) diferentes enlazados en tandem, seguidos por el dominio constante CH1 y la región Fc **(Fig.1A)**.

Los dominios variables pueden ser obtenidos usando técnicas de ADN recombinantes de un anticuerpo base generado por uno cualquiera de los métodos aquí descritos. En una realización, el dominio variable es un dominio variable de cadena pesada o ligera murino. En otra realización, el dominio variable es un dominio de cadena pesada ligera variable de CDR injertada o

humanizada. En una realización, el dominio variable es un dominio variable de cadena pesada o ligera humana.

En una realización, el primer y segundo dominios variables están enalzados directamente entre sí usando técnicas de ADN recombinantes. En otra realización, los dominios variables están enlazados mediante una secuencia enlazante. En una realización, dos dominios variables están enlazados. Tres o más dominios variables pueden también estar enlazados directamente o mediante una secuencia enlazante. Los dominios variables se pueden unir al mismo antígeno o se pueden unir a diferentes antígenos. Las moléculas DVD de la invención pueden incluir un dominio variable de inmunoglobulina y un dominio variable diferente a inmunoglobulina tal como un dominio de unión a ligando de un receptor, domino activo de una enzima. Las moléculas de DVD también pueden comprender 2 o más dominios diferentes a Ig.

La secuencia enlazante puede ser un solo amino ácido o una secuencia de polipéptido. En una realización, las sencuencias enlazantes son seleccionadas del grupo que consiste de AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 4); SAKTTP (SEQ ID NO: 5); RADAAP (SEQ ID NO: 6); RADAAPTVS (SEQ ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEQ ID NO: 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 10); ADAAP (SEQ ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 12); TVAAP (SEQ ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 14); QPKAAP (SEQ ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 16); AKTTPP (SEQ ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 18); AKTTAP (SEQ ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 20); ASTKGP (SEQ ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 26). La elección de las secuencias enlazantes se basa en el análisis de estructura de cristal de varias moléculas Fab. Existe una unión flexible natural entre el dominio variable y la región constante CH1/CL en la estrucrtura molecular de Fab o anticuerpo. Esta unión natural comprende aproximadamente 10-12 residuos de amino ácido, contribuidos por 4-6 residuos del C terminal del dominio V y 4-6 residuos del N

terminal del dominio CL/CH1. Las Igs DVD de la invención fueron generadas usando 5-6 residuos de amino ácido N terminales, o 11-12 residuos de amino ácido, de CL o CH1 como enlazante en la cadena ligera y cadena pesada de DVD-Ig, respectivamente. Los residuos N terminales de los dominios CL o CH1, particularmente los primeros 5-6 residuos de amino ácido, adoptan una conformación de asa sin estructuras secundarias fuertes, por lo tanto, pueden actual como enlazantes flexibles entre los dos dominios variables. Los residuos N terminales de los dominios CL o CH1 son extensión natural de los dominios variables, porque son parte de las secuencias de Ig, por lo tanto, minimizan en gran medida cualquier inmunogenicidad que surga potencialmente de los enlazantes y las uniones.

Otras secuencias enlazantes pueden incluir cualquier secuencia de cualquier longitud del dominio CL/CH1 pero no todos los residuos del dominio CL/CH1; por ejemplo, los primeros 5-12 residuos de amino ácido de los dominios CL/CH1; los enlazantes de cadena ligera pueden ser de Cκ o Cλ; y los enlazantes de cadena pesada pueden ser derivados de CH1 de cualquiera de los isotipos, incluyendo Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cα1, Cα2, Cδ, Cε, y Cμ. Las secuencias enlazantes pueden también ser derivadas de otras proteínas tales como proteínas del tipo Ig, (p.e., TCR, FcR, KIR); secuencias basadas en G/S (p.e., repeticiones G4S); secuencias derivadas de la región bisagra; y otras secuencias naturales de otras proteínas.

En una realización, un dominio constante está enlazado a dos dominios variables enlazados usando técnicas de ADN recombinante. En una realización, la secuencia que comprende los dominios variables de cadena pesada enlazados está enlazada a un dominio constante de cadena pesada y la secuencia que comprende los dominios variables de cadena ligera enlazados está enlazada a un dominio constante de cadena ligera. En una realización, los dominios constantes son dominio constante de cadena pesada humana y dominio constante de cadena ligera humana, respectivamente. En una realización, la cadena pesada de DVD está además unida a una región Fc. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa, o una región Fc variante. En otra realización, la región Fc es una región Fc humana. En otra realización, la región Fc incluye región Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, o IgD.

En otra realización, dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena ligera son combinados para formar una molécula de DVD-Ig. La Tabla 2 lista las secuencias de amino ácido de las regiones VH y VL de anticuerpos ejemplares para objetivos útiles para el tratamiento de enfermedad, p.e., para tratamiento del cáncer. En una realización, la inveción provee una DVD que comprende al menos dos de las regiones VH y/o VL listadas en la Tabla 2, en cualquier orientación.

Tabla 2: Lista de Secuencias de Amino Ácido de las regiones VH y VL de los Anticuerpos para Generar DVD-Igs

SEQ ID No.	ID única ABT	Región de Proteína	Secuencia 12345678901234567890123456789012345678900
27	AB001VH	VH CD20	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA
28	AB001VL	VL CD20	QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGS GTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGG GTKLEIKR
29	AB002VH	VH CD3 (seq. 1)	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRY TMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKF KDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
30	AB002VL	VL CD3 (seq. 1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMN WYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSG SGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFG SGTKLEINR
31	AB003VH	VH EGFR (seq. 1)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGD YYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLK SRLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDR VTGAFDIWGQGTMVTVSS
32	AB003VL	VL EGFR (seq. 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGG TKVEIKR
33	AB004VH	VH HER2 (seq. 1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTY IHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
34	AB004VL	VL HER2 (seq. 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAV AWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSR SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQ GTKVEIKR

SEQ ID No.	ID única ABT	Región de Proteína	Secuencia 12345678901234567890123456789012345678900
35	AB005VH	VH RON (seq. 1)	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR FSGWPNNYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
36	AB005VL	VL RON (seq. 1)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSN GFNYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQ TPPWTFGQGTKVEIRR
37	AB006VH	VH CD-19	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSY WMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGK FKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFC ARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSVTVSS
38	AB006VL	VL CD-19	DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSG SGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWT FGGGTKLEIKR
39	AB007VH	VH CD-80	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGGSISGGY GWGWIRQPPGKGLEWIGSFYSSSGNTYYNPSL KSQVTISTDTSKNQFSLKLNSMTAADTAVYYCV RDRLFSVVGMVYNNWFDVWGPGVLVTVSS
40	AB007VL	VL CD-80	ESALTQPPSVSGAPGQKVTISCTGSTSNIGGYDL HWYQQLPGTAPKLLIYDINKRPSGISDRFSGSKS GTAASLAITGLQTEDEADYYCQSYDSSLNAQVF GGGTRLTVLG
41	AB008VH	VH CD-22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSY WLHWVRQAPGQGLEWIGYINPRNDYTEYNQNF KDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFCAR RDITTFYWGQGTTVTVSS
42	AB008VL	VL CD-22	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMSCKSSQSVLYSA NHKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCHQYLS SWTFGGGTKLEIKR
43	AB009VH	VH CD-40	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRYHADSV KGRFTISRDNSKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCAR DGGIAAPGPDYWGQGTLVTVSS
44	AB009VL	VL CD-40	DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNG YNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTP FTFGPGTKVDIRR
45	AB010VH	VH IGF1,2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY DINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQ KFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYY CARDPYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
46	AB010VL	VL IGF1,2	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIENNH VSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGS KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCETWDTSLSAG RVFGGGTKLTVLG

SEQ ID No.	ID única ABT	Región de Proteína	Secuencia 12345678901234567890123456789012345678900
47	AB011VH	VH IGF1R (seq. 1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYA MNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVK GRFTISRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DLGWSDSYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
48	AB011VL	VL IGF1R (seq. 1)	DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLG WYQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFGQ GTKLEIKR
49	AB012VH	VH HGF (seq. 1)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDY YMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DEYNSGWYVLFDYWGQGTLVTVSS
50	AB012VL	VL HGF (seq. 1)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWL AWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTF GQGTKVEIKR
51	AB013VH	VH c-MET	QVQLQQSGPELVRPGASVKWSCPASGYTFTSY WLHWVKKQRPGQGLEWIGMIDPSNSDTRFNPP NFKDKATLNVDRSSNTAYNLLSSLTSADSAVYY CATYGSYVSPLDYWGQGTSVYVSS
52	AB013VL	VL c-MET	DIMMSQSPSSLTVSVGEKVTVSCKSSQSLLVTS SQKNYLAWYQQKPQQSPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFTLTITSVKADDLAVYYCQQYY AYPWTFGDGTKLEIKR
53	AB014VH	VH VEGF (seq. 1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNY GMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAAD FKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC AKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSS
54	AB014VL	VL VEGF (seq. 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLN WYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQ GTKVEIKR
55	AB015VH	VH DLL-4 (seq. 1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDN WISWVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDNFGGYFDYWGQGTLVTVSS
56	AB015VL	VL DLL-4 (seq. 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAV AWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFG QGTKVEIKR
57	AB016VH	VH NRP1 (seq. 1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSE PISWVRQAPGKGLEWVSSITGKNGYTYYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR WGKKVYGMDVWGQGTLVTVSS
58	AB016VL	VL NRP1 (seq. 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLA WYQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYMSVPITFGQ GTKVEIKR

SEQ ID No.	ID única ABT	Región de Proteína	Secuencia 12345678901234567890123456789012345678900
59	AB033VH	VH EGFR (seq. 2)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYG VHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTS RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARAL TYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
60	AB033VL	VL EGFR (seq. 2)	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGT DFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGT KLELKR
61	AB034VH	VH RON (seq. 2)	QVQLQESGPGLVKPSEILSLTCTVSGGSISSHY WSWVRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARIP NYYDRSGYYPGYWYFDLWGRGTLVTVSS
62	AB034VL	VL RON (seq. 2)	QAVLTQPSSLSAPPGASASLTCTLRSGFNVDSY RISWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVP SRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIW HSSAWVFGGGTKLTVLR
63	AB035VH	VH NRP1 (seq. 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSQISPAGGYTNYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR ELPYYRMSKVMDVQGQGTLVTVSS
64	AB035VL	VL NRP1 (seq. 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYFSSYLA WYQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLGSPPTFG QGTKVEIKR
65	AB039VH	VH CD3 (seq. 2)	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRY TMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKF KDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
66	AB039VL	VL CD3 (seq. 2)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMN WYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSG SGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFG SGTKLEINR
67	AB047VH	VH PLGF (seq. 1)	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYI NWVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKG KATLTIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDS PFFDYWGQGTLLTVSS
68	AB047VL	VL PLGF (seq. 1)	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSG MRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSY HLFTFGSGTKLEIKR
69	AB062VH	VH ErbB3 (seq. 1)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGY YWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKS RVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDK WTWYFDLWGRGTLVTVSS
70	AB062VL	VL ErbB3 (seq. 1)	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSS NRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYS TPRTFGQGTKVEIKR

SEQ ID No.	ID única ABT	Región de Proteína	Secuencia 1234567890123456789012345678901234567890
71	AB063VH	VH ErbB3 (seq. 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYS MNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARD RGDFDAFDIWGQGTMVTVSS
72	AB063VL	VL ErbB3 (seq. 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQG TRLEIKR
73	AB067VH	VH ErbB3 (seq. 3)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYV MAWVRQAPGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR GLKMATIFDYWGQGTLVTVSS
74	AB067VL	VL ErbB3 (seq. 3)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYN VVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSG SKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFV IFGGGTKVTVLG
75	AB069VH	VH DLL4 (seq. 2)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYI HWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKG RVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARD YDYDVGMDYWGQGTLVTVSS
76	AB069VL	VL DLL4 (seq. 2)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGI SFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVP WTFGGGTKVEIKR
77	AB070VH	VH VEGF (seq. 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYW IHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR FVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSS
78	AB070VL	VL VEGF (seq. 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAV AWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQ GTKVEIKR
79	AB071VH	VH VEGF (seq. 3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASW IHWVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR WGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVSS
80	AB071VL	VL VEGF (seq. 3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLA WYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQ GTKVEIKR
81	AB072VH	VH DLL4 (seq. 3)	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY VINWVKQKPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFK VKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAS YYYGSRYYFDYWGQGTTLTVSS
82	AB072VL	VL DLL4 (seq. 3)	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLA WYQQKP GNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTL SITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLTFGAGTKLELK R

SEQ ID No.	ID única ABT	Región de Proteína	Secuencia 12345678901234567890123456789012345678900
83	AB073VH	VH DLL4 (seq. 4)	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYN MNWVKQSNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCAR NYDYDGGCFDYWGQGTTLTVSS
84	AB073VL	VL DLL4 (seq. 4)	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSN YANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFS GSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWV FGGGTKLTVLG
85	AB074VH	VH PLGF (seq. 2)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGI HWVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFIS RLSISKDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARY RFYGMDYWGQGTSVTVSS
86	AB074VL	VL PLGF (seq. 2)	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFA WYQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSG SGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFG GGTKLEIKR
87	AB075VH	VH IGF1R (seq. 2)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQ GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARA PLRFLEWSTQDHYYYYYMDVWGKGTTVTVSS
88	AB075VL	VL IGF1R (seq. 2)	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYAT WYQQKPGQAPILVIYGENKRPSGIPDRFSGSSS GNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDGSGQHLVF GGGTKLTVLG
89	AB077VH	VH IGF1R (seq. 3)	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFA MHWVRQAPGKGLEWISVIDTRGATYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARL GNFYYGMDVWGQGTTVTVSS
90	AB077VL	VL IGF1R (seq. 3)	EIVLTQSPGTLSVSPGERATLSCRASQSIGSSLH WYQQKPGQAPRLLIKYASQSLSGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQSSRLPHTFGQ GTKVEIKR
91	AB079VH	VH HGF (seq. 2)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYW MHWVRQMPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSF QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA RNYVGSIFDYWGQGTLVTVSS
92	AB079VL	VL HGF (seq. 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVS WYQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYTFG QGTKLEIKR
93	AB080VH	VH HER2 (seq. 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYT MDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRF KGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
94	AB080VL	VL HER2 (seq. 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVA WYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQG TKVEIKR

La descripción detallada de moléculas de DVD-Ig específicas capaces de unirse a objetivos específicos, y los métodos para preparar las mismas se proveen en la sección de Ejemplos siguiente.

C. Producción de proteínas de DVD

Las proteínas de unión de la presente invención se pueden producir mediante cualquiera de un número de técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, expresión de células hospederas, en donde el (los) vector(es) de expresión que codifican las cadenas pesada de DVD y ligera de DVD son transfectados en una célula hospedera mediante técnicas estándar. Las diferentes formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en en una célula hospedera procariótica o eucariótica, p.e., electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección de DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar las proteínas de DVD de la invención en células hospederas procarióticas o eucarióticas, las proteínas de DVD son expresadas en células eucarióticas, por ejemplo, células hospederas mamíferas, porque tales células eucarióticas (y en particulas células mamíferas) son más probables que las células procarióticas a ensamblarse y secretar una proteína de DVD inmunológicamente activa y apropiadamente plegada.

Células hospederas mamíferas ejemplares para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 77:4216-4220, usadas con um marcador seleccionable DHFR, p.e., descritas en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS, SP2 y células PER.C6. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican a las proteínas de DVD son introducidos en las células hospederas mamíferas, las proteínas de DVD se producen cultivando las células hospederas por un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de las proteínas de DVD en las células hospederas o la secreción de las proteínas de DVD en el medio de cultivo en el cual las células hospederas son cultivadas. Las proteínas de DVD pueden ser recuperadas del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteína estándar.

En un sistema ejemplar para la expresión recombinante de las proteínas de DVD de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada de DVD como la cadena ligera de DVD es introducido en células dhfr-CHO mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera de DVD están cada uno operativamente enlazados a elementos reguladores de potenciador de CMV/promotor de AdMLP para dirigir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospederas transformantes seleccionadas son cultivadas para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera de DVD y la proteína de DVD intacta es recuperada del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular estándar para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospederas, seleccionar transformantes, cultivar las células hospederas y recuperar la proteína de DVD del medio de cultivo. Aún además la invención provee un método para sintetizar una proteína de DVD de la invención cultivando una célula hospedera de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza una proteína de DVD de la invención. El método puede comprender además aislar la proteína de DVD del medio de cultivo.

Una característica importante de la DVD-Ig es que puede ser producida y purificada de una forma similar a un anticuerpo convencional. La producción de DVD-Ig resulta en un solo producto importante, homogéneo con actividad específica dual, sin ninguna modificación de secuencia de la región constante o modificaciones químicas de ninguna clase. Otros métodos descritos previamente para generar proteínas de unión "bi-específicas", "multi-específicas", y "multi-específicas multivalentes" de longitud total no conducen a un solo producto primario sino que conducen a la producción intracelular o secretada de una mezcla de proteínas de unión inactivas ensambladas, mono-específicas, multi-específicas, multivalentes, de longitud total, y proteínas de unión multivalentes de longitud total con combinación de diferentes sitios de unión. Como un ejemplo, con base en el diseño descrito por Miller y Presta (publicación PCT WO2001/077342(A1), hay 16 posibles combinaciones de cadenas pesada y ligera. En consecuencia, solamente 6.25% de la proteína es

probable que sea la forma activa deseada, y no como un solo producto importante o solo producto primario comparado con las otras 15 posibles combinaciones. La separación de las formas totalmente activas deseadas de la proteína de las formas inactivas o parcialmente activas usando técnicas de cromatografía estándar, típicamente usadas en la fabricación a gran escala, aún está por demostrarse.

De manera sorprendente, el diseño de las "proteínas de unión de longitud total multivalentes específicas duales" de la presente invención conduce a una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual que se ensambla principalmente a las "proteínas de unión delongitud total multivalentes específicas duales" deseadas.

Al menos 50%, al menos 75% y al menos 90% de las moléculas de inmunoglobulina de dominio variable dual ensambladas y expresadas son la proteína tetravalente específica dual deseada. Este aspecto de la invención potencia particularmente la utilidad comercial de la invención. Por lo tanto, la presente invención incluye un método para expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una sola célula que conduce a un solo producto primario de una "proteína de unión de longitud total tetravalente específica dual".

La presente invención provee métodos para expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una sola célula que conduce a un "producto primario" de una "proteína de unión de longitud total tetravalente específica dual", en donde el "producto primario" es más del 50% de toda la proteína ensamblada, que comprende una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual.

La presente invención provee métodos para expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una sola célula que conduce a un solo "producto primario" de una "proteína de unión de longitud total tetravalente específica dual", en donde el "producto primario" es más del 75% de toda la proteína ensamblada, que comprende una

cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual.

La presente invención provee métodos para expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una sola célula que conduce a un solo "producto primario" de una "proteína de unión de longitud total tetravalente específica dual", en donde el "producto primario" es más del 90% de toda la proteína ensamblada, que comprende una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual.

II. Proteínas de unión de DVD Derivatizadas:

Una realización provee una proteína de unión marcada en donde la proteína de unión de la invención es derivada o está unida a otra molécula funcional (p.e., otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la invención puede ser derivada uniendo funcionalmente una proteína de unión de la invención (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra forma) a una o más entidades moleculares diferentes, tal como otro anticuerpo (p.e., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación de la proteína de unión con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

Agentes detectables útiles con los cuales se puede derivar una proteína de unión de la invención incluyen compuestos fluorescentes. Agentes detectables fluorescentes ejemplares incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, 5-dimetilamina-1-naftalensulfonil cloruro, ficoeritrina y similares. Una protreína de unión también puede ser derivada con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidada de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando una proteína de unión se deriva con una enzima detectable, esta es detectada agregando reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto

de reacción coloreado, que es detectable. Una proteína de unión también puede ser derivada con biotina, y detectada mediante medición indirecta de unión a avidina o estreptavidina.

Otra realización de la invención provee una proteína de unión cristalizada y formulaciones y composiciones que comprenden tales cristales. En una realización, la proteína de unión cristalizada tiene una vida media in vivo mayor que la contraparte soluble de la proteína de unión. En otra realización, la proteína de unión retiene la actividad biológica después de la cristalización.

La proteína de unión cristalizada de la invención puede se producida de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y revelados de WO 02072636, incorporada aquí mediante referencia.

Otra realización de la invención provee una proteína de unión glicosilada en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo comprende uno o más residuos de carbohidrato. La producción de proteína in vivo naciente puede someterse a procesamiento adicional, conocido como modificación post-translacional. En particular, se pueden agregar enzimáticamente residuos de azúcar (glicosilo), un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que portan cadenas laterales de oligosacárido enlazadas covalentemente son conocidas como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más residuos de carbohidrato en el dominio Fc, así como el dominio variable. Los residuos de carbohidrato en el dominio Fc tienen efecto importante en la función efectora del dominio Fc, con efecto mínimo en la unión a antígeno o vida media del (R. Jefferis, Biotechnol. Prog. 21 (2005), pp. 11–16). En contraste, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto en la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo en la afinidad de unión del anticuerpo, debido probablemente a la hidrancia estérica (Co, M.S., et al., Mol. Immunol. (1993) 30:1361- 1367), o producir afinidad aumentada para el antígeno (Wallick, S.C., et al., Exp. Med. (1988) 168:1099-1109; Wright, A., et al., EMBO J. (1991) 10:2717 2723).

Un aspecto de la presente invención está dirigido a generar mutantes de sitio de glicosilación en los cuales el sitio de glicosilación enlazado a O N de la proteína de unión ha sido mutado. Un experto en la técnica puede enerat tales mutantes usando tecnologías estándar bien conocidas. Los mutantes de sitio de glicosilación que retienen la actividad biológica, pero tienen actividad de unión aumentada o disminuida son otro objeto de la presente invención.

En aún otra realización, la glisosilación del anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención es modificada. Por ejemplo, se puede hacer un anticuerpo aglicosilado (p.e., el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede ser alterada para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Tales modificaciones de carbohidrato pueden ser realizadas, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de amino ácido que producen la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de región variable para de esta forma eliminar la glicosilacion en ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Tal enfoque se describe en mayor detalle en la Publicación PCT WO2003016466A2, y Pat. U.S. Nos. 5,714,350 y 6,350,861, cada una de las cuales está incorporada aquí mediante referencia en su totalidad.

Adicionalmente o alternativamente, una proteína de unión modificada de la invención se puede hacer para que tenfa un tipo de glicosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosilo (ver Kanda, Yutaka et al., Journal of Biotechnology (2007), 130(3), 300-310.) o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNAc bisecantes aumentadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la habilidad ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidrato pueden ser realizadas, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedera con maquinarua de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada han sido descritas en la técnica y se pueden usar como células hospederas en las cuales expresar anticuerpos recombinantes de la invención para de esta forma producir un anticuerpo con glicosilación alterada. Ver, por ejemplo, Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, así como, Patente Europea No: EP 1,176,195; Publicaciones PCT WO 03/035835;

WO 99/54342 80, cada una de las cuales está incorporada aquí mediante referencia en su totalidad.

La glicosilación de proteína depende de la secuencia de amino ácido de la proteína de interés, así como de la célula hospedera sobre la cual se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (p.e., glicosiltransferasas y glicosidasas), y tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótido) disponibles. Debido a tales factores, el patrón de glicosilación de proteína, y la composición de los residuos de glicosilo, puede diferir dependiendo del sistema hospedero en el cual se expresa la proteína particular. Los residuos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no se limitan a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. En una realización, la proteína de unión glicosilada comprende residuos de glicosilo de forma que el patrón de glicosilación es humano.

Es conocido por los expertos en la técnica que cambiar la glicosilación de la proteína puede producir características de proteína diferentes. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un hospedero microorganismo, tal como levadura, y glicosilada utilizando la misma ruta endógena de levadura puede ser reducida comparada con la de la misma proteína expresada en una célula mamífera, tal como una línea celular CHO. Tales glicoproteínas pueden también ser inmunogénicas en humanos y mostrar vida media in vivo reducida después de la administración. Receptores específicos en humanos y otros animales pueden reconocer residuos de glicosilo específicos y promover la rápida depuración de la proteína en la corriente sanguínea. Otros efectos adversos pueden incluir cambios del plegamiento de proteína, solubilidad, susceptibilidad a proteasas, tráfico, transporte, compartimentalización, secreción, reconocimiento por otras proteína o factores, antigenicidad, o alergenicidad. En consecuencia, un experto médico puede elegir una proteína terapéutica con una composición y patrón de glicosilación específicos, por ejemplo composición de glicosilación y patrón idéntico, o al menos similar, al producido en células humanas o en las células exspecíficas de especie del animal sujeto previsto.

La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de la de una célula hospedera puede lograrse modificando genéticamente la célula hospedera para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Usando técnicas conocidas en el arte, un experto médico puede generar anticuerpos o porción de unión a antígeno de los mismos, que muestran glicosilación de proteína humana. Por ejemplo, las cepas de levadura han sido modificadas genéticamente para expresar enzimas de glicosilación que no se encuentran naturalmente de forma que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura exhiben glicosilación de proteína idéntica a la de las células animales, especialmente células humanas (solicitudes de patente U.S 20040018590 y 20020137134 y publicación PCT WO2005100584 A2).

Además de las proteínas de unión, la presente invención también está dirigida a anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) específicos para tales proteínas de unión de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con la región de unión a antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id puede ser preparado inmunizando un animal con la proteína de unión o una región que contiene CDR del mismo. El animal inmunizado reconocerá, y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante y producirá un anticuerpo anti-Id. Será obvio que puede ser más fácil generar anticuerpos anti-idiotípicos a los dos o más anticuerpos base incorporados en una molécula de DVD-Ig; y confirmar los estudios de unión mediante métodos bien reconocidos en la técnica (p.e., BIAcore, ELISA) para verificar que los anticuerpos anti-idiotípicos específicos para el idiotipo de cada uno de los anticuerpos base también reconoce el idiotipo (p.e., sitio de unión a antígeno) en el contexto de la DVD-Ig. Los anticuerpos anti-idiotípicos específicos para cada uno de los dos o más sitios de unión a antígeno de una DVD-Ig proveen reactivos ideales para medir las concentraciones DVD-Ig de una DVD-Ig humana en suero de pacientes; Los ensayos de concentración de DVD-Ig pueden ser establecidos usando un "formato de ELISA de ensayo en emparedado" con un anticuerpo para unas primeras regiones de unión a antígeno recubiertas sobre la fase sólida (p.e., chip de BIAcore, placa de ELISA, etc.), enjuagadas con amortiguador de enjuague, incubación con la muestra en suero, otro paso de enjuague y finalmente incubación con otro anticuerpo anti-idiotípico al otro sitio de unión a antígeno, a su vez marcado con una enzima para cuantificación de la reacción de unión. En una realización,

para una DVD-Ig con más de dos sitios de unión diferentes, los anticuerpos anti-idiotípicos a los dos sitios de unión extremos (el más lejano y próximo de la región constante) no solo ayudará a determinar la concentración de DVD-Ig en suero humano sino que también documentará la integridad de la molécula in vivo. Cada anticuerpo anti-Id puede también usarse como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en aún otro animal, produciendo un anticuarpo llamado anti-anti-Id.

Además, el experto en la técnia apreciará que una proteína de interés puede ser expresada usando una librería de células hospederas diseñadas genéticamente para expresar varias enzimas de glicosilación, de forma que las células hospederas miembro de la librería producen la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Un experto médico puede entonces seleccionar y aislar la proteína de interés con patrones de glicosilación novedosos particulares. En una realización, la proteína que tiene un patrón de glicosilación novedoso particularmente seleccionado enhibe propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

III. Usos de la DVD-Ig

Dada su habilidad para unirse a dos o más antígenos, las proteínas de unión se pueden usar para detectar los antígenos (p.e., en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo inmunisorbente ligado a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejido. La DVD-Ig está marcada directamente o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo enlazado o no enlazado. Sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, o aceiylcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupo protético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, dansil cloruro o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye

luminol; y ejemplos de material radioactivo adecuado incluye ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, o ^{153}Sm.

En una realización, las proteínas de unión de la invención son capaces de neutralizar la actividad de los antígenos tanto in vitro como in vivo. En consecuencia, tales DVD-Igs se pueden usar para inhibir la actividad del antígeno, p.e., en un cultivo celular que contiene los antígenos, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen los antígenos con los cuales reacciona cruzadamente una proteína de unión de la invención. En otra realización, la invención provee un método para reducir la actividad de antígeno en un sujeto que sufre de una enfermedad o trastorno en el cual la actividad del antígeno es perjudicial. Una proteína de unión de la invención puede ser administrada a un sujeto humano para propósitos terapeuticos.

Como se usa aquí, el término "un trastorno en el cual la actividad del antígeno es perjudicial" pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los cuales se ha demostrado que la presencia del antígeno en un sujeto que sufre del trastorno es o se sospecha que es responsable de la patofisiología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastono. En consecuencia, un trastono en el cual la actividad del antígeno es perjudicial es un trastorno en el cual se espera la reducción de la actividad del antígeno para aliviar los síntomas y/o progresión del trastorno. Tales trastornos pueden ser evidenciados, por ejemplo, por un aumento de la concentración del antígeno en un fluido biológico de un sujeto que sufre del trastorno (p.e., un aumento de la concentración del antígeno en suero, plasma, fluido sinovial, etc., del sujeto). Ejemplos no limitantes de trastornos que se pueden tratar con las proteínas de unión de la invención incluyen aquellos trastornos discutidos a continuación y en la sección relacionada con composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

Las DVD-Igs de la invención se pueden unir a un antígeno o múltiples antígenos. Tales antígenos incluyen, pero no se limitan a, los objetivos listados en las siguientes bases de datos, cuyas bases de datos están incorporadas aquí mediante referencia. Estas bases de datos de objetivos incluyen aquellos listados:

Objetivos terapéuticos (http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttd/ttd.asp);

Citoquinas y receptores de citoquina (http://www.citoquinawebfacts.com/, http://www.copewithcitoquinas.de/cope.cgi, y

http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/citoquina.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html);

Quimioquinas (http://citoquina.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html);

Receptores de quimioquina y GPCRs (http://csp.medic.kumamoto-u.ac.jp/CSP/Receptor.html, http://www.gpcr.org/7tm/);

Receptores Olfatorios (http://senselab.med.yale.edu/senselab/ORDB/default.asp);

Receptores (http://www.iuphar-db.org/iuphar-rd/list/index.htm);

Objetivos de cáncer (http://cged.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi);

Proteínas secretadas como objetivos de anticuerpo potenciales (http://spd.cbi.pku.edu.cn/);

Proteínas quinasas (http://spd.cbi.pku.edu.cn/), y

Marcadores de CD Humana

(http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf) y (Zola H, 2005 CD molecules 2005: human cell differentiation molecules Blood, 106:3123-6).

Las DVD-Igs son útiles como agentes terapéuticos para bloquear simultáneamente dos objetivos diferentes para potenciar la eficacia/seguridad y/o aumentar el cubrimiento al paciente. Tales objetivos pueden incluir objetivos solubles (TNF) y objetivos de receptor de superficie celular (VEGFR y EGFR). También se pueden usar para inducir la citotoxicidad redirigida entre células de tumor y células T (Her2 y CD3) para terapia del cáncer, o entre célula autoreactiva y células efectoras para enfermedad autoinmune o transplante, o entre cualquier célula objetivo y célula efectora para eliminar células que causan la enfermedad en cualquier enfermedad dada.

En adición, la DVD-Ig se puede usar para desencadenar el agrupamiento de receptor y la activación cuando se diseñan para marcar dos epítopos diferentes sobre el mismo receptor. Esto puede tener beneficio para preparar terapéuticos anti-GPCR agonísticos y antagonísticos. En este caso, la DVD-Ig se puede usar para marcar dos epítopos diferentes (incluyendo epítopos sobre ambas regiones de asas y el dominio extracelular) sobre una célula para agrupamiento/señalización (dos moléculas de superficie celular) o señalización (sobre una molécula). Igualmente, una molécula de DVD-Ig puede ser diseñada para desencadenar la ligadura de CTLA-4, y una señal negativa por el marcado de dos epítopos diferentes (o 2 copias del mismo epítopo) del dominio extracelular de CTLA-4, conduciendo a la regulación descendente de la respuesta inmune. El CTLA-4 es un objetivo clínicamente validado para el tratamiento terapéutico de un número de trastornos inmunológicos. Las interacciones CTLA-4/B7 regulan negativamente la activación de célula T atenuando la progresión del ciclo celular, la producción de IL-2, y proliferación de células T después de la activación, y el compromiso de CTLA-4 (CD152) puede regular descendentemente la activación de célula T y promover lainducción de tolerancia inmune. Sin embargo, la estrategia de atenuar la activación de célula T mediante compormiso del anticuerpo agonístico de CTLA-4 no ha sido exitosa porque la activación de CTLA-4 requiere ligadura. La interacción molecular de CTLA-4/B7 está en arreglos de "cremallera asimétricos", demostrados por el análisis de estructura de cristal (Stamper 2001 Nature 410:608). Sin embargo, ninguno de los reactivos de unión a CTLA-4 disponibles actualmente tienen propiedades de ligadura, incluyendo los mAbs anti-CTLA-4. Han habido varios intentos de dirigir este tejido. En un caso, se generó un anticuerpo de cadena sencilla enlazado al miembro celular, e inhibió significativamente el rechazo alogénico en ratones (Hwang 2002 JI 169:633). En un caso separado, se generó un anticuerpo artificial de cadena sencilla enlazado a la superficie de APC para CTLA-4 y se demostró que atenuó las respuestas de célula T (Griffin 2000 JI 164:4433). En ambos casos se logró la ligadura de CTLA-4 mediante anticuerpos enlazados al miembro localizado cercanamente en sistemas artificiales. Aunque estos experimentos proveen prueba del concepto para la regulación descendente inmune mediante desencadenado de señalización negativa de CTLA-4, los reactivos usados en estos reportes no son adecuados para uso terapéutico. Para este fin, la ligación de CTLA-4 se puede lograr usando una molécula de DVD-Ig, que marca dos epítopos diferentes (o 2 copias del mismo epítopo) del

dominio extracelular de CTLA-4. El fundamente es que la distancia que abarca dos sitios de unión de una IgG, aproximadamente 150-170Å, es demasiado grande para la ligadura activa de CTLA-4 (30-50 Å entre 2 homodímeros de CTLA-4). Sin embargo, la distancia entre los dos sitios de unión sobre DVD-Ig (un brazo) es mucho más corta, también en el rango de 30-50 Å, permitiendo la ligadura apropiada de CTLA-4.

Igualmente, la DVD-Ig puede marcar dos miembros diferentes de un complejo de receptor de superficie celular (p.e.,IL-12R alfa y beta). Adicionalmente, la DVD-Ig puede marcar CR1 y una proteína/patógeno soluble para dirigir la depuración rápida de la proteína/patógeno soluble ojetivo.

Adicionalmente, las DVD-Igs de la invención se pueden emplear para liberación especifica al tejido (dirigirse a un marcador de tejido y un mediador de enfermedad para PK local potenciada, por ende, mayor eficacia y/o menor toxicidad), incluyendo liberación intracelular (marcando un receptor de internalización y una molécula intracelular), liberando dentro del cerebro (dirigida al receptor de transferrina y un mediador de enfermedad del SNC para cruzar la barrera sangre-cerebro). La DVD-Ig también puede servir como una proteína portadora para liberar un antígeno en una ubicación específica mediante la unión a un epítopo no neutralizante de ese antígeno y también para aumentar la vida media del antígeno. Adicionalmente, la DVD-Ig puede ser diseñada para enlazarse físicamente a dispositivos médicos implantados en pacientes o para marcar estos dispositivos médicos (ver Burke, Sandra E.; Kuntz, Richard E.; Schwartz, Lewis B., Zotarolimus eluting stents. Advanced Drug Delivery Reviews (2006), 58(3), 437-446; Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices, Hildebrand, H. F.; Blanchemain, N.; Mayer, G.; Chai, F.; Lefebvre, M.; Boschin, F., Surface y Coatings Technology (2006), 200(22-23), 6318-6324; Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis, Wu, Peng; Grainger, David W., Biomaterials (2006), 27(11), 2450-2467; Mediation of the citoquina network in the implantation of orthopedic devices., Marques, A. P.; Hunt, J. A.; Reis, Rui L., Biodegradable Systems in Tissue Engineering y Regenerative Medicine (2005), 377-397). Brevemente, al dirigir tipos de célula apropiados al sitio del implante médico se puede promover la curación y restauración de la función del tejido normal. Alternativamente, también se provee la inhibición de mediadores (incluyendo, pero sin limitarse a citoquinas),

liberadas durante la implantación des dispositivo por un DVD acoplado o dirigido. Por ejemplo, se han usado stents por años en cardiología intervencional para limpiar arterias bloqueadas y para mejorar el glujo de sangre al músculo cardíaco. Sin embargo, se ha sabido que los stents de metal desnudo tradicionales causan restenosis (re-angostamiento de la arteria en el área tratada) en algunos pacientes, y puede conducir a coágulos de sangre. Recientemente se ha descrito un stent recubierto de anticuerpo anti-CD34 que reduce la restenosis y evita que ocurran coágulos de sangre al capturar las células progenitoras endoteliales (EPC) que circulan en la sangre. Las células endoteliales son células que recubren los vasos sanguíneos, permitiendo que la sangre fluya suavemente. Las EPCs se adhieren a la superficie dura del stent formando una capa lisa que no solo promueve la curación sino que evita la restenosis y los coágulos de sangre, complicaciones asociadas previamente con el uso de stents (Aoji et al. 2005 J Am Coll Cardiol. 45(10):1574-9). Además de mejorar los resultados para pacientes que requieren stents, también hay implicaciones para pacientes que requieren cirugía de bypass cardiovascular. Por ejemplo, un conducto vascular protético (arteria artificial) recubierta con anticuerpos anti-EPC eliminaría la necesidad de usar arterias de piernas o brazos de pacientes para los injertos de cirugía de bypass. Esto reduciría los tiempos de cirugía y anestesia, que a su vez reducen las muertes por cirugía coronaria. Las DVD-Ig están diseñadas de forma que se unen a un marcador de superficie celular (tal como CD34) así como a una proteína (o un epítopo de cualquier clase, incluyendo pero sin limitarse a proteínas, lípidos y polisacáridos) que han sido recubiertos en el dispositivo implantado para facilitar el reclutamiento celular. Tales enfoques también pueden ser aplicados a otros implantes médicos en general. Alternativamente, las DVD-Igs pueden ser recubiertas en dispositivos médicos y a la implantación y liberación de todos los DVDs del dispositivo (o cualquier otra necesidad que pueda requerir de DVD-Ig fresca adicional, incluyendo envejecimiento y desnaturalización de la DVD-Ig ya cargada) el dispositivo podría ser recargado mediante administración sistémica de DVD-Ig fresca al paciente, en donde la DVD-Ig está diseñada para unirse a un objetivo de interés (una citoquina, un marcador de superficie celular (tal como CD34) etc.) con un conjunto de sitios de unión y a un objetivo recubierto en el dispositivo (incluyendo una proteína, un epítopo de cualquier clase, incluyendo, pero sin limitarse a lípidos, polisacáridos y polímeros) con el otro. Esta tecnología tiene la ventaja de extender la utilidad de los implantes recubiertos.

A. Uso de DVD-Igs en varias enfermedades

Las moléculas de DVD-Ig de la invención también son útiles como moléculas terapeúticas para tratar varias enfermedades. Tales moléculas de DVD se pueden unir a uno o más objetivos involucrados en una enfermedad específica. Ejemplos de tales objetivos en varias enfermedades se describen a continuación.

1. Respuesta Autoinmune e Inflamatoria Humana

Muchas proteínas han sido implicadas en las respuestas autoinmunes e inflamatorias generales, incluyendo C5, CCL1 (I-309), CCL11 (eotaxina), CCL13 (mcp-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL2 (mcp-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (TECK), CCL26, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (mcp-3), CCL8 (mcp-2), CXCL1, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC/IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL2, CXCL3, CXCL5 (ENA-78 / LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9, IL13, IL8, CCL13 (mcp-4), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1, IL8RA, XCR1 (CCXCR1), IFNA2, IL10, IL13, IL17C, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL22, IL5, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, SCYE1 (citoquina activadora de monocito endotelial), SPP1, TNF, TNFSF5, IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RA1, IL5RA, IL9, IL9R, ABCF1, BCL6, C3, C4A, CEBPB, CRP, ICEBERG, IL1R1, IL1RN, IL8RB, LTB4R, TOLLIP, FADD, IRAK1, IRAK2, MYD88, NCK2, TNFAIP3, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, CD28, CD3E, CD3G, CD3Z, CD69, CD80, CD86, CNR1, CTLA4, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, FCGR3A, GPR44, HAVCR2, OPRD1, P2RX7, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, BLR1, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCR4, GPR2, SCYE1, SDF2, XCL1, XCL2, XCR1, AMH, AMHR2, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, C19orf10 (IL27w), CER1, CSF1, CSF2, CSF3, DKFZp451J0118, FGF2, GFI1, IFNA1, IFNB1, IFNG, IGF1, IL1A, IL1B, IL1R1, IL1R2, IL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL4, IL4R, IL5, IL5RA, IL6, IL6R, IL6ST, IL7, IL8, IL8RA, IL8RB, IL9, IL9R, IL10, IL10RA, IL10RB, IL11, IL11RA,

IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL13RA1, IL13RA2, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17R, IL18, IL18R1, IL19, IL20, KITLG, LEP, LTA, LTB, LTB4R, LTB4R2, LTBR, MIF, NPPB, PDGFB, TBX21, TDGF1, TGFA, TGFB1, TGFB1I1, TGFB2, TGFB3, TGFBI, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TH1L, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF11A, TNFRSF21, TNFSF4, TNFSF5, TNFSF6, TNFSF11, VEGF, ZFPM2, y RNF110 (ZNF144). En un aspecto, se proveen DVD-Igs capaces de unirse a uno o más de los objetivos aquí listados.

2. Asma

El asma alérgica está caracterizada por la presencia de eosinofilia, metaplasia de célula calciforme, alteraciones de célula epitelial, hiperreactividad de vías aéreas (AHR), y expresión de citoquina Th2 y Th1, así como niveles de IgE en suero elevados. Es ampliamente aceptado que la inflamación de las vías aéreas es el factor clave que subyace en la patogénesis del, que involucra una interacción compleja de células inflamatorias tales como células T, células B, eosinófilos, mastocitos y macrófagos, y de sus mediadores secretados incluyendo citoquinas y quimioquinas. Los corticosteroides son el tratamiento anti-inflamatorio más importante para el asma actualmente, sin embargo, su mecanismo de acción no es específico y existen preocupaciones de seguridad, especialmente en la población de pacientes jóvenes. Se justifica el desarrollo de terapias más específicas y dirigidas. Hay evidencia en aumento que la IL-13 en ratones imita muchas de las características del asthma, incluyendo AHR, hipersecreción de moco y fibrosis de vías aéreas, independientemente de la inflamación eosinofílica (Finotto et al., International Immunology (2005), 17(8), 993-1007; Padilla et al., Journal of Immunology (2005), 174(12), 8097-8105).

La IL-13 ha estadoimplicada por tener un papel de pivote para causar respuestas patológicas asociadas con el asma. El desarrollo de terapia de mAb anti-IL-13 para reducir los efectos de la IL-13 en el pulmón es un nievo enfoque excitante que ofrece una promesa considerable como un tratamiento novedoso para el asma. Sin embargo, otros mediadores de las rutas inmunológicas diferenciales también están involucrados en la patogénesis del asma, y al bloquear estos mediadores, además del IL-13, pueden ofrecer beneficio

terapéutico adicional. Tales pares de objetivos incluyen, pero no se limitan a, IL-13 y una citoquina pro-inflamatoria, tal como un factor-α de necrosis de tumor (TNF-α). El TNF-α puede amplificar la respuesta inflamatoria en el asma y puede estar ligado a la severidad de la enfermedad (McDonnell, et al., Progress in Respiratory Research (2001), 31(New Drugs for Asthma, Allergy y COPD), 247-250.). Esto sugiere que bloquear IL-13 y TNF-α puede tener efectos benéficos, particularmente en la enfermedad de vías aéreas severa. En otra realización, la DVD-Ig de la invención se une a los objetivos IL-13 y TNFα y se usa para el tratamiento del asma.

Modelos animales tales como modelo de ratón de asma inducida por OVA, en donde se puede evaluar la inflamación y la AHR, son conocidos en la técnica y se pueden usar para determinar la habilidad de varias moléculas de DVD-Ig para tratar el asma. Los modelos animales para estudiar el asma están revelados en Coffman, et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201(12), 1875-1879; Lloyd, et al., Advances in Immunology (2001), 77, 263-295; Boyce et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201(12), 1869-1873; y Snibson, et al., Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology (2005), 35(2), 146-52. Además de las evaluaciones de seguridad de rutina de estos pares objetivos, se pueden justificar pruebas específicas para el grado de inmunosupresión y pueden ser de ayuda para seleccionar el mejor par de objetivos (ver Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Hart et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology (2001), 108(2), 250-257).

Con base en los fundamentos aquí revelados y usando el mismo modelo de evaluación para eficacia y seguridad, se pueden determinar otros pares de objetivos a los cuales se pueden unir las moléculas de DVD-Ig y ser útiles para tratar el asma. En una realización, tales objetivos incluyen, pero no se limitan a, IL-13 e IL-1beta, porque IL-1beta también está implicada en la respuesta inflamatoria del asma; IL-13 y citoquinas y quimioquinas que están involucradas en la inflamación, tales como IL-13 e IL-9; IL-13 e IL-4; IL-13 e IL-5; IL-13 e IL-25; IL-13 y TARC; IL-13 y MDC; IL-13 y MIF; IL-13 y TGF-β; IL-13 y agonista de LHR; IL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; e IL-13 y ADAM8. La presente invención también proporciona DVD-Igs capaces de unirse a uno o más objetivos involucrados en el asma, seleccionados del grupo que consiste

de CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFNA1, IFNB1, IFNG, histamina y receptores de histamina, IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, KITLG, PDGFB, IL2RA, IL4R, IL5RA, IL8RA, IL8RB, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24,CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNF, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, y Quitinasa.

3. Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide (RA), una enfermedad sistémica, está caracterizada por una reacción inflamatoria crónica en el sinovio de las articulaciones y está asociada con degeneración de cartílago y erosión del hueso yuxtaarticular. Muchas citoquinas pro-inflamatorias incluyendo TNF, quimioquinas, y factores de crecimiento están expresados en las articulaciones enfermas. La administración sistémica de anticuerpo anti-TNF o proteína de fusión sTNFR a modelos de ratón de RA mostró ser anti-inflamatoria y protectora de articulaciones. Las investigaciones clínicas en las cuales se bloqueó la actividad de TNF en pacientes con RA con infliximab administrado venosamente (Harriman G, Harper LK, Schaible TF. 1999 Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment. Ann Rheum Dis 58 Suppl 1:I61-4), un mAb anti-TNF quimérico, ha proporcionado evidencia que la TNF regulat la producción de IL-6, IL-8, MCP-1, y VEGF, el reclutamiento de células inmunes e inflamatorias en las articulaciones, y la reducción de niveles en sangre de metaloproteinasas de matriz 1 y 3. Un mejor entendimiento de la ruta inflamatoria en la artritis reumatoide ha conducido a la identificación de otros objetivos terapéuticos involucrados en la artritis reumatoide. Tratamientos prometedores, tales como antagonistas de interleucina-6 (anticuerpo MRA del receptor de IL-6, desarrollado por Chugai, Roche (ver Nishimoto, Norihiro et al., Arthritis & Rheumatism (2004), 50(6), 1761-1769), CTLA4Ig (abatacept, Genovese Mc et al 2005 Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. N Engl J Med. 353:1114-23.), y terapia anti-célula B (rituximab, Okamoto H, Kamatani N. 2004 Rituximab for rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 351:1909) ya han sido

probados en ensayos aleatorios controlados el año pasado. Otras citoquinas han sido identificadas y han mostrado ser de beneficio en modelos animales, incluyendo interleucina-15 (anticuerpo terapéutico HuMax-IL_15, AMG 714 ver Baslund, Bo et al., Arthritis & Rheumatism (2005), 52(9), 2686-2692), interleucina-17, e interleucina-18, y ensayos clínicos de estos agentes están actualmente en marcha. La terapia de anticuerpo específico dual, combinando anti-TNF y otromediador, tiene gran potencial para mejorar la eficacia clínica y/o cubrimiento del paciente. Por ejemplo, bloqueando TNF y VEGF se puede erradircar potenticalmente la inflamación y 'angiogénesis, las cuales están ambas involucradas en la patofisiología de la RA. También se contempla el bloqueo de pares de objetivos involucrados en la RA incluyendo, pero sin limitarse a, TNF e IL-18; TNF e IL-12; TNF e IL-23; TNF e IL-1beta; TNF y MIF; TNF e IL-17; TNF e IL-15 con DVD Igs específicas. Además de las evaluaciones de seguridad de rutina de estos pares de objetivos, se pueden justificar pruebas específicas para el grado de inmunosupresión y útiles para seleccionar el mejor par de objetivos (ver uster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Hart et al., Journal of Allergy y Clinical Immunology (2001), 108(2), 250-257). Si una molécula de DVD Ig será útil para el tratamiento de artritis reumatoide se puede evaluar usando modelos de AR animales pre-clínicos tales como el modelo de ratón de artritis inducida por colágeno. Otros modelos útiles también son bien conocidos en la técnica (ver Brand DD., Comp Med. (2005) 55(2):114-22). Basados en la reactividad cruzada de los anticuerpos base para ortólogos humano y de ratón (p.e., reactividad para TNF humana y de ratón, IL-15 humana y de ratón, etc.) se pueden conducir estudios de validación en el modelo de CIA de ratón con "anticuerpo surrogado coincidente" derivado de moléculas de DVD-Ig; brevemente, una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos específicos de objetivo de ratón pueden ser coincidentes en la medida de lo posible con las características de los anticuerpos humanos o humanizados base usados para la construcción de DVD-Ig humana (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar, etc.).

4. SLE

El sello inmunopatogénico de SLE es la activación de célula B policlonal, que conduce a hiperglobulinemia, producción de autoanticuerpo y formación de complejo inmune. La anormalidad fundamental parece ser la falla de las células T para suprimir los clones de célula B prohibidos debido a la desregulación de

célula T generalizada. En adición, la interacción de célula B y T es facilitada por varias citoquinas tal como IL-10 así como moléculas co-estimuladoras tales como CD40 y CD40L, B7 y CD28 y CTLA-4, que inician la segunda señal. Estas interacciones junto con la depuración fagocítiva deteriorada de los complejos inmunes y el material apoptótico, perpetuan la respuesta inmune con lesión de tejido resultante. Los siguientes objetivos pueden estar involucrados en SLE y pueden potencialmente ser usados para el enfoque DVD-Ig para intervención terapéutica: terapias dirigidas a célula B: CD-20, CD-22, CD-19, CD28, CD4, CD80, HLA-DRA, IL10, IL2, IL4, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFSF5, TNFSF6, BLR1, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, ICOSL, IGBP1, MS4A1, RGS1, SLA2, CD81, IFNB1, IL10, TNFRSF5, TNFRSF7, TNFSF5, AICDA, BLNK, GALNAC4S-6ST, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, IL10, IL11, IL4, INHA, INHBA, KLF6, TNFRSF7, CD28, CD38, CD69, CD80, CD83, CD86, DPP4, FCER2, IL2RA, TNFRSF8, TNFSF7, CD24, CD37, CD40, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CR2, IL1R2, ITGA2, ITGA3, MS4A1, ST6GAL1, CD1C, CHST10, HLA-A, HLA-DRA, y NT5E.; señales co-estimuladoras: CTLA4 o B7.1/B7.2; inhibición de supervivencia de célula B: BlyS, BAFF; inactivación de complemento: C5; modulación de citoquina: el principio clave es que la respuesta biológica neta en cualquier tejido es el resultado de un balance entre niveles locales de citoquinas proinflamatorias o anti-inflamatorias (ver Sfikakis PP et al 2005 Curr Opin Rheumatol 17:550-7). Se considera que el SLE es una enfermedad accionada por Th-2 con elevaciones documentadas en suero de IL-4, IL-6, IL-10. También se contemplan DVD Igs capaces de unirse a uno o más objetivos seleccionados del grupo que consiste de IL-4, IL-6, IL-10, IFN-α, y TNF-α. La combinación de los objetivos discutidos aquí anteriormente potenciará la eficacia terapéutica para SLE que puede ser evaluada en un nnúmero de modelos de lupus pre-clínicos (ver Peng SL (2004) Methods Mol Med.; 102:227-72). Con base enla reactividad cruzada de los anticuerpos base para ortólogos humano y de ratón (p.e., reactividad para CD20 humano y de ratón, interferón alfa humana y de ratón, etc.) se pueden conducir estudios de validación en un modelo de lupus de ratón con "anticuerpo subrogado coincidente" derivado de moléculas de DVD-Ig; brevemente, una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos específico de objetivo de ratón puede ser coindicente en la medida de lo posible con las características de los anticuerpos humanos o humanizados base usados para la construcción de la DVD-Ig humana (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar, etc.).

5. Esclerosis Múltiple

La esclerosis mútiple (MS) es una enfermedad del tipo autoinmune humana compleja con una etiología predominantemente desconocida. La destrucción inmunológica de la proteína básica de mielina (MBP) en todo el sistema nervioso es la patollogía más importante de la esclerosis múltiple. La MS es una enfermedad de patologías complejas, que involucra la infiltración por células T CD4+ y CD8+ y de respuesta dentro del sistema nervioso central. La expresión en el SNC de citoquinas, especies reactivas a nitrógeno y moléculas coestimuladoras han sido todas descritas en la MS. De considetación importante son los mecanismos que contribuyen al desarrollo de autoinmunidad. En particular, la expresión de antígeno, las interacciones de citoquina y leucocito, y las células T reguladoras que ayudan a balancear/modular otras células T tales como células Th1 y Th2, son áreas importantes para la identificación del objetivo terapéutico.

La IL-12 es una citoquina proinflamatoria que es producida por APC y promueve la diferenciación de las células efectoras de Th1. La IL-12 es procucida en lesiones en desarrollo de pacientes con MS así como en animales afectados por EAE. Anteriormente se mostró que la interferencia en las turas de IL-12 rvita efectivamente EAE en roedores, y que la neutralización in vivo de IL-12p40 usando un mAb anti-IL-12 tiene efector benéficos en el modelo de EAE inducido por mielona en titíes comunes.

TWEAK es un miembro de la familia de TNF, expresado constitutivamente en el sistema nervioso central (SNC), con efectos pro-inflamatorios, proliferativos o apoptóticos dependiendo de los tipos de células. Su receptor, Fn14, es expresado en el SNC por células endoteliales, astrocitos reactivos y neuronas. La expresión de TWEAK y ARNm Fn14 aumentó en la columna vertebral durante la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE). El tratamiento con anticuerpo Anti-TWEAK en AEA inducida por glicoproteína mielina oligodendrocito (MOG) en ratones C57BL/6 mice produjo una reducción de la severidad de la enfermedad e infiltración de leucocito cuando los ratones eran tratados después de la fase se sebado.

Un aspecto de la invención se relaciona con moléculas DVD Ig capaces de unirse a uno o más, por ejemplo dos, objetivos seleccionados del grupo que consiste de IL-12, TWEAK, IL-23, CXCL13, CD40, CD40L, IL-18, VEGF, VLA-4, TNF, CD45RB, CD200, IFNgamma, GM-CSF, FGF, C5, CD52, y CCR2. Una realización incluye una DVD Ig anti-IL-12/TWEAK específica dual como un agente terapeutico benéfico para el tratamiento de la MS.

Se conocen en la técnica varios modelos animales para evaluar la utilidad de las moléculas DVD para tratar la MS (ver Steinman L, et al., (2005) Trends Immunol. 26(11):565-71; Lublin FD., et al., (1985) Springer Semin Immunopathol.8(3):197-208; Genain CP, et al., (1997) J Mol Med. 75(3):187-97; Tuohy VK, et al., (1999) J Exp Med. 189(7):1033-42; Owens T, et al., (1995) Neurol Clin.13(1):51-73; y 't Hart BA, et al., (2005) J Immunol 175(7):4761-8. Con base en la reactividad cruzada de los anticuerpos base para ortólogos de especies humana y animal (p.e., reactividad para IL-12 humana y de ratón, TWEAK humana y de rarón, etc.) se pueden conducir estudios de validación en el modelo de EAE de ratón con moléculas DVD-Ig de "anticuerpo surrogado coincidente"; brevemente, una DVD-Ig basada en uno (o más) anticuerpos específicos de objetivo de ratón pueden ser coincidentes en la medida de lo posible a las características de los anticuerpos humanos o humanizados base usados para la construcción de DVD-Ig humana (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar, etc.). El mismo concepto aplica para modelos animales de especies no roedoras, en donde una DVD-Ig derivada de "anticuerpo subrogado coincidente" podría ser seleccionada para la farmacología anticipada y posiblemente estudios de seguridad. Además de las evaluaciones de seguridad de rutina de estos pares de objetivos, se pueden justificar pruebas específicas para el grado de inmunosupresión y será de ayuda para seleccionar el mejor par de objetivos (ver Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Jones R. 2000 Rovelizumab (ICOS Corp). IDrugs.3(4):442-6).

6. Sepsis

La patofisiolofgía de la sepsis es iniciada por los componentes de membrana exterior de organismos gram-negativos (lipopolisacárido [LPS],

lípido A, endotoxina) y organismos gram-positivos (ácido lipoteicóico, peptidoglicano). Estos componentes de membrana exterior son capaces de unirse al receptor de CD14 en la superficie de monocitos. En virutd de los recientemente descritos receptores tipo toll, una señal es luego transmitida a la célula, conduciendo a la producción eventual de citoquinas proinflamatorias de factor alfa de necrosis de tumor (TNF-alfa) e interleucina-1 (IL-1). Las respuestas inflamatorias incorntrolables e inmune son características esenciales del choque séptico y juegan un papel central en la patogénesis de daño de tejido, falla de órganos múltiples, y muerte inducida por sepsis. Las citoquinas, especialmente el factor de necrosis de tumor (TNF) e interleucina (IL-1), han mostrado ser mediadores críticos del choque séptico. Estas citoquinas tienen un efecto tóxico directo sobre tejidos; también activan la fosfolipasa A2. Estos y otros efectos conducen a concentraciones aumentadas del factor activador de plaqueta, promoción de la actividad de óxido nítrico sintasa, promoción de infiltración de tejido por neutrófilos, y promoción de la actividad de neutrófilo.

El tratamiento de la sepsis y el choque séptico permanece como in interrogante clínico, y ensayos prospectivos recientes con modificadores de respuesta biológica (p.e. anti-TNF, anti-MIF) apuntaron a que la respuesta inflamatoria ha mostrado solamente beneficio clínico modesto. Recientemente, el interés ha cambiado hacia terapias dirigidas a reversar los períodos acompañantes de supresión inmune. Estudios en animales experimentales y pacientes críticamente enfermos han demostrado que la apoptosis aumentada de órganos linfoides y algunos tejidos parenquimales contribuye con esta supresión inmune, anergia, y disfunción de sistema de órganos. Durante los síndromes de sepsis, la apóptosis de linfocito puede ser desencadenada por la ausencia de IL-2 o por la liberación de glucocorticoides, granzimas, o las llamadas citoquinas 'muertas': factor alfa de necrosis de tumor o ligando Fas. La apóptosis procede mediante auto-activación de caspasas citosólicas y/o mitocondriales, que pueden estar influenciadas porlos miembros pro y anti-apoptóticos de la famillia Bcl-2. En animales experimentales, el tratamiento con inhibidores de apóptosis puede no solo prevenir la apoptosis de célula linfoide, también puede mejorar el resultado. Aunque los ensayos clínicos con agentes anti-apoptóticos permanecen distantes debido en gran parte a las dificultades técnicas asociadas con su administración y marcado de tejido, la inhibición de

la apóptosis de linfocito representa un objetivo terapéutico atractivo para el paciente séptico. Así mismo, un agente específico dual que dirigido al mediador inflamatorio y un mediador apoptótico, puede tener beneficio agregado. Un aspecto de la invención se relaciona con DVD Igs capaces de unirse a uno o más objetivos involucrados en la sepsis, en una realización dos objetivos, seleccionados del grupo que consiste de TNF, IL-1, MIF, IL-6, IL-8, IL-18, IL-12, IL-23, FasL, LPS, receptores tipo Toll, TLR-4, factor de tejido, MIP-2, ADORA2A, CASP1, CASP4, IL-10, IL-1B, NFKB1, PROC, TNFRSF1A, CSF3, CCR3, IL1RN, MIF, NFKB1, PTAFR, TLR2, TLR4, GPR44, HMOX1, midkina, IRAK1, NFKB2, SERPINA1, SERPINE1, y TREM1. La eficacia de tales DVD Igs para la sepsis puede ser evaluada en modelos animales preclínicos conocidos en la técnica (ver Buras JA, et al.,(2005) Nat Rev Drug Discov. 4(10):854-65 y Calandra T, et al., (2000) Nat Med. 6(2):164-70).

7. Trastornos Neurológicos

7.1. Enfermedades Neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas crónicas son usualmente enfermedades dependientes de la edad caracterizadas por pérdida progresiva de las funciones neuronales (muerte celular neuronal, desmielinación), pérmida de la movilidad y pérdida de la memoria. El conocimiento emergente de los mecanismos que subyacen las enfermedades neurodegenerativas crónicas (p.e., enfermedad de Alzheimer) muestra una etiología compleja y se ha reconocido una variedad de factores que contribuyen a su desarrollo y progresión p.e., edad, estado glicémico, producción amiloide y multimerización, la acumulación de productos finales de glicación (AGE) que se unen a su receptor RAGE (receptor para AGE), estrés oxidativo cerebral aumentado, flujo sanguíneo cerebral disminuido, neuroinflamación incluyendo liberación de citoquinas inflamatorias y quimioquinas, disfunción neuronal y activación microglial. Así, estas enfermedades neurodegenerativas crónicas representan una interacción compleja entre múltiples tipos de células y mediadores. Las estrategias de tratamiento para tales enfermedades están limitadas y en su mayoría constituyen el bloqueo de procesos inflamatorios con agentes anti-inflamatorios no específicos (p.e., corticosteroides, inhibidores de COX) o agentes para prevenir la pérdida neuronal y/o funciones sinánticas. Estos tratamientos fallan en detener la progresión de la enfermedad. Estudios recientes sugieren que las terapias más dirigidas, tales como anticuerpos a

péptido A-b soluble (incluyendo las formas oligoméricas de A-b) pueden no solo detener la progresión de la enfermedad sino que también pueden ayudar a mantener la memoria. Estas observaciones preliminares sugieren que las terapias específicas que se dirigen a más de un mediador de enfermedad (p.e.,A-b y una citoquina pro-inflamatoria tal como TNF) pueden proporcionar incluso mejor eficacia terapéutica para enfermedades neurodegenerativas crónicas que las observadas con el marcado a un solo mecanismo de enfermedad (p.e., A-b soluble sola) (ver C.E. Shepherd, et al, Neurobiol Aging. 2005 Oct 24; Nelson RB., Curr Pharm Des. 2005;11:3335; William L. Klein.; Neurochem Int. 2002 ;41:345; Michelle C Janelsins, et al., J Neuroinflammation. 2005; 2:23; Soloman B., Curr Alzheimer Res. 2004;1:149; Igor Klyubin, et al., Nat Med. 2005;11:556-61; Arancio O, et al., EMBO Journal (2004) 1-10; Bornemann KD, et al., Am J Pathol. 2001;158:63; Deane R, et al., Nat Med. 2003;9:907-13; y Eliezer Masliah, et al., Neuron. 2005;46:857).

Las moléculas de DVD-Ig de la invención se pueden unir a uno o más objetivos involucrados en enfermedades neurodegenerativas crónicas tales como Alzheimer. Tales objetivos incluyen, pero no se limitan a, cualquier mediador, soluble o de superficie celular, implicado en la patogénesis de la AD p.e., AGE (S100 A, anfoterina), citoquinas pro-inflamatorias (p.e., IL-1), quimioquinas (p.e., MCP 1), moléculas que inhiben la regeneración de nervio (p.e., Nogo, RGM A), moléculas que potencian el crecimiento de neurita (neurotrofinas). La eficacia de las moléculas de DVD-Ig puede ser validada en modelos animales preclínicos tales como ratones transgénicos que sobre-expresan la proteína precusora amiloide o RAGE y desaroolan síntomas del tipo enfermedad de Alzheimer. Adicionalmente, las moléculas DVD-Ig pueden ser construidas y probadas para eficacia en los modelos animales y se puede seleccionar la mejor DVD-Ig terapéutica para evaluación en pacientes humanos. Las moléculas de DVD-Ig también se pueden emplear para el tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Parkinson. La Alfa-Sinucleina está involucrada en la patología de Parkinson. Una DVD-Ig capaz de dirigirse a la alfa-sinucleina y mediadores inflamatorios tales como TNF, IL-1, MCP-1 puede probar la terapia efectiva para la enfermedad de Parkinson y se contemplan en la invención.

7.2 Regeneración Neuronal y Lesión de Médula Espinal

A pesar del aumento en el conocimiento de los mecanismos patológicos, la lesión de médula espinal (SCI) es aún una condición devastante y representa una indicación médica caracterizadas por una alta necesidad médica. La mayoría de las lesiones de médula espinal son lesiones de contusión o compresión, y la lesión principal es usualmente seguida por mecanismos se lesión secundarios (mediadores inflamatorios p.e., citoquinas y quimioquinas) que empeoran la lesión inicial y producen agrandamiento significativo del área de la lesión, algunas veces de más de 10 veces. Estos mecanismos primarios y secundarios en la SCI son muy similaes a los que la lesión cerebral causada por otros medios p.e., apoplejía. No existe tratamiento satisfactorio y la inyección de bolo de metilprednisolona en altas dosis (MP) es la única terapia utilizada en una ventana de tiempo reducida de 8 h después de la lesión. Este tratamiento, sin embargo, está destinado solamente a evitar la lesión secundaria sin causar ninguna recuperación funcional significativa. Es muy criticada por la falta de eficacia inequívoca y los efectos adversos severos, como inmunosupresión con infecciones posteriores y alteraciones musculares histopatológicas severas. Ningún otro fármaco, biológico o molécula pequeña, que estimula el potencial regenerativo edógeno está aprobado, pero los principios de tratamiento prometedores y los candidatos fármacos han mostrado eficacia en modelos animales de SCI en años recientes. En gran medida, la falta de recuperación funcional en la SCI humana es causada por factores que inhiben el crecimiento de neurita, en los sitios de lesión, en el tejido de cicatriz, en la mielina, así como en las células asociadas con la lesión. Tales factores son las proteínas asociadas con mielina NogoA, OMgp y MAG, RGM A, las CSPG asociadas con cicatrices (Proteoglicanos de Condroitina Sulfato) y factores inhibidores de los astrocitos reactivos (algunas semaforinas y efrinas). Sin embargo, en el sitio de lesión se encuentran no solo moléculas inhibidores de crecimiento sino también factores estimuladores de crecimiento de neurita como neurotrofinas, laminina, L1 y otros. Este conjunto de moléculas inhibidores de crecimiento y promotoras de crecimiento de neurita pueden explicar que el bloqueo de factores solos, como NogoA o RGM A, produjo recuperación funcional significativa en modelos de SCI de roedores, debido a que una reducción de las influencias inhibidoras podría cambiar el balance de inhibición de crecimiento a promoción de crecimiento. Sin embargo, las recuperaciones observadas con el bloqueo de una sola molécula inhibidora del crecimiento de neurita no estaba completo. Para logras recuperaciones más rápidas y pronuniciadas ya sea bloqueado dos moléculas

inhibidoras del crecimiento de neurita, p.e., Nogo y RGM A, o bloqueando una molécula inhibidora del crecimiento de neurita y potenciando las funciones de una molécula potenciadora del crecimiento de neurita, p.e., Nogo y neurotrofinas, o bloqueando una molécula inhibidora del crecimiento de neurita p.e., Nogo y una molécula pro-inflamatoria p.e.,TNF, puede ser deseable (ver McGee AW, et al., Trends Neurosci. 2003;26:193; Marco Domeniconi, et al., J Neurol Sci. 2005;233:43; Milan Makwana1, et al., FEBS J. 2005;272:2628; Barry J. Dickson, Science. 2002;298:1959; Felicia Yu Hsuan Teng, et al., J Neurosci Res. 2005;79:273; Tara Karnezis, et al., Nature Neuroscience 2004; 7, 736; Gang Xu, et al., J. Neurochem.2004; 91; 1018).

En un aspecto, se proveen DVD-Igs capaces de unirse a pares de objetivos tales como NgR y RGM A; NogoA y RGM A; MAG y RGM A; OMGp y RGM A; RGM A y RGM B; CSPGs y RGM A; agrecano, midkina, neurocano, versicano, fosfacano, Te38 y TNF-α; anticuerpos específicos de globulómero Aß combinados con anticuerpos que promueven el brotamiento de dendrita & axón. La patología de dentrita es un signo muy temprano de AD y se conoce que NOGO A restringe el crecimiento de dendrita. Se puede combinar tal tipo de ab con cualquiera de los cantidatos de ab de SCI (mielina-proteínas). Otrso objetivos de DVD-Ig pueden incluir cualquier combinación de NgR-p75, NgR-Troy, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR-Lingo, Lingo-Troy, Lingo-p75, MAG o Omgp. Adicionalmente, los objetivos también pueden incluir cualquier mediador, soluble o de superficie celular, implicado en la inhibidicón de neurita p.e., Nogo, Ompg, MAG, RGM A, semaforinas, efrinas, A-b soluble, citoquinas pro-inflamatorias (p.e.,IL-1), quimioquinas (p.e.,MIP 1a), moléculas que inhiben la regeneración de nervio. La eficacia de anti-nogo / anti-RGM A o moléculas DVD-Ig similares puede ser validada en modelos animales pre-clínicos de lesión de médula espinal. Adicionalmente, estas moléculas de DVD-Ig pueden ser construidas y probadas para eficacia en los modelos animales y se puede serleccionar la mejor DVD-Ig terapéutica para evaluación en pacientes humanos. Adicionalmente, las moléculas de DVD-Ig pueden ser construidas para dirigirse a dos sitios de unión a ligando distintos en un solo receptor p.e., receptor Nogo que se una a tres ligandos Nogo, Ompg, y MAG y RAGE que se une a A-b y S100 A. Adicionalmente, los inhibidores del crecimiento de neurita p.e., nogo y receptor nogo, también juegan un papel en la prevención de la regeneración de nervio en enfermedades inmunológicas como la esclerosis

múltiple. La inhibición de la interacción nogo-receptor nogo ha mostrado potenciar la recuperación en modelos animales de esclerosis múltiple. Por lo tanto, las moléculas de DVD-Ig que pueden bloquear la función de un mediador inmune, p.e., una citoquina como IL-12 y una molécula inhibidora del crecimiento de neurita, p.e., nogo o RGM puede ofrecer eficacia más rápida y mayor que el bloqueo de una molécula inmune o uuna inhibidora del crecimiento de neurita sola.

8. Trastornos Oncológicos

La terapia de anticuerpo monoclonal ha surgido como una modalidad terapéutica importante para el cáncer (von Mehren M, et al 2003 Monoclonal antibody therapy for cancer. Annu Rev Med.; 54:343-69). Los anticuerpos pueden ejercer efectos antitumor induciendo apóptosis, citotoxicidad redirigida, interfiriendo con las interacciones ligando-receptor, o evitando la expresión de proteínas que son críticas para el fenotipo neoplásico. Adicionalmente, los anticuerpos pueden marcar componentes del microamibente del tumor, perturbando estructuras vitales tales como la formación de vasculatura asociada con tumor. Los anticuerpos también pueden marcaro receptores cuyos ligandos son factores de crecimiento, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico. El anticuerpo inhibe así los ligandos naturales que estimulan el crecimiento celular para unión a células de tumor marcadas. Alternativamente, los anticuerpos pueden inducir una red anti-idiotipo, citotoxicidad mediada por complemento, o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). El uso de anticuerpo específico dual que marca dos mediadores de tumor separados probablemente darpa beneficio adicional comparado con una terapia mono-específica. También se contemplan DVD Igs capaces de unirse a los siguientes pares de objetivos para tratar la enfermedad oncológica: IGF1 e IGF2; IGF1/2 y HER-2; VEGFR y EGFR; CD20 y CD3; CD138 y CD20; CD38 y CD20; CD38 y CD138; CD40 y CD20; CD138 y CD40; CD38 y CD40; CD-20 y CD-19; CD-20 y EGFR; CD-20 y CD-80; CD-20 y CD-22; CD-3 y HER-2; CD-3 y CD-19; EGFR y HER-2; EGFR y CD-3; EGFR y IGF1,2; EGFR e IGF1R; EGFR y RON; EGFR y HGF; EGFR y c-MET; HER-2 e IGF1,2; HER-2 e IGF1R; RON y HGF; VEGF y EGFR; VEGF y HER-2; VEGF y CD-20; VEGF e IGF1,2; VEGF y DLL4; VEGF y HGF; VEGF y RON; VEGF y NRP1; CD20 y CD3; VEGF y PLGF; DLL4 y PLGF; ErbB3 y EGFR; HGF y ErbB3, HER-2 y ErbB3; c-Met y ErbB3; HER-2 y PLGF; HER-2 y HER-2.

En otra realización, una DVD de la invención es capaz de unirse a VEGF y fosfatidilserina; VEGF y ErbB3; VEGF y PLGF; VEGF y ROBO4; VEGF y BSG2; VEGF y CDCP1; VEGF y ANPEP; VEGF y c-MET; HER-2 y ERB3; HER-2 y BSG2; HER-2 y CDCP1; HER-2 y ANPEP; EGFR y CD64; EGFR y BSG2; EGFR y CDCP1; EGFR y ANPEP; IGF1R y PDGFR; IGF1R y VEGF; IGF1R y CD20; CD20 y CD74; CD20 y CD30; CD20 y DR4; CD20 y VEGFR2; CD20 y CD52; CD20 y CD4; HGF y c-MET; HGF y NRP1; HGF y fosfatidilserina; ErbB3 y IGF1R; ErbB3 y IGF1,2; c-Met y Her-2; c-Met y NRP1; c-Met y IGF1R; IGF1,2 y PDGFR; IGF1,2 y CD20; IGF1,2 y IGF1R; IGF2 y EGFR; IGF2 y HER2; IGF2 y CD20; IGF2 y VEGF; IGF2 e IGF1R; IGF1 e IGF2; PDGFRa y VEGFR2; PDGFRa y PLGF; PDGFRa y VEGF; PDGFRa y c-Met; PDGFRa y EGFR; PDGFRb y VEGFR2; PDGFRb y c-Met; PDGFRb y EGFR; RON y c-Met; RON y MTSP1; RON y MSP; RON y CDCP1; VGFR1 y PLGF; VGFR1 y RON; VGFR1 y EGFR; VEGFR2 y PLGF; VEGFR2 y NRP1; VEGFR2 y RON; VEGFR2 y DLL4; VEGFR2 y EGFR; VEGFR2 y ROBO4; VEGFR2 y CD55; LPA y S1P; EPHB2 y RON; CTLA4 y VEGF; CD3 y EPCAM; CD40 e IL6; CD40 e IGF; CD40 y CD56; CD40 y CD70; CD40 y VEGFR1; CD40 y DR5; CD40 y DR4; CD40 y APRIL; CD40 y BCMA; CD40 y RANKL; CD28 y MAPG; CD80 y CD40; CD80 y CD30; CD80 y CD33; CD80 y CD74; CD80 y CD2; CD80 y CD3; CD80 y CD19; CD80 y CD4; CD80 y CD52; CD80 y VEGF; CD80 y DR5; CD80 y VEGFR2; CD22 y CD20; CD22 y CD80; CD22 y CD40; CD22 y CD23; CD22 y CD33; CD22 y CD74; CD22 y CD19; CD22 y DR5; CD22 y DR4; CD22 y VEGF; CD22 y CD52; CD30 y CD20; CD30 y CD22; CD30 y CD23; CD30 y CD40; CD30 y VEGF; CD30 y CD74; CD30 y CD19; CD30 y DR5; CD30 y DR4; CD30 y VEGFR2; CD30 y CD52; CD30 y CD4; CD138 y RANKL; CD33 y FTL3; CD33 y VEGF; CD33 y VEGFR2; CD33 y CD44; CD33 y DR4; CD33 y DR5; DR4 y CD137; DR4 e IGF1,2; DR4 e IGF1R; DR4 y DR5; DR5 y CD40; DR5 y CD137; DR5 y CD20; DR5 y EGFR; DR5 e IGF1,2; DR5 e IGFR, DR5 y HER-2, EGFR y DLL4. Otras combinaciones de objetivos incluyen uno o más miembros de la familia EGF/erb-2/erb-3. Otros objetivos (uno o más) involucrados en las enfermedades oncológicas a las que se puede unir la DVD incluyen, pero no se limitan a aquellos seleccionados del grupo que consiste de: CD52, CD20, CD19, CD3, CD4, CD8, BMP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, TNF, TNFSF10, BMP6, EGF, FGF1, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GRP, IGF1, IGF2, IL12A, IL1A, IL1B,

IL2, INHA, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, VEGF, CDK2, FGF10, FGF18, FGF2, FGF4, FGF7, IGF1R, IL2, BCL2, CD164, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, GNRH1, IGFBP6, IL1A, IL1B, ODZ1, PAWR, PLG, TGFB1I1, AR, BRCA1, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, E2F1, EGFR, ENO1, ERBB2, ESR1, ESR2, IGFBP3, IGFBP6, IL2, INSL4, MYC, NOX5, NR6A1, PAP, PCNA, PRKCQ, PRKD1, PRL, TP53, FGF22, FGF23, FGF9, IGFBP3, IL2, INHA, KLK6, TP53, CHGB, GNRH1, IGF1, IGF2, INHA, INSL3, INSL4, PRL, KLK6, SHBG, NR1D1, NR1H3, NR1I3, NR2F6, NR4A3, ESR1, ESR2, NR0B1, NR0B2, NR1D2, NR1H2, NR1H4, NR1I2, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR5A1, NR5A2, NR6A1, PGR, RARB, FGF1, FGF2, FGF6, KLK3, KRT1, APOC1, BRCA1, CHGA, CHGB, CLU, COL1A1, COL6A1, EGF, ERBB2, ERK8, FGF1, FGF10, FGF11, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GNRH1, IGF1, IGF2, IGFBP3, IGFBP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, INSL3, INSL4, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, MMP2, MMP9, MSMB, NTN4, ODZ1, PAP, PLAU, PRL, PSAP, SERPINA3, SHBG, TGFA, TIMP3, CD44, CDH1, CDH10, CDH19, CDH20, CDH7, CDH9, CDH1, CDH10, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH7, CDH8, CDH9, ROBO2, CD44, ILK, ITGA1, APC, CD164, COL6A1, MTSS1, PAP, TGFB1I1, AGR2, AIG1, AKAP1, AKAP2, CANT1, CAV1, CDH12, CLDN3, CLN3, CYB5, CYC1, DAB2IP, DES, DNCL1, ELAC2, ENO2, ENO3, FASN, FLJ12584, FLJ25530, GAGEB1, GAGEC1, GGT1, GSTP1, HIP1, HUMCYT2A, IL29, K6HF, KAI1, KRT2A, MIB1, PART1, PATE, PCA3, PIAS2, PIK3CG, PPID, PR1, PSCA, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, STEAP, STEAP2, TPM1, TPM2, TRPC6, ANGPT1, ANGPT2, ANPEP, ECGF1, EREG, FGF1, FGF2, FIGF, FLT1, JAG1, KDR, LAMA5, NRP1, NRP2, PGF, PLXDC1, STAB1, VEGF, VEGFC, ANGPTL3, BAI1, COL4A3, IL8, LAMA5, NRP1, NRP2, STAB1, ANGPTL4, PECAM1, PF4, PROK2, SERPINF1, TNFAIP2, CCL11, CCL2, CXCL1, CXCL10, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL9, IFNA1, IFNB1, IFNG, IL1B, IL6, MDK, EDG1, EFNA1, EFNA3, EFNB2, EGF, EPHB4, FGFR3, HGF, IGF1, ITGB3, PDGFA, TEK, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFBR1, CCL2, CDH5, COL18A1, EDG1, ENG, ITGAV, ITGB3, THBS1, THBS2, BAD, BAG1, BCL2, CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CDH1 (E-cadherina), CDKN1B (p27Kip1), CDKN2A (p16INK4a), COL6A1, CTNNB1 (b-catenina), CTSB (catepsina B), ERBB2 (Her-2), ESR1, ESR2, F3 (TF), FOSL1 (FRA-1), GATA3, GSN (Gelsolina), IGFBP2, IL2RA, IL6, IL6R, IL6ST (glicoproteína 130), ITGA6

(a6 integrina), JUN, KLK5, KRT19, MAP2K7 (c-Jun), MKI67 (Ki-67), NGFB (NGF), NGFR, NME1 (NM23A), PGR, PLAU (uPA), PTEN, SERPINB5 (maspina), SERPINE1 (PAI-1), TGFA, THBS1 (trombospondina-1), TIE (Tie-1), TNFRSF6 (Fas), TNFSF6 (FasL), TOP2A (topoisomerasa Iia), TP53, AZGP1 (zinc-a-glicoproteína), BPAG1 (plectina), CDKN1A (p21Wap1/Cip1), CLDN7 (claudina-7), CLU (clusterin), ERBB2 (Her-2), FGF1, FLRT1 (fibronectina), GABRP (GABAa), GNAS1, ID2, ITGA6 (a6 integrina), ITGB4 (b 4 integrina), KLF5 (GC Box BP), KRT19 (Keratina 19), KRTHB6 (keratina tipo II específica de cabello), MACMARCKS, MT3 (metalotionectina-III), MUC1 (mucina), PTGS2 (COX-2), RAC2 (p21Rac2), S100A2, SCGB1D2 (lipofilina B), SCGB2A1 (mamaglobina 2), SCGB2A2 (mamaglobina 1), SPRR1B (Spr1), THBS1, THBS2, THBS4, y TNFAIP2 (B94), RON, c-Met, CD64, DLL4, PLGF, CTLA4, fosfatidilserina, ROBO4, CD80, CD22, CD40, CD23, CD28, CD80, CD55, CD38, CD70, CD74, CD30, CD138, CD56, CD33, CD2, CD137, DR4, DR5, RANKL, VEGFR2, PDGFR, VEGFR1, MTSP1, MSP, EPHB2, EPHA1, EPHA2, EpCAM, PGE2, NKG2D, LPA, SIP, APRIL, BCMA, MAPG, FLT3, PDGFR alfa, PDGFR beta, ROR1, PSMA, PSCA, SCD1, y CD59.

IV. Composiciones Farmacéuticas

La invención también provee composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión de la invención y in vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas de unión de la invención son para uso en, pero sin limitarse a, diagnóstico, detección, o monitoreo de un trastorno, para prevenir, tratar, manejar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, y/o en investigación. En una realización específica, una composición comprende una o más proteínas de unión de la invención. En otra realización, la composición farmacéutica comprende una o más proteínas de unión de la invención y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos diferentes a las proteínas de unión de la invención para el tratamiento de un trastorno. En una realización, los agentes profilácticos o terapéuticos conocidos por ser útiles para o que se ha usado o están siendo usados en la prevención, tratamiento, manejo, o alivio de un trastorno o uno o más síntomas del mismo. De acuerdo con estas realizaciones, la composicón puede además comprender un vehículo, diluyente o excipiente.

Las proteínas de unión de la invención pueden ser incorporadas en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende una proteína de unión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa aquí, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todoslos solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicosagentes isotópicos o retardantes de absorción, y similares, que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, se incluyen an la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tal como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humentantes o emulsificantes, preservantes o amortiguadores, que potencian la vida en conservación del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Se conocen varios sistemas de liberación y se pueden usar para administrar uno o más anticuerpos de la invención o la combinación de uno o más anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevenir, manejar, tratar, o aliviar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, p.e., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (ver, p.e., Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos para administrar un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (p.e., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración administration, y administración mucosa adminsitration (p.e., rutas intranasal y oral). En adición, se puede emplear la administración pulmonar, p.e., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerolizante. Ver, p.e., Pat. U.S. Nos. 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y Publicaciones PCT Nos. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO

99/66903, cada una de las cuales está incorporada aquí mediante referencia en sus totalidades. En una realización, una proteína de unión de la invención, terapia de combinación, o una composición de la invención es administrada usando tecnología de liberación de fármaco pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). En una realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención son administrados intramuscularmente, intravenosamente, intratumoralmente, oralmente, intranasalmente, pulmonarmente, o subcutáneamente. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden ser administrados por cualquier ruta conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de los recubrimientos epiteliales o mucocutáneos (p.e., mucosa oral, rectal e intestinal, etc.) y pueden ser administrados junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En una realización, la unión específica de los nanotubos de carbono acoplados a anticuerpo (CNTs) a células de tumor in vitro, seguida por su ablación altamente específica con luz casi infrarroja (NIR) se puede usar para marcar las células de tumor. Por ejemplo, se pueden usar lípidos polares biotinilados para preparar dispersiones de CNT estables, biocompatibles, mononcitotóxicas que son luego unidas a una o dos DVD-Igs derivadas con avidina de neutralito dirigidas contra uno o más antígenos de tumor (p.e., CD22) (Chakravarty, P. et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:8697-8702.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención localmente al área en necesidad de tratamiento; esto se puede lograr mediante, por ejemplo, y no a manera de limitación, infusión local, mediante inyección, o por medio de un impante, siendo dicho implante de un material poroso o no poroso, incluyendo membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (p.e., Tissuel®), o matrices de colágeno. En una realización, se administra una cantidad efectiva de uno o más antagonistas de anticuerpos de la invención localmente al área afectada a un sujeto paraprevenir, tratar, manejar, y/o aliviar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra realización, se administra una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos de la invención localmente al área afectada en combinación con una cantidad efectiva de una o más terapias (p.e., uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) diferentes a

una proteína de unión de la invención, de un sujeto para prevenir, tratar, manejar, y/o aliviar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico puede ser liberado en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida. En una realización, se puede usar una bomba para lobrar la liberación controlada o sostenida (ver Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (ver p.e., Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; ver también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); Pat. U.S. No. 5,679,377; Pat. U.S. No. 5,916,597; Pat. U.S. No. 5,912,015; Pat. U.S. No. 5,989,463; Pat. U.S. No. 5,128,326; Publicación PCT No. WO 99/15154; y Publicación PCT No. WO 99/20253. Ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etilen-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poliglicolidos (PLG), polianhídridos, poli(N- vinil pirrolidona), poli(vinil alcohol), poliacrilamida, poli(etilene glicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidos) (PLGA), y poliortoésteres. En una realización, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas removibles, estable al almacenamiento, estéril, y biodegradable. En ya otra realización, un sistema de liberación controlada o sostenida puede ser colocado en la proximidad del objetivo profiláctico o terapéutico, requiriendo así solamente una fracción de la dosis sistémica (ver, p.e., Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Los sistemas de liberación controlada son discutidos en la revisión de Langer (1990, Science 249:1527-1533). Se puede usar cualquier técnica conocida por el experto en el arte para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Ver, p.e., Pat. U.S. No. 4,526, 938, Publicación PCT WO 91/05548, Publicación

PCT WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotheraphy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science &Technology 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polimeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, y Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759- 760, cada una de las cuales está incorporada aquí mediante referencia en su totalidad.

En una realización específica, cuando la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido ácido puede ser administrado in vivo para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de forma que se vuelva intracelular, p.e., mediante el uso de un vector retroviral (ver Pat. U.S. No. 4,980,286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (p.e., una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes transfectantes, o administrándolo en enlace con un péptido del tipo homeobox que es conocido por entrar al núcleo (ver, p.e., Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868). Alternativamente, un ácido nucleico puede ser introducido intracelularmente e incorporado dentro del ADN de la célula hospedera para expresión mediante recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención es formulada para ser compatible con su ruta de administración prevista. Ejemplos de rutas de aministración incluyen, pero no se limitan a, parenteral, p.e., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (p.e., inhalación), transdérmica (p.e., tópica), transmucosa, y administración rectal. En una realización específica, la composición es formulada de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal, o tópica ha seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la

composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la invención serán administradas tópicamente, las composiciones pueden ser formuladas enla forma de un unguento, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, atomizador, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por el experto en la técnica. Ver, p.e., Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). En una realización, para formas de dosificación tópicas no atomizables, se emplean formas semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatiblees con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica mayor que la del agua. Formulaciones adecuadas incuyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, unguentos, polvos, linimentos, bálsamos, y similares, que están, si se desea, esterilizados o mezclados con agentes auxiliares (p.e., preservantes, estabilizantes, agentes humectantes, amortiguadores, o sales) para influir en varias propiedades, tales como, por ejemplo, presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones en aerosol atomizables en donde el ingrediente activo, en una realización, en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, es empacado en una mezcla con un volátil presurizado (p.e., un propelente gaseoso, tal como freón) o en una botella exprimible. También se pueden agregar humectantes o hidratantes a las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación, si se desea. Ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en ta técnica.

Si el método de la invención comprende administración intranasal de una composición, la composición puede ser formulada en una forma de aerosol, atomizador, rocío o en la forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para uso de acuerdo con la presente invención pueden ser liberados convenientemente en la forma de una presencación den atomizador de empaques presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (p.e., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede ser determinada proporcionando una válcula para liberar una cantidad dosificada. Las cápsulas

y cartuchos (compuestos de, p.e., gelatina) para uso en un inhalador o insuflador pueden ser formuladas conteniendo una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Si el método de la invención comprende administración oral, las composiciones pueden ser formuladas oralmente en la forma de tabletas, cápsulas, cachets, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones, y similares. Las tabletas o cápsulas pueden ser preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p.e., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, o hidroxipropil metilcelulosa); rellenos (p.e., lactosa, celulosa microcristalina, o hidrógeno fosfato de calcio); lubricantes (p.e., estearato de magnesio, talco, o sílice); desintegrantes (p.e., almidón de papa o almidón glicolato de sodio); o agentes humectantes (p.e., lauril sulfato de sodio). Las tabletas pueden ser recubiertas por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, pero sin limitarse a, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden ser presentados como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso. Tales preparaciones líquidas pueden ser preparadas por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptable tales como agentes de suspensión (p.e., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsificantes (p.e., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p.e., aceite de almendra, ésteres oleosos, etil alcohol, o aceites vegetales fraccionados); y preservantes (p.e., metil o propyl-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones pueden también contener sales amortiguadoras, agentes saborizantes, colorantes, y endulzantes según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden ser convenientemente formuladas para liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de agente(s) profiláctico(s) o terapéutico(s).

El método de la invención puede comprender administración pulmonar, p.e., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente aerosolizante. Ver, p.e., Pat. U.S. Nos. 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y Publicaciones PCT Nos. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903, cada una de las cuales está

incorporada aquí mediante referencia en su totalidad, En una realización específica, una proteína de unión de la invención, terapia de combinación, y/o composición de la invención es administrada usando tecnología de liberación de fparmaco pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método de la invención puede comprender la administración de una composición formulada para administración parenteral mediante inyección (p.e., mediante inyección de bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden estar presentadas en formas de dosificación unitaria (p.e., en ampollas o en recipientes de dosis múltiples) con un preservante adecuado. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado (p.e., agua libre de pirógeno estéril) antes de uso.

Los métodos de la invención pueden adicionalmente comprender la administacipón de composiciones formuladas como preparaciones depósito. Tales formulaciones de acción larga pueden ser administradas mediante implantación (p.e., subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones pueden ser formuladas con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (p.e., como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles (p.e., como una sal moderadamente soluble).

Los métodos de la invención abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como los derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones son suministrados ya sea separadamente o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sachet que indica la cantidad de agente activo. Cuando el modo de administración es infusión, la composición puede ser dispensada con una botella de infusión que contiene agua de grado farmacéutico estéril o solución salina. Cuando el modo de administración es por inyección, se puede proveer una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de forma que los ingredientes pueden ser mezclados antes de la administración.

En particular, la invención también provee que uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención sean empacados en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sachet que indica la cantidad del agente. En una realización, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención es suministrado como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado, y puede ser reconstituido (p.e., con agua o solución salina) a la concentración apropiada para administración a un sujeto. En una realización, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención son suministradas como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado en una dosificación unitaria de al menos 5 mg, al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg, o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las composiciones farmacéuticas de la invención deben ser almacenadas entre 2° C y 8° C en su recipiente original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención deben ser administradas dentro de 1 semana, p.e., dentro de 5 días, dentro de 72 horas, dentro de 48 horas, dentro de 24 horas, dentro de 12 horas, dentro de 6 horas, dentro de 5 horas, dentro de 3 horas, o dentro de 1 hora después de ser reconstituida. En una realización alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención son suministrados en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración del agente. En una realización, la forma líquida de la composición administrada es suministrada en un

recipiente herméticamente sellado de al menos 0.25 mg/ml, al menos 0.5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2.5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe ser almacenada entre 2° C y 8° C en su recipiente original.

Las proteínad de unión de la invención pueden ser incorporadas en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. En una realización, el anticuerpo o porciones de anticuerpo se prepararán como una solución inyectable que contiene 0.1-250 mg/ml de proteína de unión. La solución inyectable puede estar compuesta de un líquido o una forma de dosificación liofilizada en un flint o vial ámbar, ampolla o jeringa pre-llenada. El amortiguador puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10mM, a pH 5.0 a 7.0 (óptimamente pH 6.0). Otros amortiguadores adecuados incluyen pero no se limitan a, succionato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Se puede usar cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 0-10% de sacarosa (óptimamente 0.5-1.0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes volumétricos para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 1-10% de manitol (óptimamente 2-4%). Se pueden usar estabilizantes en las formas de dosificación líquidas y liofilizadas, principalmente L-Metionina 1-50 mM (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes volumétricos incluyendo glicina, arginina, pueden ser incluidos como 0-0.05% de polisorbato-80 (óptimamente 0.005-0.01%). Surfactantes adicionales incluyen, pero no se limitan a polisorbato 20 y surfactantes BRIJ. La composición farmacéutica que comprende las proteínas de unión de la invención preparadas como una solución inyectable para administración parenteral, pueden además comprender un agente útil como un adyuvante, tales como los usados para aumentar la absorción, o dispersión de una proteína terapéutica (p.e., anticuerpo). Un adyuvante particularmente útil es hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana después de la administración parenteral, particularmente la administración subcutánea. También permite mayores volúmenes en el sitio de

inyección (p.e. mayores de 1 ml) con menos dolor e incomodidad, e incidencia mínima de reacciones en el sitio de inyección. (ver WO2004078140, y US2006104968 incorporada aquí mediante referencia).

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (p.e., soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma elegida depende del modo de administración previsto y la aplicación terapéutica. Las composiciones típicas están en la forma de soluciones inyectables o infusible, tales como composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de humanos con otros anticuerpos. El modo de administración elegido es parenteral (p.e., intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización, el anticuerpo es administrado por infusión o inyección intravenosa. En otra realización, el anticuerpo es administrado mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas deben típicamente ser estériles bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estérles pueden ser preparadas incorporando el compuesto activo (p.e., anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados aquí, según se requiera, seguido por esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los aquí enumerados. En el caso de polvos estériles liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y secado por asperción que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula deseado en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada incluyendo,

en la composición, un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las proteínas de unión de la presente invención pueden ser administradas mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, en una realización, la ruta/modo de administración es inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como lo apreciará el experto, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede ser preparado con un vehículo que protegerá el compuesto contra liberación rápida, tal como una formulaciónde liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de liberación microencapsilados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilen vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Ver, p.e., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

En ciertas realizaciones, una proteína de unión de la invención puede ser admnistrada oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehpiculo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) pueden también estar encerrados en una cápsula de gelatina de cáscara blanda o dura, comprimido en tabletas, o incorporado directamente en la dieta del sujecto. Para administración terapéutica oral, los compuestos pueden ser incorporados con excipientes y usados en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trozos, cápsulas, elíxires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto de la invención mediante administración diferente a parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con un material para evitar su inactivación.

También se pueden incorporar compuestos activos complementarios a las composiciones. En ciertas realizaciones, una proteína de unión de la invención es doformulada con y/o coadministrada con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de trastornos, con la

proteína de unión de la invención. Por ejemplo, una proteína de unión de la invención puede ser coformulada y/o coadministrada con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otros objetivos (p.e., anticuerpos que se unen a otras citoquinas o que se unen a moléculas de superficie celular). Adicionalmente, uno o más anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosis menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando asó posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diferentes monoterapias.

En ciertas realizaciones, una proteína de unión está enlazada a un vehículo que extiende la vida media, conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio Fc, polietilen glicol, y dextrano. Tales vehículso están descritos, p.e., en la Solicitud U.S. Serial No. 09/428,082 y Solicitud PCT publicada No. WO 99/25044, las cuales están aquí incorporadas mediante referencia para cualquier propósito.

En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de unión de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico de la invención, son administradas para tratar, prevenir, manejar, o aliviar un trastorno o uno o más síntomas del mismo a manera de terapia del gen. La terapia del gen se refiere a terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o que se puede expresar. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o agente profiláctico o terapéutico de la invención que media un efecto profiláctico o terapéutico.

Cualquiera de los métodos para la terapia del gen disponibles en la técnica se puede usar de acuerdo con la presente invención. Para revisions generales de los métodos de terapia del gen, ver Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu y Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, Science 260:926- 932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la arte de tecnología de ADN recombinante que se pueden usar, están descritos en

Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990). La descripción detallada de varios métodos de terapia del gen están revelados en US20050042664 A1 que está incorporada aquí mediante referencia.

Las proteínas de unión de la invención son útles en el tratamiento de varias enfermedades en donde los objetivos que son reconocidos por las proteínas de unión son perjudiciales. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis soriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, soriasis, dermatitis escleroderma, enfermedad de injerto versus hospedero, rechazo de trasplante de órgano, enfermedad immune aguda o crónica asociada con transplante de órgano, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasíticas, síndrome de inmunodeficiencia adqurido, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, malignancias, falla cardíaca, infarto al miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular esporádica tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de distress respiratorio del adulto (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía soriática, artropatía colítica ulcerativa, sinovitis enteropática, artropatía asociada con clamidia, yersinia y salmonela, espondiloartopatía, enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis, alergia atópica, enfermedad ampollar autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica positiva de Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis mialgica/Enfermedad del Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de célula gigante, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis

autoinmune criptogénica, Síndrome de Enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida, Enfermedades Relacionadas con la Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogamaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, falla ovaria, falla ovaria prematura, enfermedad de pulmón fibrótico, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad de tejido conectivo asociada con enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad de tejido conectivo mezclado asociada con enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada con lupus sistémico, enfermedad pulmonar asociada con dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada con enfermedad de Sjögren, enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármaco, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrante linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo-1 (autoinmune clásica o hepatitis lupoide), hepatitis autoimmune tipo-2 (hepatitis de anticuerpo anti-LKM), hipoglicemia mediada autoimmune, resistencia a la insulina tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad immune aguda asociada con transplante de órgano, enfermedad immune crónica asociada con transplante de órgano, osteoartrosis, colangitis esclerosante primaria, soriasis tipo 1, soriasis tipo 2, ileucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritidas, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de lyme, lupus eritomatoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad de esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad de tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nudosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjörgren's, enfermedad de Takayasu/arteritis, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroide autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune goitrous (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixoedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitiligo enfermedad del hígado aguda, enfermedades crónicas del hígado, cirrosis alcohólica, lesión

de hígado inducida por alcohol, colestasis, enfermedad del hígado idiosincrática, hepatitis inducida por fármaco, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por estreptococos del grupo B (GBS), trastornos mentales (p.e., depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas por Tipo Th2 y Tipo Th1, dolor agudo y crónico (formas diferentes de dolor), y cánceres tales como pulmonar, de seno, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y cáncer rectal y malignancias hematopoyéticas (leucemia y linfoma), Abetalipoprotemia, Acrocianosis, procesos parasíticos o infecciosos agudos y crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, falla renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos aéreos, complejo de demencia por SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo de aloinjerto, deficiencia de alfa-l-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de célula de cuerno anterior, terapia anti cd3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arteriosclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación atrial (sostenida o paroxismal), palpitación atrial, bloqueo atrioventricular, linfoma de célula B, rechazo de injerto óseo, rechazo de trasplante de médula espinal (BMT), bloqueo de rama, linfoma de Burkitt, quemaduras, arritmias cardíacas, síndrome de aturdimiento cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación de bypass cardiopulmonar, rechazo de trasplante de cartílago, degeneraciones corticales cerebelares, trastornos cerebelares, taquicardia caótica o auricular multifocal, trastornos asociados con quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), intoxicación crónica con salicilato, carcinoma colorrectal, falla cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis de contacto, cor pulmonale, enfermedad de arteria coronaria, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis negativa de cultivo, fibrosis quística, trastornos asociados con terapia de citoquina, Demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre de dengue hemorrágico, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad ateriosclerótica diabética, enfermedad de cuerpo de Lewy Difuso, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos de los ganglios basales, síndrome de Down en la edad media, trastornos de movimiento inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC, sensibilidad a

fármaco, eccema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglottitis, infección por virus de epstein-barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y cerebelares, linfohistocitosis hematofagocítica familiar, rechazo de implante de timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos arteriales periféricos funcionales, sepsis fúngica, gangrena con gas, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, sepsis gram negativa, sepsis gram positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de célula vellosa, enfermedad de Hallerrorden-Spatz, tiroiditis de hashimoto, fiebre del heno, rechazo de transplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias de rama His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimiento hiperquinético, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis hipersensible, hipertensión, trastornos de movimiento hipoquinético, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpo, astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza a, exposición a radiación ionizante, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesión de isquemia-reperfusión, ataque isquémico, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo de transplante de riñón, legionela, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo de trasplante de hígado, linfedema, malaria, linfoma maligno, histocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococemia, enfermedades metabólicas/idiopáticas, dolor de cabeza de migraña, trastorno de multi sistema mitocondrial, enfermedad de tejido conectivo mezclado, gamopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, micobacteria aviar intracellular, micobacteria tuberculosis, síndrome mielodisplástico, infarto al miocardio, trastornos isquémicos miocárdicos, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonary crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofias musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma diferente de hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos arteriales oclusivos, terapia okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos de orquitis/reversión de vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo de trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignancia, rechazo de transplante paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad

pericárdica, enfermedad aterosclerotica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía de neumocistis carinii, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gamopatía monoclonal, y síndrome de cambios en la piel), síndrome post perfusión, síndrome post bombeo, síndrome de cardiotomía post-MI, preeclampsia, Parálisis de supranúcleo Progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación, fenómeno y enfermedad de Raynaud, enfermedad de Raynoud, enfermedad de Refsum, taquicardia QRS angosto y regular, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, demencia Senil del tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, choque, anemia de célula falciforme, rechazo de aloinjerto de piel, síndrome de cambios en la piel, rechazo de transplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelares, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, sincope, sífilis del sistema cardiovascular, anafalaxis sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arthritis reumatoide juvenil de aparición sistémica, célula T o FAB ALL, Telangiectasia, tromboangitis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, transplantes, trauma/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad del tipo III, hipersensibilidad del tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades cardíacas valvulares, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis vital/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico vital asociado, síndrome de Wernicke-Korsakoff, enfermedad de Wilson, rechazo de xeno injerto de cualquier órgano o tejido (ver Peritt et al. Publicación PCT No. WO2002097048A2, Leonard et al., publicación PCT No. WO9524918 A1, y Salfeld et al., publicación PCT No. WO00/56772A1).

Las proteínas de unión de la invención se pueden usar para tratar humanos que sufren de enfermedades autoinmunes, en particular aquellas asociadas con inflamación, incluyendo artritis reumatoide, espondilitis, alergia, diabetes autoinmune, uveítis autoinmune. En una realización, las proteínas de unión de la invención o porciones de unióna antígenod elas mismas, se usan para tratar artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de insulina y psoriasis.

En una realización, las enfermedades que pueden ser tratadas o fdiagnosticadas con las composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, cánceres primarios y metastáticos, incluyendo carcinomas de seno, colon, recto, pulmón, orofaríngeo, hipofaríngeo, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula y ductos biliares, intestino delgado, tracto urinario (incluyendo riñón, vejiga y urotelio), tracto genital femenino (incluyendo cervix, útero, y ovarios así como coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestational), tracto genital masculino (incluyendo próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de célula germinal), glándulas endocrinas (incluyendo las glándulas tiroides, adrenal, y pituitaria), y piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluyendo aquellos que aparecen del hueso y tejidos blandos así como sarcoma de Kaposi), tumores del cerebro, nervios, ojos, y meninges (incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, Schwannomas, y meningiomas), tumores sólidos que surgen de malignancias hematopoyéticas tales como leucemias, y linfomas (linfomas de Hodgkin's y diferentes a Hodgkin.

En una realización, los anticuerpos de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos, se usan para tratar cáncer o en la prevención de metástasis de los tumores aquí descritos ya sea cuando se usan solos o en combinación con radioterapia y/u otros agenter quimioterapéuticos.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden ser combinados con agentes que incluyen, pero no se limitan a, agentes antineoplásicos, radioterapia, quimioterapia tales como agentes alquilantes de ADN, cisplatino, carboplatino, agentes anti-tubulina, paclitaxel, docetaxel, taxol, doxorubicina, gemcitabina, gemzar, antraciclinas, adriamicina, inhibidores de topoisomerasa I, inhibidores de topoisomerasa II, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, irinotecan, inhibidores del receptor de tirosina quinasa (p.e., erlotinib, gefitinib), inhibidores de COX-2 (p.e., celecoxib), inhibidotes de quinasa, y siRNAs.

Una proteína de unión de la invención también puede ser administrada con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles en el tratamiento de varias enfermedades.

Una proteína de unión de la invención se puede usar sola o en combinación para tratar tales enfermedades. Se debe entender que las proteínas de unión se pueden usar solas o en combinación con un agente adicional, p.e., un agente terapéutico, siendo dicho agente adicional seleccionado por el experto para su propósito previsto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica por ser útile para tratar la enfermedad o condición que es tratada por el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional puede ser un agente que confiere un atributo adicional a la composición terapéutica p.e., un agente que efectúa la viscosidad de la composición.

Se entenderá además que las combinaciones que se incluirán en esta invención son aquellas combinaciones útiles para su propósito previsto. Los agentes indicados a continuación son ilustrativos para los propósitos y no pretender ser limitantes. Las combinaciones, que son parte de esta invención, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado de las listas siguientes. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, p.e., dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función prevista.

Las combinaciones para tratar enfermedades autoinmunes e inflamatorias son fármaco(s) anti-inflamatorio(s) no esteroidal(es) también referidos como AINES, que incluyen fármacos como ibuprofeno. Otras combinaciones son corticosteroides incluyendo prednisolona; los efectos secundarios bien conocidos del uso de esteroide pueden ser reducidos o incluso eliminados disminuyendo gradualmente la dosis de esteriode requerida cuando se tratan pacientes en combinación con las DVD Igs de esta invención. Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para artritis reumatoide con los cuales se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo de la invención incluyen los siguientes: fármaco8s) anti-inflamatorios supresito(s) de citoquina (CSAIDs); anticuerpos a o antagonists de las citoquinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-23, interferones, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Las proteínas de unión de la invención, o porciones de unión a antígeno de las mismas, se pueden combinar con anticuerpos a moléculas de

superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA o sus ligandos incluyendo CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones de agentes terapéuticos pueden interferir en diferentes puntos con la cascada autoinmune e inflamatoria posterior; ejemplos incluyen antagonistas de TNF como anticuerpos de TNF quiméricos, humanizados o humanos, ADALIMUMAB, (Publicación PCT No. WO 97/29131), CA2 (Remicade™), CDP 571, y receptores de TNF p55 o p75 solubles, derivados de los mismos, (p75TNFR1gG (Enbrel™) o p55TNFR1gG (Lenercept), y también inhibidores de la enzima convertidora de TNFα (TACE); igualmente inhibidores de IL-1 (inhibidores de la enzima convertidora de Interleucina-1, IL-1RA etc.) pueden ser efectivos por la misma razón. Otras combinaciones incluyen Interleucina 11. Ya otra combinación incluye actores claves de la respuesta autoinmune que pueden actuar en paralelo con, dependientes de o en conjunto con la función de IL-12; especialmente son antagonistas de IL-18 incluyendo anticuerpos IL-18 o receptores de IL-18 solubles, o proteínas de unión a IL-18. Se ha mostrado que IL-12 e IL-18 tienen superposición pero funciones distintas y una combinación de antagonistas a ambos puede ser la más efectiva. Ya otra combinación son los inhibidores anti-CD4 no depletores. Ya otras combinaciones incluyen antagonistas de la ruta co-estimuladora de CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) incluyendo anticuerpos, receptores soluble o ligandos antagonísticos.

Las proteínas de unión de la invención pueden también ser combinadas con agentes tales como metotrexato, 6-MP, azatioprina sulfasalazina, mesalazina, olsalazina cloroquinina/hidroxicloroquina, pencilamina, aurotiomalato (intramuscular y oral), azatioprina, cocicina, corticosteroides (orales, inhalados y de inyección local), agonistas del adrenoreceptor beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeteral), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromil, ketotifen, ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, AINEs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tal como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adensosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citoquinas proinflamatorias tales como TNF-α o IL-1 (p.e.,

IRAK, NIK, IKK , p38 o inhibidores de MAP quinasa), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β, inhibidores de la enzima convertidora de TNFα (TACE), inhibidores de la señalización de célula T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, enhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquina solubles y derivados de los mismos (p.e., receptores de TNF p55 o p75 soluble y los derivados p75TNFRIgG (Enbrel™ y p55TNFRIgG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citoquinas anti-inflamatorias (p.e., IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ), celecoxib, ácido fólico, sulfato de hidroxicloroquina, rofecoxib, etanercept, infliximab, naproxeno, valdecoxib, sulfasalazina, metilprednisolona, meloxicam, metilprednisolona acetato, tiomalato de oro y sodio, aspirina, triamcinolona acetonida, propoxifeno napsilato/apap, folato, nabumetona, diclofenaco, piroxicam, etodolac, diclofenaco sodio, oxaprozina, oxycodona hcl, hidrocodona bitartrato/apap, diclofenaco sodio/misoprostol, fentanilo, anakinra, recombinante humano, tramadol hcl, salsalato, sulindac, cianocobalamina/fa/piridoxina, acetaminofen, alendronato sodio, prednisolona, sulfato de morfina, clorhidrato de lidocaína, indometacina, glucosamina sulf/condroitina, amitriptilina hcl, sulfadiazina, oxicodona hcl/acetaminofen, olopatadina hcl, misoprostol, naproxeno sodio, omeprazol, ciclofosfamida, rituximab, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, anti-IL-18, Anti-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, Roflumilast, IC-485, CDC-801, y Mesopram. Las combinaciones incluyen metotrexato o leflunomida y en casos de artritis moderada o severa, ciclosporina.

Agentes adicionales no limitantes que se pueden usar en combinación con una proteína de unión para tratar la artritis reumatoide incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: fármaco(s) anti-inflamatorio(s) no esteroidal(es) (AINEs); fármaco(s) anti-inflamatorio(s) no esteroidal(es) supresores de citoquina (CSAIDs); CDP-571/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNFα; Celltech/Bayer); cA2/infliximab (anticuerpo anti-TNFα quimérico; Centocor); 75 kdTNFR-IgG/etanercept (proteína de fusión de receptor de TNF-IgG de 75 kD; Immunex; ver *p.e., Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 55 kdTNF-IgG (proteína de fusión de receptor de TNF-IgG de de 55 kD; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (anticuerpo anti-CD4 primatizado no depletor; IDEC/SmithKline; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1995) Vol. 38, S185); DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteínas

de fusión de IL-2; Seragen; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1993) Vol. 36, 1223); Anti-Tac (anti-IL-2Rα humanizado; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (citoquina anti-inflamatoria; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante, citoquina anti-inflamatoria; DNAX/Schering); agonistas de IL-4; IL-10 y/o IL-4 (p.e., anticuerpos agonistas); IL-1RA (antagonista del receptor de IL-1; Synergen/Amgen); anakinra (Kineret®/Amgen); TNF-bp/s-TNF (proteína de unión a TNF soluble; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S284; *Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology* (1995) Vol. 268, pp. 37-42); R973401 (inhibidor de fosfodiesterasa Tipo IV; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S282); MK-966 (inhibidor de COX-2; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S81); Iloprost (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S82); metotrexato; talidomida (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S282) y fármacos relacionados con talidomida (p.e., Celgen); leflunomida (anti-inflamatorio e inhibidor de citoquina; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S131; *Inflammation Research* (1996) Vol. 45, pp. 103-107); ácido tranexámico (inhibidor de la activación de plasminógeno; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S284); T-614 (inhibidor de citoquina; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S282); prostaglandina E1 (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S282); Tenidap (fármaco anti-inflamatorio no esteroidal; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S280); Naproxeno (fármaco anti-inflamatorio no esteroidal; ver p.e., *Neuro Report* (1996) Vol. 7, pp. 1209-1213); Meloxicam (fármaco anti-inflamatorio no esteroidal); Ibuprofeno (fármaco anti-inflamatorio no esteroidal); Piroxicam (fármaco anti-inflamatorio no esteroidal); Diclofenaco (fármaco anti-inflamatorio no esteroidal); Indometacina (fármaco anti-inflamatorio no esteroidal); Sulfasalazina (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S281); Azatioprina (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S281); inhibidor de ICE (inhibidor de la enzima convertidora de interleucina-1β); inhibidor de zap-70 y/o lck (inhibidor de la tirosina quinasa zap-70 o lck); inhibidor de VEGF y/o inhibidor de VEGF-R (inhibidores del factor de crecimiento celular vascular endotelial o receptor del factor de crecimiento celular vascular endotelial; inhibidores de angiogénesis); fármacos anti-inflamatorio corticosteroides (p.e., SB203580); inhibidores de TNF-convertasa; anticuerpos anti-IL-12; anticuerpos anti-IL-18; interleucina-11

(ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S296); interleucina-13 (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S308); inhibidores de interleucina-17 (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (complemento), S120); oro; penicilamina; cloroquina; clorambucil; hidroxicloroquina; ciclosporina; ciclofosfamida; irradiación linfoide total; globulina anti-timocito; anticuerpos anti-CD4; CD5-toxinas; péptidos administrados oralmente y colágeno; lobenzarit disódico; Agentes Reguladores de Citoquina (CRAs) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); oligo-deoxinucleótidos fosforotiodato en contrasentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 de complemento soluble (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; glicosaminoglicano polisulfato; minociclina; anticuerpos anti-IL2R; lípidos marinosy botánicos (ácidos grasos de pescado y semilla de planta; ver p.e., *DeLuca et al.* (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-777); auranofina; fenilbutazona; ácido meclofenámico; ácido flufenámico; globulina inmune intravenosa; zileuton; azaribina; ácido micofenólico (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicina); amiprilosa (terafectina); cladribina (2-clorodesoxiadenosina); metotrexato; inhibidores de bcl-2 (ver Bruncko, Milan et al., Journal of Medicinal Chemistry (2007), 50(4), 641-662); y agentes moduladores inmunes antivirales.

En una realización, la proteína de unión o proción de unión a antígeno de la misma, es administrada en combinación con uno de los siguientes agentes para el tratamiento de artritis reumatoide: inhibidor de molécula pequeña de KDR, inhibidor de molécula pequeña de Tie-2; metotrexato; prednisona; celecoxib; ácido fólico; sulfato de hidroxicloroquina; rofecoxib; etanercept; infliximab; leflunomida; naproxeno; valdecoxib; sulfasalazina; metilprednisolona; ibuprofeno; meloxicam; acetato de metilprednisolona; tiomalato de oro y sodio; aspirina; azatioprina; triamcinolona acetonida; propxifeno napsilato/apap; folato; nabumetona; diclofenaco; piroxicam; etodolac; diclofenaco sodio; oxaprozina; oxicodona hcl; hidrocodona bitartrato/apap; diclofenaco sodio/misoprostol; fentanil; anakinra, recombinante humana; tramadol hcl; salsalato; sulindac; cianocobalamina/fa/piridoxina; acetaminofen; alendronato sodio; prednisolona; sulfato de morfina; clorhidrato de lidocaína; indometacina; sulfato de glucosamina/condroitina; ciclosporina; amitriptilina hcl; sulfadiazina; oxicodona hcl/acetaminofen; olopatadina hcl;

misoprostol; naproxeno sodio; omeprazol; micofenolato mofetil; ciclofosfamida; rituximab; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-IG; IL-18 BP; IL-12/23; anti-IL 18; anti-IL 15; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; Roflumilast; IC-485; CDC-801; y mesopram.

Ejemplos no limitantes de agentes terapeuticos para la enfermedad inflamatoria del intestino con los cuales una proteína de unión de la invención se puede combinar, incluyen los siguientes: budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipoxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas del receptor de IL-1; mAbs anti-IL-1β; mAbs anti-IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de elastasa; compuestos de piridinil-imidazol; anticuerpos a o antagonistas de otras citoquinas o factores de crecimiento humanos, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden ser combinados con anticuerpos a moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, también se pueden combinar con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, AINEs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tal como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización mediante citoquinas proinflamatorias tales como TNFα o IL-1 (p.e., IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de MAP quinasa), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β, inhibidores de la enzima convertidora de TNFα, inhibidores de la señalización de célula T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquina solubles y derivados de los mismos (p.e., receptores de TNF p55 o p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) y citoquinas antiinflamatorias (p.e.,IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ) e inhibidores de bcl-2.

Ejemplos de agentes terapeuticos para la enfermedad de Crohn con los cuales se puede combinar una proteína de unión incluyen los siguientes:

antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, ADALIMUMAB (Publicación PCT No. WO 97/29131; HUMIRA), CA2 (REMICADE), CDP 571, constructos de TNFR-Ig, inhibidores (p75TNFRIgG (ENBREL) y p55TNFRIgG (LENERCEPT)) e inhibidores de PDE4. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden ser combinados con corticosteroides, por ejemplo, budenosida y dexametasona. Las proteínas de unión de la invención o porciones de unión a antígeno de las mismas, también pueden ser combinadas con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico y olsalazina, y agentes que interfieren con la síntesis o acción de las citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β e IL-1ra. Los anticuerpos de la invención o porción de unión a antígeno de los mismos también se pueden usar con inhibidores de la señalización de célula T, por ejemplo, inhibidores de tirosina quinasa 6-mercaptopurinas. Las proteínas de unión de la invención, o porciones de unión a antígeno de las mismas, se pueden combinar con IL-11. Las proteínas de unión de la invención, o porciones de unión a antígeno de las mismas, se pueden combinar con mesalamina, prednisona, azatioprina, mercaptopurina, infliximab, metilprednisolona succinato de sodio, difenoxilato/sulfato atrop, clorhidrato de loperamida, metotrexato, omeprazol, folato, ciprofloxacina/agua con dextrosa, hidrocodona bitartrato/apap, clorhidrato de tetraciclina, fluocinonida, metronidazol, timerosal/ácido bórico, colestiramina/sacarosa, clorhidrato de ciprofloxacina, sulfato de hiosciamina, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de midazolam, oxicodona hcl/acetaminofen, clorhidrato de prometazina, fosfato de sodio, sulfametoxazol/trimetoprim, celecoxib, policarbofil, napsilato de propoxifeno, hidrocortisona, multivitaminas, balsalazida disódica, fosfato de codeína/apap, colesevelam hcl, cianocobalamina, ácido fólico, levofloxacina, metilprednisolona, natalizumab e interferon-gamma.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple con los cuales se pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen los siguentes: corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporinae; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferon-β1a (AVONEX; Biogen); interferon-β1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferon α-n3) (Interferon Sciences/Fujimoto), interferon-α (Alfa Wassermann/J&J), interferon β1A-IF (Serono/Inhale

Therapeutics), Peginterferon α 2b (Enzon/Schering-Plough), Copolímero 1 (Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; clabribina; anticuerpos a o antagonistas de otras citoquinas o factores de crecimiento humanos y sus receptores, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Proteínas de unión de la invención pueden ser combinadas con anticuerpos a moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Las proteínas de unión de la invención, también pueden ser combinadas con agentes, tales como metotrexato, ciclosporinae, FK506, rapamicina, micofenolaro mofetil, leflunomida, AINEs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tal como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adensosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citoquinas proinflamatorias tales como TNFα o IL-1 (p.e., IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de MAP quinasa), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β, inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de célula T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquina solubles y derivados de los mismos (p.e.,receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citoquinas antiinflamatorias (p.e., IL-4, IL-10, IL-13 y TGFβ) e inhibidores de bcl-2.

Ejemplos de agentes terapéuticos para esclerosis múltiple con los cuales se pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen interferon-β, por ejemplo, IFNβ1a y IFNβ1b; copaxona, corticosteroides, inhibidores de caspasa, por ejemplo inhibidores de caspasa-1, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF, y anticuerpos a ligando de CD40 y CD80.

Las proteínas de unión de la invención también pueden ser combinadas con agentes, tales como alemtuzumab, dronabinol, Unimed, daclizumab, mitoxantrona, clorhidrato de xaliproden, fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinabidol, una-inmunoquina NNSO3, ABR-215062, AnergiX.MS, antagonistas del receptor de quimioquina, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulada con liposoma), THC.CBD (agonista canabinoide) MBP-8298, mesopram (inhibidor de PDE4), MNA-715, anticuerpo

del receptor anti-IL-6, neurovax, pirfenidona allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, talampanel, teriflunomida, TGF-beta2, tiplimotida, antagonistas de VLA-4 (por ejemplo, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), antagonistas de gamma interferon, agonistas de IL-4.

Ejemplos no limitantes de agentes terapeuticos para Angina con los cuales se pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: aspirina, nitroglicerina, mononitrato de isosorbida, succinato de metoprolol, atenolol, tartrato de metoprolol, besilato de amlodipina, clorhidrato de diltiazem, dinitrato de isosorbida, bisulfato de clopidogrel, nifedipina, atorvastatina calcio, cloruro de potasio, furosemida, simvastatina, verapamil hcl, digoxin, propranolol clorhidrato, carvedilol, lisinopril, espironolactona, hidroclorotiazida, enalapril maleato, nadolol, ramipril, enoxaparin sodio, heparina sodio, valsartan, clorhidrato de sotalol, fenofibrato, ezetimibe, bumetanida, losartan potasio, lisinopril/hidroclorotiazida, felodipina, captopril, bisoprolol fumarato.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Espondilitis anquilosante con los cuales de pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: ibuprofeno, diclofenaco y misoprostol, naproxeno, meloxicam, indometacina, diclofenaco, celecoxib, rofecoxib, Sulfasalazina, Metotrexato, azatioprina, minociclina, prednisona, etanercept, infliximab.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Asma con los cuales de pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: albuterol, salmeterol/fluticasona, montelukast sodio, propionato de fluticasona, budesonida, prednisona, salmeterol xinafoato, levalbuterol hcl, albuterol sulfato/ipratropio, prednisolona fosfato de sodio, triamcinolona acetonida, dipropionato de beclometasona, bromuro de ipratropio, azitromicina, acetato de pirbuterol, prednisolona, teofilina anhidra, metilprednisolona succinato de sodio, claritromicina, zafirlukast, fumarato de formoterol, vacuna del virus de la influenza, metilprednisolona, trihidrato de amoxicilina, flunisolida, inyección de alergia, cromolin sodio, clorhidrato de fexofenadina, flunisolida/mentol, amoxicilina/clavulanato, levofloxacina, dispositivo de ayuda inhalador, guaifenesina, dexametasona fosfato de sodio, moxifloxacina hcl,

doxiciclina hiclato, guaifenesina/d-metorfan, p-efedrina/cod/clorfenir, gatifloxacina, clorhidrato de cetirizina, mometasona furoato, salmeterol xinafoato, benzonatato, cefalexin, pe/hidrocodona/clorfenir, cetirizina hcl/pseudoefed, fenilefrina/cod/prometazina, codeína/prometazina, cefprozil, dexametasona, guaifenesina/seudoefedrina, clorfeniramina/hidrocodona, nedocromil sodio, sulfato de terbutalina, epinefrina, metilprednisolona, silfato de metaproterenol.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para EPOC con los cuales de pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: sulfato de albuterol/ipatropio, bromuro de ipatropio, salmeterol/fluticasona, albuterol, salmeterol xinafoato, fluticasone propionato, prednisona, teofilina anhidra, metilprednisolona succinato de sodio, montelukast sodio, budesonida, fumarato de formoterol, triamcinolona acetonida, levofloxacina, guaifenesina, azitromicina, beclometasona dipropionato, levalbuterol hcl, flunisolida, ceftriaxona sodio, amoxicilina trihidrato, gatifloxacina, zafirlukast, amoxicilina/clavulanato, flunisolida/mentol, clorfeniramina/hidrocodona, metaproterenol sulfato, metilprednisolona, furoato de mometasona, p-efedrina/cod/clorfenir, acetato de pirbuterol, p-efedrina/loratadina, sulfato de terbutalina, bromuro de tiotropio, (R,R)-formoterol, TgAAT, Cilomilast, Roflumilast.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para HCV con los cuales de pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: Interferon-alfa-2a, Interferon-alfa-2b, Interferon-alfa con1, Interferon-alfa-n1, interferon-alfa-2a pegilada, interferon-alfa-2b pegilada, ribavirina, Peginterferon alfa-2b + ribavirina, ácido Ursodesoxicólico, Ácido Glicirrícico, Timalfasina, Maxamina, VX-497 y cualquier compuesto que se use para tratar HCV mediante intervención con los siguentes objetivos: polimerasa de HCV, proteasa de HCV, helizasa de HCV, IRES (sitio de entrada de ribosoma interno) de HCV.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Fibrosis Pulmonar Idiopática con los cuales de pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: prednisona, azatioprina, albuterol, colcicina,

sulfato de albuterol, digoxina, gama interferon, metilprednisolona sod succ, lorazepam, furosemida, lisinopril, nitroglicerina, espironolactona, ciclofosfamida, bromuro de ipatropio, actinomicina d, alteplasa, propionato de fluticasona, levofloxacina, sulfato de metaproterenol, sulfato de morfina, oxicodona hcl, cloruro de potasio, triamcinolona acetonida, tacrolimus anhidro, calcio, interferon-alfa, metotrexato, micofenolato mofetil, Interferon-gamma-1β.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Infarto al miocardio con los cuales de pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: aspirina, nitroglicerina, metoprolol tartrato, enoxaparina sodio, heparina sodio, bisulfato de clopidogrel, carvedilol, atenolol, sulfato de morfina, metoprolol succinato, warfarina sodio, lisinopril, isosorbida mononitrato, digoxin, furosemida, simvastatina, ramipril, tenecteplasa, enalapril maleato, torsemida, retavasa, losartan potasio, quinapril hcl/mag carb, bumetanida, alteplasa, enalaprilat, clorhidrato de amiodarona, tirofiban hcl m-hidrato, clorhidrato de diltiazem, captopril, irbesartan, valsartan, propranolol clorhidrato, fosinopril sodio, clorhidrato de lidocaína, eptifibatida, cefazolin sodio, sulfato de atropina, ácido aminocapróico, espironolactona, interferon, clorhidrato de sotalol, cloruro de potasio, docusato sodio, dobutamina hcl, alprazolam, pravastatina sodio, atorvastatina calcio, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de meperidina, dinitrato de isosorbida, epinefrina, clorhidrato de dopamina, bivalirudina, rosuvastatina, ezetimibe/simvastatina, avasimibe, cariporida.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para soriasis con los cuales de pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: inhibidor de molécula pequeña de KDR, inhibidor de molécula pequeña de Tie-2, calcipotrieno, clobetasol propionato, triamcinolona acetonida, propionato de halobetasol, tazaroteno, metotrexato, fluocinonida, betametasona diprop aumentado, fluocinolona acetonida, acitretina, champú de alquitrán tar, valerato de betametasona, mometasono furoato, ketoconazol, pramoxina/fluocinolona, hidrocortisona valerato, flurandrenolida, úrea, betametasona, clobetasol propionato/emoll, fluticasona propionato, azitromicina, hidrocortisona, formula hidratante, ácido fólico, desonida, pimecrolimus, alquitrán de hulla, diflorasona diacetato, etanercept folato, ácido láctico, metoxsalen, hc/bismuto subgal/znox/resor, acetato de

metilprednisolona, prednisona, pantalla solar, halcinonida, ácido salicílico, antralina, pivalato de clocortolona, extracto de hulla, alquitrán de hulla / ácido salicílico, alquitrán de hulla / ácido salicílico /azufre, desoximetasona, diazepam, emolliente, fluocinonida/emoliente, aceite mineral /aceite de ricino /na lact, aceite mineral / aceite de cacahuete, petróleo /isopropil miristato, psoralen, ácido salicílico, jabón /tribromsalan, timerosal/ácido bórico, celecoxib, infliximab, ciclosporinae, alefacept, efalizumab, tacrolimus, pimecrolimus, PUVA, UVB, sulfasalazina.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Artritis Soriática con los cuales de pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: metotrexato, etanercept, rofecoxib, celecoxib, ácido fólico, sulfasalazina, naproxeno, leflunomida, acetato de metilprednisolona, indometacina, sulfato de hidroxicloroquina, prednisona, sulindac, betametasona diprop aumentado, infliximab, metotrexato, folato, triamcinolona acetonida, diclofenaco, dimetilsulfóxido, piroxicam, diclofenaco sodio, ketoprofeno, meloxicam, metilprednisolona, nabumetona, tolmetin sodio, calcipotrieno, ciclosporinae, diclofenaco sodio/misoprostol, fluocinonida, sulfato de glucosamina, tiomalato de oro y sodio, hidrocodona bitartrato/apap, ibuprofeno, risedronato sódico, sulfadiazina, tioguanina, valdecoxib, alefacept, efalizumab e inhibidores de bcl-2.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Restenosis con los cuales de pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: sirolimus, paclitaxel, everolimus, tacrolimus, Zotarolimus, acetaminofen.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Ciatica con los cuales de pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: hidrocodona bitartrato/apap, rofecoxib, ciclobenzaprina hcl, metilprednisolona, naproxeno, ibuprofeno, oxicodona hcl/acetaminofen, celecoxib, valdecoxib, acetato de metilprednisolona, prednisona, fosfato de codeína/apap, tramadol hcl/acetaminofen, metaxalona, meloxicam, metocarbamol, clorhidrato de lidocaína, diclofenaco sódico, gabapentina, dexametasona, carisoprodol, ketorolac trometamina, indometacina, acetaminofen, diazepam, nabumetona, oxicodona hcl, tizanidina hcl,

diclofenaco sódico/misoprostol, propoxifeno napsilato/apap, asa/oxicod/oxicodona ter, ibuprofeno/hidrocodona bit, tramadol hcl, etodolac, propoxifeno, amitriptilina hcl, carisoprodol/codeína fos/asa, sulfato de morfina, multivitaminas, naproxeno sódico, citrato de orfenadrina, temazepam.

Ejemplos de agentes terapéuticos para SLE (Lupus) en los cuales se pueden combinar las proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: AINEs, por ejemplo, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, piroxicam, indometacina; inhibidores de COX2, por ejemplo, Celecoxib, rofecoxib, valdecoxib; anti-malaria, por ejemplo, hidroxicloroquina; esteroides, por ejemplo, prednisona, prednisolona, budenosida, dexametasona; Citotóxicos, por ejemplo, azatioprina, ciclofosfamida, micofenolaro mofetil, metotrexato; inhibidores de PDE4 o inhibidor de la síntesis de purina, por ejemplo Cellcept. Las proteínas de unión de la invención, también pueden ser combinadas con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, olsalazina, Imuran y agentes que interfieren con la síntesis, producción o acción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de caspasa como inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β e IL-1ra. Las proteínas de unión de la invención también se pueden usar con inhibidores de la señalización de célula T, por ejemplo, inhibidores de tirosina quinasa; o moléculas que se dirigen a moléculas de activación de célula T, por ejemplo, anticuerpos de la familia CTLA-4-IgG o anti-B7, anticuerpos de la familia anti-PD-1. Las proteínas de unión de la invención pueden ser combinadas con IL-11 o anticuerpos anti-citoquina, por ejemplo, fonotolizumab (anticuerpo anti-IFNg), o anticuerpos del receptor anti-receptor, por ejemplo, anticuerpo del receptor anti-IL-6 y anticuerpos a moléculas de superficie de célula B. Los anticuerpos de la invención o porción de unión a antígeno de los mismos también se pueden usar con LJP 394 (abetimus), agentes que repletan o inactivan las células B, por ejemplo, Rituximab (anticuerpo anti-CD20), linfostat-B (anticuerpo anti-BlyS), antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, Adalimumab (Publicación PCT No. WO 97/29131; HUMIRA), CA2 (REMICADE), CDP 571, constructos de TNFR-Ig, (p75TNFRIgG (ENBREL) y p55TNFRIgG (LENERCEPT)) e inhibidores de bcl-2, porque se ha demostrado que la sobre expression de bcl-2 en ratones transgénicos causa un fenotipo del tipo lupus (ver Marquina, Regina et al., Journal of Immunology (2004), 172(11), 7177-7185), por lo tanto se espera que la inhibición tenga efectos terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de una proteína de unión de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de unión puede ser determinada por un experto en la técnica y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la proteína de unión para producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo, o porción de anticuerpo, es superada por los efectos terapéuticos benéficos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en un estado temprano de enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los regimens de dosis pueden ser ajustados para proveer la respuesta deseada óptima (p.e., una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede ser proporcionalmenrte reducida o aumentada de acuerdo a las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente vejatoso formula composiciones parenterales en formas de dosis unitarias para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención son dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular a ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de compuestos tales como un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un rango ejemplar, no limitante para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de una proteína de unión de la invención es 0.1-20 mg/kg, por ejemplo, 1-10 mg/kg. Se notará que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y severidad de la condición a ser aliviada. Se entenderá además que para cualquier sujeto particular, los regimens de dosificación específicos deben ser ajustados en el tiempo de acuerdo con la necesidad del individuo y el juicio professional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación indicados aquí son ejemplares solamente y no pretenden limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada.

Será obvio para los expertos en la técnicas que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la invención aquí descritos son obvios y se pueden hacer usando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de la invención o las realizaciones aquí reveladas. Habiendo descrito la presente invención en detalle, la misma sera entendida más claramente mediante la referencia a los siguientes ejemplos, los cuales están incluidos para propósitos de ilustración solamente y no pretenden ser limitantes de la invención.

V. Diagnóstico

La revelación presente también prove aplicaciones diagnósticas. Esto se aclara adicionalmente a continuación.

I. Método de Ensayo

La presente revelación también prove un método para determinar la presencia, cantidad o concentración de un analito (o un fragmento del mismo) en una muestra de prueba, usando al menos una DVD-Ig aquí descrita. Se puede usar en el método cualquier ensayo adecuado como se conoce en la técnica. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayo, tal como inmunoensayo en emparedado (p.e., inmunoensayos de emparedado de monoclonal, policlonal y/o de DVD-Ig o cualquier variación del mismo (p.e., monoclonal/DVD-Ig, DVD-Ig/policlonal, etc.), incluyendo detección de radioisótopo (radioinmunoensayo (RIA)) y detección de enzimas (inmunoensayo de enzimas (EIA) o ensayo inmunosorbente ligado a enzima

(ELISA) (p.e., ensayos de ELISA Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN))), inmunoensayo de inhibición competitiva (p.e., delantera y reversa), inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA), técnica de inmunoensayo multiplicado por enzimas (EMIT), transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET), y ensayo quimiloluminiscente homogéneo, etc. En un ensayo basado en SELDI, un reactivo de captura que se une específicamente a un analito (o un fragmento del mimos) de interés está unido a la superficie de una sonda de espectrometría de masas, tal como un arreglo de chip de proteína pre-activado. El analito (o un fragmento del mismo) es luego capturado específicamente en el biochip, y el analito capturado (o un fragmento del mismo) es detectado mediante espectrometría de masas. Alternativamente, el analito (o un fragmento del mismo) puede ser eluido del reactivo de captura y detectado mediante MALDI tradicional (deserción/ionización láser asistida por matriz) o mediante SELDI. Un inmunoensayo de micropartícula quimioluminiscente, en particular uno que emplea el analizador automático ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), es un ejemplo de un inmunoensayo preferido.

Los métodos bien conocidos en la técnica para recolectar, manipular y procesar orina, sangre, suero y plasma, y otros fluidos corporales, se usan en la práctica de la presente revelación, por ejemplo, cuando se emplea una DVD-Ig aquí descrita como un reactivo de inmunodiagnóstico y/o en un kit de inmunoensayo. La muestra de prueba puede comprender mitades adicionales además del analito de interés, tales como anticuerpos, antígenos, haptenos, hormonas, fármacos, enzimas, receptores, proteínas, péptidos, polipéptidos, oligonucleótidos y/o polinucleótidos. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de sangre entera obtenida de un sujeto. Puede ser necesario o deseado que una muestra de prueba, particularmente sangre entera, sea tratada antes del inmunoensayo aquí descrito, p.e., con un reactivo de pretratamiento. Incluso en casos en donde el pretratamiento no es necesario (p.e., la mayoría de las muestras de orina), el pretratamiento puede hacerse opcionalmente (p.e., como parte de un régimen sobre una plataformacomercial).

El reactivo de pretratamiento puede ser cualquier reactivo apropiado para uso con el inmunoensayo y los kits de la invención. El pretratamiento

comprende opcionalmente: (a) uno o más solventes (p.e., metanol y etilen glicol) y opcionalmente sal, (b) uno o más solventes y sal, y opcionalmente, detergente, (c) detergente, o (d) detergente y sal. Los reactivos de pretratamiento son conocidos en la técnica, y tal pretratamiento se puede emplear, p.e., como se usa para los ensayos sobre analizadores Abbott TDx, AxSYM®, y ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), como se describe en la literatura (ver, p.e., Yatscoff et al., Abbott TDx Monoclonal Antibody Assay Evaluated for Measuring Ciclosporinae in Whole Blood, Clin. Chem. 36: 1969-1973 (1990), y Wallemacq et al., Evaluation of the New AxSYM Ciclosporinae Assay: Comparison with TDx Monoclonal Whole Blood and EMIT Ciclosporinae Assays, Clin. Chem. 45: 432-435 (1999)), y/o como están disponibles comercialmente. Adicionalmente, el pretratamiento puede hacerse como se describe en la Pat. U.S. de Abbott No. 5,135,875, Pub. De Pat. Europea No. 0 471 293, Sol. De Pat. Provisional U.S 60/878,017, presentada el 29 de Diciembre de 2006, y Pub. de Sol. de Pat. U.S. No. 2008/0020401 (incorporada mediante referencia en su totalidad para sus enseñanzas con respecto al pretratamiento). El reactivo de pretratamiento puede ser un agente heterogéneo o un agente homogéneo.

Con el uso de un reactivo de pretratamiento heterogéneo, el reactivo de pretratamiento precipita la proteína de unión analito (p.e., proteína que se puede unir a un analito o un fragmento del mismo) presente en la muestra. Tal paso de pretratamiento comprende remover cualquier proteína de unión analito separando la proteína de unión analito precipitada del sobrenadante de la mezcla formada mediante la adición del agente de pretratamiento a la muestra. En tal ensayo, el sobrenadante de la mezcla ausente de ualquier proteína de unión se usa en el ensayo, procediendo directamente al paso de captura del anticuerpo.

Con el uso de un reactivo de pretratamiento homogéneo no hay tal paso de separación. La mezcla entera de la muestra de prueba y el reactivo de pretratamiento son contactados con un compañero de unión específico marcado para el analito (o un fragmento del mismo), tal como un anticuerpo anti-analito marcado (o un fragmento antigénicamente reactivo del mismo). El reactivo de pretratamiento empleado para tal ensayo es típicamente diluido en la mezcla de muestra de prueba pretratada, ya sea antes o durante la capture

por el primer compañero de unión específica. A pesar de tal dilución, una cierta cantidad del reactivo de pretratamiento aún está presente (o permanece) en la mezcla de muestra de prueba durante la captura. De acuerdo con la invención, el compañero de unión específica marcado puede ser una DVD-Ig (o un fragmento, un variante, o un fragmento de un variante del mismo).

En un formato heterogéneo, después que la muestra de prueba es obtenida de un sujero, se prepara una primera mezcla. La mezcla contiene la muestra de prueba que es evaluada para un analito (o un fragmento del mismo) y un primer compañero de unión específico, en donde el primer compañero de unión específico y cualquier analito contenido en la muestra de prueba forman un complejo primer compañero de unión específico-analito. Preferiblemente, el primer compañero de unión específico Preferiblemente, el primer compañero de unión específica es un anticuerpo anti-analito o un fragmento del mismo. El primer compañero de unión específica puede ser una DVD-Ig (o un fragmento, un variante, o un fragmento de un variante del mismo) aquí descrito. El orden en el cual la muestra de prueba y el primer compañero de unión específica se agregan para formar la mezcla no es crítico. Preferiblemente, el primer compañero de unión específica es inmovilizado sobre una fase sólida. La fase sólida usada en el inmunoensayo (para el primer compañero de unión específica y, opcionalmente, el segundo compañero de unión específica) pueden ser cualquier fase sólida conocida en la técnica, tal como, pero sin limitarse a, una partícula magnética, una perla, una sonda de prueba, una placa microtituladora, una cubeta, una membrana, una molécula de andamiaje, una película, un papel filtro, un disco y un chip.

Después que se forma la mezcla que contiene el complejo primer compañero de unión específica-analito, cualquier analito no unido es removido del complejo usando cualquier técnica conocida en el arte. Por ejemplo, el analito no unido puede ser removido mediante lavado. En forma deseada, sin embargo, el primer compañero de unión específica está presente en exceso de cualquier analito presente en la muestra de prueba, de forma que el analito que está presente en la muestra de prueba está enlazado por el primer compañero de unión específica.

Después de remover cualquier analito no unido, se agrega un segundo compañero de unión específica a la mezcla para formar un complejo primer

compañero de unión específica-analito-segundo compañero de unión específica. El segundo compañero de unión específica es prefeiblemente un anticuerpo anti-analito que se une a un epítopo sobre el analito que difiere del epítopo en el analito unido por el primer compañero de unión específica. Más aún, también preferiblemente, el segundo compañero de unión específica es marcado con o contiene un marcador detectable aquí descrito. El segundo compañero de unión específica puede ser una DVD-Ig (o un fragmento, un variante, o un fragmento de un variante de la misma) aquí descrito.

Se puede usar cualquier marcador detectable adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, el marcador detectable pueder ser un marcador radioactivo (tal como ^{3}H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, ^{32}P, y ^{33}P), un marcados enzimático (tal como peroxidada de rábano picante, peroxidada alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, y similares), un marcador quimioluminiscente (tal como ésteres de acridinio, tioésteres, o sulfonamidas; luminol, isoluminol, ésteres de fenantridinio, y similares), un marcador fluorescente (tal como fluoresceína (p.e., 5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexacloro-fluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, y similares)), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, puntos cuánticos (p.e., selenida de cadmio papado con sulfuro de zinc), un marcador termométrico, o un marcador de reacción en cadena de inmuno-polimerasa. Una introducción a marcadores, procedimientos de marcado y detección de marcadores se encuentra en Polak y Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2nd ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), y en Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1996), que es un manual combinado y catálogo publicado por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon. Un marcador fluorescente se puede usar en FPIA (ver, p.e., Patentes U.S. Nos. 5,593,896, 5,573,904, 5,496,925, 5,359,093, y 5,352,803, que están aqui incorporadas mediante referencia en sus totalidades). Se puede usar un compuesto de acridinio como un marcador detectable en un ensayo quimioluminiscente homogéneo o heterogéneo (ver, p.e., Adamczyk et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 16: 1324-1328 (2006); Adamczyk et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 4: 2313-2317 (2004); Adamczyk et al., Biorg. Med. Chem. Lett. 14: 3917-3921 (2004); y Adamczyk et al., Org. Lett. 5: 3779-3782 (2003)).

Un compuesto de acridinio preferido es una acridinio-9-carboxamida. Métodos para preparar acridinio 9-carboxamidas se describen en Mattingly, J. Biolumin. Chemilumin. 6: 107-114 (1991); Adamczyk et al., J. Org. Chem. 63: 5636-5639 (1998); Adamczyk et al., Tetrahedron 55: 10899-10914 (1999); Adamczyk et al., Org. Lett. 1: 779-781 (1999); Adamczyk et al., Bioconjugate Chem. 11: 714-724 (2000); Mattingly et al., In Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications; Dyke, K. V. Ed.; CRC Press: Boca Raton, pp. 77–105 (2002); Adamczyk et al., Org. Lett. 5: 3779-3782 (2003); y Pat. U.S. Nos. 5,468,646, 5,543,524 y 5,783,699 (cada una de las cuales está incorporada aquí mediante referencia en su totalidad para sus enseñanzas con respecto a las mismas). Otro compuesto de acridinio preferido es un aril éster de acridinio-9-carboxilato. Un ejemplo de un aril éster de acridinio-9-carboxilato es 10-metil-9-(fenoxicarbonil)acridinio fluorosulfonato (disponible en Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Métodos para preparer aril ésteres de acridinio 9-carboxilato se describen en McCapra et al., Photochem. Photobiol. 4: 1111-21 (1965); Razavi et al., Luminescence 15: 245-249 (2000); Razavi et al., Luminescence 15: 239-244 (2000); y Patente U.S. No. 5,241,070 (cada uno de los cuales está incorporado aquí mediante referencia en su totalidad para sus enseñanzas a este respecto). Detalles adicionales con respecto al aril ester acridinio-9-carboxilato y su uso se indican en US 2008-0248493.

Los ensayos quimioluminiscentes (p.e., usando acridinio descrito anteriormente u otro agente quimioluminiscente) se pueden realizar de acuerdo con los métodos descritos en Adamczyk et al., Anal. Chim. Acta 579(1): 61-67 (2006). Aunque se puede usar cualquier formato de ensayo adecuado, un quimioluminómetro de microplaca (Mithras LB-940, Berthold Technologies U.S.A., LLC, Oak Ridge, TN) permite el ensayo de múltiples muestras de pequeños volúmenes rápidamente.

El orden en el cual se agregan la muestra de prueba y compañeros(s) de unión específica para formar la mezcla para ensayo quimioluminiscente no es crítico. Si el primer compañero de unión específica está marcado detectablemente con un agente quimioluminiscente tal como un compuesto de acridinio, se forman los complejos primer compañero de unión específica-analito marcados detectablemente. Alternativamente, si se usa un segundo compañero de unión específica y el segundo compañero de unión específica está marcado detectablemente con un agente quimioluminiscente tal como un

compuesto de acridinio, se forman los complejos primer compañero de unión específica-analito-segundo compañero de unión específica marcados detectablemente. Cualquier compñero de unión específica no unido, ya sea marcado o no marcado, puede ser removido de la mezlca usando cualquier técnica conocida en el arte, tal como lavado.

Se puede generar peroxide de hidrógeno in situ en la mezcla o puede ser proveído o proporcionado a la mezcla (p.e., siendo la fuente del peroxide de hidrógeno uno o más amortiguadores u otras soluciones que son conocidas por contener peróxido de hidrógeno) antes, simultáneamente con, o después de la adición de un compuesto de acridinio descrito anteriormente. El peroxide de hidrógeno puede ser generado in situ de varias formas como sería obvio para el experto en la técnica.

A la adición simultánea o posterior de al menos una solución básica a la muestra, se genera una señal detectable, a saber, una señal quimioluminiscente, indicadora de la presencia de analito. La solución básica contiene al menos una base y tiene un pH mayor oigual a 10, preferiblemente, mayor o igual a 12. Ejemplos de soluciones básicas incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de amonio, hidróxido de magnesio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, y bicarbonato de calcio. La cantidad de solución básica agregada a la muestra depende de la concentración de la solución básica. Con base en la concentración de la solución básica, un experto en la técnica puede fácilmente determinar la cantidad de solución básica a agregar a la muestra.

La señal quimioluminiscente que es generada puede ser detectada usando técnicas de rutina conocidas por los expertos en la técnica. Con base en la intensidad de la señal generada, se puede cuantificar la candidad de analito en la muestra. Específicamente, la cantidad de analito en la muestra es proporcional a la intensidad de la señal generada. La cantidad de analito presente puede ser cuantificada comparando la cantidad de luz generada con una curva estándar para analito o por comparación con un estándar de referencia. La curva estándar puede ser generada usando diluciones o soluciones seriales de concentraciones conocidas de analito mediante espectroscopía de masas, métodos gravimétricos, y otras técnicas conocidas

en el arte. Aunque lo anterior se describe con énfasis en el uso de un compuesto de acridinio como el agente quimioluminiscente, el experto puede fácilmente adaptar esta descripción para uso de otros agentes quimioluminiscentes.

Los inmunoensayos de analito pueden generalmente ser conducidos usando cualquier formato conocido en la técnica, tal como, pero sin limitarse a, formato de emparedado. Específicamente, en un formato de inmunoensayo, se emplean al menos dos anticuerpos para separar y cuantificar el analito, tales como analito humano, o un fragmento del mismo en una muestra. Más específicamente, los al menos dos anticuerpos se unen a diferentes epítopos en un analito (o un fragmento del mismo) formando un complejo inmune, que es referido como un "emparedado." Generalmente, en los inmunoensayos, uno o más anticuerpos pueden ser usados para capturar el analito (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba (estos anticuerpos son frecuentemente referidos como un anticuerpo de "captura" o anticuerpos de "captura") y se pueden usar uno o más anticuerpos para unirse a un marcador detectable (a saber, cuantificable) al emparedado (estos anticuerpos son frecuentemente referidos como el "anticuerpo de detección", los "anticuerpos de detección", el "conjugado", o los "conjugados"). Así, en el contexto de un formato de inmunoensayo en emparedado, una DVD-Ig (o un fragmento, un variante, o un fragmento de un variante del mismo) aquí descrito se puede usar como un anticuerpo de captura, un anticuerpo de detección, o ambos. Por ejemplo, una DVD-Ig que tiene un dominio que se puede unar a un first epítopo en un analito (o un fragmento del mismo), se puede usar como un anticuerpo de captura y/o otra DVD-Ig que tiene un dominio que se puede unir a un segundo epítopo en un analito (o un fragmento del mismo) se puede usar como un anticuerpo de detección. En este aspecto, una DVD-Ig que tiene un primer dominio que se puede unir a un primer epítopo en un analito (o un fragmento del mismo) y un segundo dominio que se puede unir a un segundo epítopo en un analito (o un fragmento del mismo) se puede usar como un anticuerpo de captura y/o un anticuerpo de detección. Alternativamente, una DVD-Ig que tiene un primer dominio que se puede unir a un epítopo en un primer analito (o un fragmento del mismo) y un segundo dominio que se puede unir a un epítopo en un segundo analito (o un fragmento del mismo) se puede usar como un anticuerpo de captura y/o un anticuerpo de detección para detectar, y opcionalmente

cuantificar, dos o más analitos. En el caso que un analito pueda estar presente en una muestra en más de una forma, tal como forma monomérica y una forma dimérica/multimérica, las cuales pueden ser homoméricas o heteroméricas, una DVD-Ig que tiene un dominio que se puede unir a un epítopo que es solamente expuesto a la forma monomérica y otra DVD-Ig que tiene un dominio que se puede unir a un epítopo en una parte diferente de una forma dimérica/multimérica, se pueden usar como anticuerpos de captura y/o anticuerpos de detección, permitiendo así la detección, y cuantificación opcional, de diferentes formas en un analito dado. Adicionalmente, el empleo de DVD-Igs con afinidades diferenciales dentro de una sola DVD-Ig y/o entre DVD-Igs puede proporcionar una ventaja de avidez. En el contexto de los inmunoensayos aquí descritos, puede ser generalmente útil o deseable incorporar uno o más enlazantes dentro de la estructura de una DVD-Ig. Cuando está presente, óptimamente el enlazante debe ser de suficiente longitude o flexibilidad structural para permitir la unión de un epítopo por los dominios internos así como la unión de otro epítopo por los dominios externos. En este aspecto, si una DVD-Ig se puede unir a dos analitos diferentes, y un analito es más grande que el otro, de manera deseada, el analito más grande es unido por los dominios exteriores.

Generalmente hablando, una muestra que es evaluada para (por ejemplo, se sospecha que contiene) analito (o un fragmento del mismo) puede ser contactada con al menos un anticuerpo de captura (o anticuerpos) y al menos un anticuerpo de detección (que puede ser un segundo anticuerpo de detección o un tercer anticuerpo de detección, o incluso un anticuerposucesivamente numerado, p.e., como cuando el anticuerpo de captura y/o detección comprende múltiples anticuerpos) ya sea simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden. Por ejemplo, la muestra de prueba puede ser primero contactada con al menos un anticuerpo de captura y luego (secuencialmente) con al menos un anticuerpo de detección. Alternativamente, la muestra de prueba puede ser primero contactada con al menos un anticuerpo de detección y luego (secuencialmente) con al menos un anticuerpo de captura. En ya otra alternativa, la muestra de prueba puede ser contactada simultáneamente con un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección.

En el formato de ensayo en emparedado, una muestra que se sospecha que contiene analito (o un fragmento del mismo) es primero contactada con al menos un primer anticuerpo de captura bajo condiciones que permiten la formación de un primer complejo anticuerpo/analito. Si se usa más de un anticuerpo de captura, se forma un primer complejo anticuerpo de captura/analito que comprende dos o más anticuerpos de captura. En un ensayo de emparedado, los anticuerpos, p.e., preferiblemente, el al menos un anticuerpo de captura, se usan en cantidades exceso molar de la cantidad méxima de analito (o un fragmento del mismo) esperada en la muestra de prueba. Por ejemplo se pueden usar de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 1 mg de anticuerpo por mL de amortiguador (p.e., amortiguador de recubrimiento de micropartícula).

Los inmunoensayos de inhbición competitivos, que a menudo son usados para medir analitos pequeñños porque se requiere la unión por solamente un anticuerpo, comprenden formatos secuenciales y clásicos. En un inmunoensayo de inhibición competitivo secuencial un anticuerpo de captura a un analito de interés es recubierto en un pozo de una placa microtituladora u otro soporte sólido. Cuando la muestra que contiene el analito de interés es agregada al pozo, el analito de interés se une al anticuerpo de captura. Después de lavado, se agrega al pozo una cantidad conocida de analito marcado (p.e., biotina o peroxidada de rábano picante (HRP)). Un sustratopara el marcados enzimático es necesario para generar una señal. Un ejemplo de un sustrato adecuado para HRP es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Después de lavado, la señal generada por el analito marcado es medida y es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra. En un inmunoensayo de inhibición competitiva clásico un anticuerpo a un analito de interés es recubierto en un soporte sólido (p.e., un pozo de una placa microtituladora). Sin embargo, a diferencia del inmunoensayo de inhibición competitiva secuencial, la muestra y el analito marcado son agregados al pozo al mismo tiempo. Cualquier analito en la muestra compite con el analito marcado para uniónal anticuerpo de captura. Después de lavado la señal generada por el analito marcado es medida y es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra.

Opcionalmente, antes de contactar la muestra de prueba con el al menos un anticuerpo de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura),

el al menos un anticuerpo de captura puede ser unido a un soporte sólido, lo cual facilita la separación del primer complejo anticuerpo/analito (o un fragmento del mismo) de la muestra de prueba. El sustrato al cual el anticuerpo de captura se une puede ser cualquier soporte sólido o fase sólida adecuada que facilita la separación del comlejo anticuerpo de captura-analito de la muestra.

Ejemplos incluyen un pozo de una placa, tal como una placa microtituladora, una sonda de prueba, un gel poroso (p.e., gel de sílice, agarosa, dextrano, o gelatina), una película polimérica (p.e., poliacrilamida), perlas (p.e., perlas de poliestireno o perlas magnéticas), una tira de un filtro/memebrana (p.e., nitrocelulosa o nylon), microparículas (p.e., partículas de látex, micropartículas magnetizables (p.e., micropartículas que tienen óxido férrico o núcleos de óxido de cromo y recubrimientos homo o heteropoliméricos y radios de aproximadamente 1-10 micrones). El sustrato puede comprender un material poroso adecuado con una afinidad superficial adecuada para unirse a antígenos y suficiente porosidad para permitir el acceso de los anticuerpos de detección. Generalmente se prefiere un material microporoso, aunque se puede usar un material gelatinoso en un estado hidratado. Tales sustratos porosos están preferiblemente en la forma de láminas que tienen un espesor de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.5 mm, preferiblemente aproximadamente 0.1 mm. Aunque el tamaño de poro puede variarbastante, el tamaño de poro es preferiblemente de aproximadamente 0.025 a aproximadamente 15 micrones, más preferiblemente de aproximadamente 0.15 a aproximadamente 15 micrones. La superficie de tales sustratos puede ser activada mediante procesos químicos que causan enlace covalente de un anticuerpo al sustrato. Se produce unión irreversible, generalmente por adsorción mediante fuerzas hidrofóbicas, del antígeno o el anticuerpo al sustrato; alternativamente, se puede usar un agente de acoplamiento químico u otro medio para unir covalentemente el anticuerpo al sustrato, siempre y cuando tal unión no interfiera con la capacidad del anticuerpo para unirse al analito. Alternativamente, el anticuerpo puede estar unido con micropartículas, las cuales han sido previamente recubiertas con estreptavidina (p.e., DYNAL® Magnetic Beads, Invitrogen, Carlsbad, CA) o biotina (p.e., usando micropartículas recubiertas con estreptavidina Power-BindTM-SA-MP (Seradyn, Indianapolis, IN)) o anticuerpos monoclonales específicos de anti-especie. Si es necesario, el sustrato puede ser derivatizado para permitir reactividad con

varios grupos funcinales en el anticuerpo. Tal derivatización requiere el uso de ciertos agentes de acoplamiento, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, anhídrido maléico, N-hidroxisuccinimida, y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Si se desea, uno o más reactivos de captura, tales como anticuerpos (o fragmentos de los mismos), cada uno de los cuales es específico para analito(s), pueden estar unidos a fases sólidas em diferentes ubicaciones físicas o dirigibles (p.e., tal como en una configuración de un biochip (ver, p.e., Pat. U.S. No. 6,225,047; Pub. De Sol, Int. No. WO 99/51773; Pat. U.S. No. 6,329,209; Pub. De Sol. De Pat. Int. No. WO 00/56934, y Pat. U.S. No. 5,242,828). Si el reactivo de captura está unido a una sonda de espectrometría de masas como el soporte sólido, la cantidad de analito unida a la sonda puede ser detectada mediante espectrometría de masas laser de ionización desorción, una columna sencilla puede ser empacada con diferentes perlas, que son derivatizadas con uno o más reactivos de captura, capturando así el analito en un solo lugar (ver, tecnologías derivatizadas de anticuerpo basadas en perlas, p.e., la tecnología xMAP de Luminex (Austin, TX)).

Después que la muestra de prueba que es ensayada para analito (o un fragmento del mismo) es contactada con el al menos un anticuerpo de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura), la mezcla es incubada con el fin de permitir la formación de un primer complejo anticuerpo (o múltiples anticuerpos)-analito (o un fragmento del mismo). La incubación se puede realizar a un pH de aproximadamente 4.5 a aproximadamente 10.0, a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 45°C, y por un período de al menos aproximadamente un (1) minuto a aproximadamente dieciocho (18) horas, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 minutos, lo más preferido por aproximadamente 4 a aproximadamente 18 minutos. El inmunoensayo aquí descrito puede ser conducido en un paso (significa que la muestra de prueba, al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo de detección son todos adicionados secuencialmente o simultáneamente en un recipiente de reacción) o en más de un paso, tal como dos pasos, tres pasos, etc.

Después de la formación del complejo (primer o múltiple) anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo), el complejo es entonces contactado con al menos un anticuerpo de detección bajo condiciones que permiten la formación de un complejo anticuerpo de captura (primero o múltiple/analito (o un fragmento del mismo)/segundo anticuerpo de detección).

Aunque se tituló por claridad como el "segundo" anticuerpo (p.e., segundo anticuerpo de detección), de hecho, cuando se usan múltiples anticuerpos para captura y/o detección, el al menos un anticuerpo de detección puede ser el segundo, tercero, cuarto, etc. anticuerpo usado en el inmunoensayo. Si el complejo anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo) es contactado con más de un anticuerpo de detección, entonces se forma un complejo anticuerpo de captura (primero o múltiple)/analito (o un fragmento del mismo)/anticuerpo de detección (múltiple). Como con el anticuerpo de captura (p.e., el primer anticuerpo de captura), cuando el al menos un anticuerpo de detección (p.e., segundo y cualquiera posterior) es contactado con el comlejo anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo), se requiere un período de incubación bajo condiciones similares a las descritas anteriormente para la formación del complejo anticuerpo de captura (primero o múltiple)/analito (o un fragmento del mismo)/anticuerpo de detección (segundo o múltiple). Preferiblemente, al menos un anticuerpo de detección contiene un marcador detectable. El marcador detectable se puede unir al al menos un anticuerpo de detección (p.e., el segundo anticuerpo de detección) antes de, simultáneamente con, o después de la formación del comlejo anticuerpo de captura (primero o múltiple)/analito (o un fragmento del mismo)/anticuerpo de detección (segundo o múltiple). Se puede usar cualquier marcados detectable conocido en la técnica (ver discusión anterior, incluyendo las referencias de Polak y Van Noorden (1997) y Haugland (1996)).

El marcador detectable puede estar unido a los anticuerpos ya sea directamente o mediante un agente de acoplamiento. Un ejemplo de un agente de acoplamiento que se puede usar es EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, clorhidrato), que está disponible comercialmente en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Otros agentes de acoplamiento que se pueden usar son conocidos en la técnica. Los métodos para unión de un marcador detectable a un anticuerpo son conocidos en la técnica. Adicoinalmente, se pueden comprar o sinterizar muchos marcadores detectables que ya contienen grupos finales que facilitan el acomplamiento del marcador detectable al anticuerpo, tal como CPSP-Acridinio éster (p.e., 9-[N-tosil-N-(3-carboxipropil)]-10-(3-sulfopropil)acridinio carboxamida) o SPSP-Acridinio éster (p.e., N10-(3-sulfopropil)-N-(3-sulfopropil)-acridinio-9-carboxamida).

El complejo anticuerpo de captura (primero o múltiple)/analito/anticuerpo de detección (segundo o múltiple) puede ser, pero no tiene que ser separado del resto de la muestra de prueba antes de la cuantificación del marcador. Por ejemplo, si el al menos un anticuerpo de captura (p.e., el primer anticuerpo de captura) está unido a un soporte sólido, tal como un pozo o una perla, la separación puede ser realizada quitando el fluido (de la muestra de prueba) del contacto con el soporte sólido. Alternativamente, si el al menos primer anticuerpo de captura está unido a un soporte sólido, este puede ser contactado simultáneamente con la muestra que contiene analito y el al menos uno segundo anticuerpo de detección para formar un complejo primer (múltiple) anticuerpo/analito/segundo (múltiple) anticuerpo, seguido por la remoción del fluido (muestra de prueba) de contacto con el seporte sólido. Si el al menos un primer anticuerpo de captura no está unido a un soporte sólido, entonces el complejo anticuerpo de captura (primero o múltiple)/analito/anticuerpo de detección (segundo o múltiple) no tiene que ser removido de la muestra de prueba para cuantificación de la cantidad del marcador.

Después de la formación del complejo anticuerpo de captura/analito/anticuerpo de detección marcado (p.e., el complejo primer anticuerpo de captura/analito/segundo anticuerpo de detección), se cuantifica la cantidad de marcador en el complejo usando técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, si se usa un marcador enzimático, el complejo marcado reacciona con un sustrato para el marcador que produce una reacción cuantificable tal como el desarrollo de color. Si el marcador es un marcador radioactivo, el marcador es cuantificado usando medios apropiados, tales como un contador de cintilación. Si el marcador es un marcador fluorescente, el marcador es cuantificado estimulando el marcador con una luz de un color (que es conocido como la "longitud de onda de excitación") y detectando otro color (que es conocido como la "longitud de onda de emisión") que es emitido por el marcador en respuesta a la estimulación. Si el marcador es un marcador quimioluminiscente, el marcador es cuantificado detectando la luz emitida ya sea visualmente o usando luminómetros, película de rayos X, película fotográfica de alta velocidad, una cámara CCD, etc. Una vez el marcador en el complejo ha sido cuantificado, se determina la concentración de analito o un fragmento del mismo en la muestra de prueba por medios apropiados, tales como mediante el uso de una curva estándar que ha sido generada usando diluciones seriales de analito o un fragmento del mismo de concentración

conocida. Además de usar diluciones serials de analito o un fragmento del mismo, se puede generar la curva estándar gravimétricamente, mediante espectroscopía de masas y mediante otras técnicas conocidas en el arte.

En un ensayo de micropartícula quimioluminiscente que emplea el analizador ARCHITECT®, el pH diluyente conjugado debe ser de aproximadamente 6.0 +/- 0.2, el amortiguador de recubrimiento de micropartícula debe ser mantenido a aproximadamente temperatura ambiente (p.e., de aproximadamente 17 a aproximadamente 27 °C), el pH del amortiguador de recubrimiento de micropartícula debe ser de aproximadamente 6.5 +/- 0.2, y el pH del diluyente de micropartícula debe ser de aproximadamente 7.8 +/- 0.2. Los sólidos son preferiblemente de menos de aproximadamente 0.2%, tal como menos de aproximadamente 0.15%, menos de aproximadamente 0.14%, menos de aproximadamente 0.13%, menos de aproximadamente 0.12%, o menos de aproximadamente 0.11%, tal como aproximadamente 0.10%.

FPIAs son principios de inmunoensayo de unión competitivos. Un compuesto marcado fluorescentemente, cuando es excitado por una luz linealmente polarizada, emitirá fluorescencia que tiene un grado de polarización inversamente proporcional a su velocidad de rotación. Cuando un complejo trazador fluorescentemente marcado-anticuerpo es excitado por una luz linealmente polarizada, la luz emitida permanence altamente polarizada porque se restringe la rotación del fluoróforo entre el tiempo en que la luz es absorbida y el tiempo en que la luz es emitida. Cuando un compuesto trazador "libre" (p.e., un compuesto que no está unido a un anticuerpo) es excitado mediante luz linealmente polarizada, su rotación es mucho más rápida que la del conjugado trazador-anticuerpo correspondiente producido en un inmunoensato de unión competitivo. Los FPIAs son ventajosos sobre los RIAs en cuando a que no hay sustancias radioactivas que requieren manejo y disposición especial. En adición, los FPIAs son ensayos homogéneos que pueden realizarse fácilmente y rápidamente.

En vista de lo anterior, se provee un método para determinar la presencia, cantidad o concentración de analito (o un fragmento del mismo) en una muestra de prueba. El método comprende ensayar la muestra de prueba para un analito (o un fragmento del mismo) mediante un ensayo (i) que emplea

(i') al menos uno de un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que puede unir a un analito, un variante de un anticuerpo que se puede unir a un analito, un fragmento de un variante de un anticuerpo que se puede unir a un analito, y una DVD-Ig (o un fragmento, un variante, o un fragmento de un variante del mismo) que se puede unir a un analito, y (ii') al menos un marcador detectable y (ii) que comprende comparar una señal generada por el marcador detectable como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración de analito (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba a con señal generada como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración de analito (o un fragmento del mismo) en un control o calibrador. El calibrador es opcionalmente parte de una serie de calibradores, en los cuales cada uno de los calibradores difiere de los otros calibradores por la concentración de analito.

El método puede comprender (i) contactar la muestra de prueba con al menos un primer compañero de unión específica para analito (o un fragmento del mismo) seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que se puede unir a un analito, un variante de un anticuerpo que se puede unir a un analito, un fragmento de un variante de un anticuerpo que se puede unir a un analito, y una DVD-Ig (o un fragmento, un varianto, o un fragmento de un variante del mismo) que se puede unir a un analito con el fin de formar un complejo primer compañero de unión específica/analito (o fragmento del mismo), (ii) contactar el complejo primer compañero de unión específica/analito (o fragmento del mismo) con al menos un segundo compañero de unión específica para analito (o fragmento del mismo) seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo anti-analito marcado detectablemente, un fragmento de un anticuerpo anti-analito marcado detectablemente que se puede unir a un analito, un variante de un anticuerpo anti-analito marcado detectablemente que se puede unir al analito, un fragmento de un variante de anticuerpo anti-analito marcado detectablemente que se puede unir a analito, y una DVD-Ig marcada detectablemente (o un fragmento, un variante, o un fragmento de un variante del mismo) con el fin de formar un complejo primer compañero de unión específica/analito (o fragmento del mismo)/segundo compañero de unión específica, y (iii) determinar la presencia, cantidad o concentración de analito enla muestra de prueba mediante la detección o medida de la señal generada por el marcador detectable en el complejo primer compañero de unión específica/analito (o

fragmento del mismo)/segundo compañero de unión específica formado en (ii). Se puede preferir un método en el cual al menos un primer compañero de unión específica para analito (o un fragmento del mismo) y/o al menos one segundo compañero de unión específica para analito (o un fragmento del mismo) es una DVD-Ig (o un fragmento, un variante, o un fragmento de un variante del mismo) como se describe aquí.

Alternativamente, el método puede comprender contactar la muestra de prueba con al menos un primer compañero de unión específica para analito (o un fragmento del mismo) seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que se puede unir a un analito, un variante de un anticuerpo que se puede unir a un analito, un fragmento de un variante de un anticuerpo que se puede unir a un analito, y una DVD-Ig (o un fragmento, un variante, o un fragmento de un variante de la misma) y simultáneamente o secuencialemente, en cualquier orden, contactar la muestra de prueba con al menos un segundo compañero de unión especifica, que puede competir con el analito (o un fragmento del mismo) para unión al al menos un primer compañero de unión específica y que es seleccionado del grupo que consiste de un analito marcado detectablemente, un fragmento de analito marcado detectablemente que se puede unir al primer compañero de unión específica, un variante de analito marcado detectablemente que se puede unir al primer compañero de unión específica, y un fragmento de un variante de analito marcado detectablemente que se puede unir al primer compañero de unión específica. Cualquier analito (o un fragmento del mismo) presente en la muestra de prueba y el al menos un segundo compañero de unión específica compiten entre sí para formar un complejo primer compañero de unión específica/analito (o fragmento del mismo) y un complejo primer compañero de unión específica/segundo compañero de unión específica, respectivamente. El método comprende además determinar la presencia, cantidad o concentración de analito en la muestra de prueba mediante la detección o medida de la señal generada por el marcador detectable en el complejo primer compañero de unión específica/segundo compañero de unión específica formado en (ii), en donde la señal generada por el marcador detectable en el complejo primer compañero de unión específica/segundo compañero de unión específica es inversamente proporcional a la cantidad o concentración de analito en la muestra de prueba.

Los métodos anteriores pueden además comprender el diagnóstico, pronósitco o valoración de la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico de un paciente de quien se obtuvo la muestra de prueba. Si el método comprende además valorar la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente de quien se obtuvo la muestra de prueba, el método comprende además opcionalmente modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente según se necesite para mejorar la eficacia. El método puede ser adaptado para uso en un sistema automatizado o un sistema semi-automatizado.

Con respecto a los métodos de ensayo (y kit de los mismos), puede ser possible emplear anticuerpos anti-analito disponibles comercialmente o métodos para la producción de anti-analito descritos en la literatura. Proveedores comerciales de varios anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA), GenWay Biotech, Inc. (San Diego, CA), y R&D Systems (RDS; Minneapolis, MN).

Generalmente se puede emplear un nivel predeterminado como un punto de referencia contra el cual evaluar los resultados obtenidos al ensayar una muestra de prueba para analito o un fragmento del mismo, p.e., para detectar enfermedad o riesgo de enfermedad. Generalmente, al hacer tal comparación se obtiene el nivel predeterminado corriendo un ensayo particular un número de veces suficiente y bajo condiciones apropiadas de forma que se puede hacer un enlace o asociación de presencia, cantidad o concentación de analito con un estado o punto final particular de una enfermedad, trastorno o condición o con indicios clínicos particulares. Típicamente, el nivel predeterminado es obtenido con ensayos de sujetos de referencia (o poblaciones de sujetos). El analito medido puede incluir fragmentos del mismo, productos de degradación del mismo, y/o productos de clivado enzimático del mismo.

En particular, con respecto a un nivel predeterminado empleado para monitorear la progresión y/o tratamiento de enfermedad, la cantidad o concentración de analito o un fragmento del mismo puede permanecer "sin cambio", "favorable" (o "favorablemente alterada"), o "desfavorable" (o "desfavorablemente alterada"). "Elevada" o "aumentada" se refiere a una

cantidad o una concentración en una muestra de prueba que es mayor que un nivel o rango típico o normal (p.e., nivel predeterminado), o es mayor que otro nivel o rango de referencia (p.e., muestra anterior o de líena basal). El término "disminuida" o "reducida" se refiere a una cantidad o una concentración en una muestra de prueba que es menor que un nivel o rango típico o normal (p.e., nivel predeterminado), o es menor que otro nivel o rango de referencia (p.e., muestra anterior o de línea basal). El término "alterada" se refiere a una cantidad o una concentración en una meustra que es alterada (aumentada o disminuida) sobre un nivel o rango típico o normal (p.e., nivel predeterminado), o sobre otro nivel o rango de referencia (p.e., muestra anterior o de línea basal).

El nivel o rango típico o normal para analito se define de acuerdo con la práctica estándar. Debido a que los niveles de analito en algunos caos sera muy bajo, se considerará que un nivel llamado alterado o alteración ha ocurrido cuando existe cualquier cambio neto comparado con el nivel o rango típico o normal, o nivel o rango de referencia, que no puede ser explicado por error experimental o variación de muestra. Así, el nivel medido en una muestra particular sera comparado con el nivel o rango de niveles determinados en muestras similares de un sujeto llamado normal. En este contexto, un "sujeto normal" es un individuo sin enfermedad detectable, por ejemplo, y un paciente o población "normal" (algunas veces llamados "control") son los que, por ejemplo, no exhiben enfermedad detectable, respectivamente. Adicionalmente, dado que un analito no se encuentra rutinariamente a un alto nivel en la mayoría de la población humana, se puede considerar un "sujeto normal" a un individuo sin cantidad o concentración de analito aumentada o incrementada detectable sustancial, y un paciente o población "normal" (algunas veces llamada "control") es una que no exhibe cantidad o concentración de analito aumentada o incrementada detectable sustancial. Un "sujeto aparentemente normal" es uno en el cual el analito no ha sido o está siendo valorado actualmente. Se dice que el nivel de analito es "elevado" cuando el analito normalmente no es detectado (p.e., el nivel normal es zero, o dentro de un rango de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 percentiles de poblaciones normales), pero es detectado en una muestra de prueba, así como cuando el analito está presente en la muestra de prueba a un nivel más alto de lo normal. Así, inter alia, la revelación prove un método para detectar un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener una enfermedad, trastorno o condició

particular. El método de ensayo también puede incolucrar el ensayo de otros marcadores y similares.

En consecuencia, los métodos aquí descritos también se pueden usar para determiner si un sujeto tiene o no o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o condición dada. Específicamente, tal método puede comprender los pasos de:

(a) determinar la concentración o cantidad en una muestra de prueba de un subject de analito (o un fragmento del mismo) (p.e., usando los métodos aquí descritos, o métodos conocidos en la técnica); y

(b) comparar la concentración o cantidad de analito (o un fragmento del mismo) determinada en el paso (a) con un nivel predeterminado, en donde, si la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (a) es favorable con respecto a un nivel predeterminado, entonces se determina que el sujeto no tiene o está en riesgo para una enfermedad, trastorno o condición dada. Sin embargo, si la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (a) es desfavorable con respecto al nivel predeterminado, entonces se determina que el sujeto tiene o está en riesgo de una enfermedad, trastorno o condición dada.

Adicionalmente, se provee aquí un método para monitorear la progression de la enfermedad en un sujero. Óptimamente, el método comprende los pasos de:

(a) determiner la concentración o cantidad de analito en una muestra de prueba de un sujeto;

(b) determiar la concentración o cantidad de analito en una muestra de prueba posterior del sujeto; y

(c) comparar la concentración o cantidad de analito determinada ene l paso (b) con la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (a), en donde si la concentración o cantidad determinada en el paso (b) no cambia o es desfavorable cuando se compara con la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (a), entonces se determina que la enfermedad en el sujeto ha continuado, progresado o empeorado. Por comparación, si la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (b) es favorable cuando se compara con la concentración o cantidad de analito determinada en

el paso (a), entonces se determina que la enfermedad en el sujeto no ha continuado, ha regresado o mejorado.

Opcionalmente, el método comprende además comparar la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (b), por ejemplo, con un nivel predeterminado. Adicionalmente, opcionalmente el método comprende tratar al sujeto con una o más composiciones farmacéuticas por un período de tiempo si la comparación muestra que la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (b), por ejemplo, está desfavorablemente alterada con respecto al nivel predeterminado.

Aún adicionalmente, los métodos se pueden usar para monitorear el tratamiento en un sujeto que recibe tratamiento con una o más composiciones farmacéuticas. Específicamente, tales métodos involucran proveer una primera muestra de prueba de un sujeto antes de que al sujeto se le haya administrado una o más composiciones farmacéuticas. Luego se determina la concentración o cantidad de analito en una primera muestra de prueba de un sujero (p.e., usando los métodos descritos aquí o conocidos en la técnica). Luego se determina la concentración o cantidad de analito, opcionalmente la concentración o cantidad de analito es entonces comparada con un nivel predeterminado. Si la concentración o cantidad de analito determinada en la primera muestra de prueba es menor que el nivel predeterminado, entonces el sujeto no es tratado con una o más composiciones farmacéuticas. Sin embargo, si la concentración o cantidad de analito determinada en la primera muestra de prueba es mayor que el nivel predeterminado, entonces el sujero es tratado con una o más composiciones farmacéuticas por un período de tiempo. El período de tiempo que el sujeto es tratado con una o más composiciones farmacéuticas puede ser determinado por el experto en la técnica (por ejemplo, el período de tiempo puede ser de aproximadamente siete (7) días a aproximadamente dos años, preferiblemente de aproximadamente catorce (14) días a aproximadamente un (1) año).

Durante el curso de tratamiento con una o más composiciones farmacéuticas, segunda y posteriores muestras de prueba son entonces obtenidas del sujeto. El número de muestras de prueba y el tiempo en el cual se obtienen dichas muestras de prueba del sujeto no son críticos. Por ejemplo, una segunda muestra de prueba podría obtenerse siete seven (7) días después

de la primera administración al sujeto con una o más composiciones farmacéuticas, una tercera muestra de prueba podría obtenerse dos (2) semanas después de la primera administración al sujeto de una o más composiciones farmacéuticas, una cuarta muestra de prueba podría obtenerse tres (3) semanas después de la primera administración al sujeto de una o más composiciones farmacéuticas, una quinta muestra de prueba podría obtenerse cuatro (4) semanas después de la primera administración al sujeto de una o más composiciones farmacéuticas, etc.

Después que se obtiene la segunda y posterior muestra de prueba del sujeto, se determina la concentración o cantidad de analito en la segunda o posterior muestra de prueba (p.e., usando los métodos aquí descritos o conocidos en la técnica). La concentración o cantidad de analito determinada en cada una de la segunda y posterior muestras de prueba es entonces comparada con la concentración o cantidad de analito determinada en la primera muestra de prueba (p.e., la muestra de prueba que fue originalmente opcionalmente comparada con el nivel predeterminado). Si la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (c) es favorable cuando se compara con la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (a), entonces se determina que la enfermedad en el sujeto se ha descontinuado, retrocedido o mejorado, y el sujeto debe continuar siendo administrado una o las composiciones farmacéuticas del paso (b). sin embargo, si la concentración o cantidad determinada en el paso (c) no cambia o es desfavorable cuando se compara con la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (a), entonces se determina que la enfermedad en el sujeto ha continuado, progresado o empeorado, y el sujeto debe ser tratado con una concentración más alta de una o más composiciones farmacéuticas administradas al sujeto en el paso (b) o el sujeto debe ser tratado con una o más composiciones farmacéuticas que sean diferentes de la una o más composiciones farmacéuticas administradas al sujeto en el paso (b). Específicamente, el sujeto puede ser tratado con una o más composiciones farmacéuticas que sean diferentes de la una o más composiciones farmacéuticas que el sujeto había recibido previamente para disminuir o bajar el nivel de analito del sujeto.

Generalmente, para ensayos en los cuales se puede hacer pruebas de repetición (p.e., monitoreas la progresión de la enfermedad y/o respuesta a tratamiento), se obtiene una muestra de prueba segunda o posterior en un período de tiempo desúés de haber obtenido la primera muestra de prueba del

sujeto. Específicamente, se puede obtener una segunda muestra de prueba del sujeto minutos, horas, días, semanas o años después de haber obtenido la primera muestra de prueba del sujeto. Por ejemplo, la segunda muestra de prueba se puede obtener del sujeto en un período de tiempo de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas,

aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas, aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 51 semanas, aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 1.5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2.5 años, aproximadamente 3.0 años, aproximadamente 3.5 años, aproximadamente 4.0 años, aproximadamente 4.5 años, aproximadamente 5.0 años, aproximadamente 5.5 años, aproximadamente 6.0 años, aproximadamente 6.5 años, aproximadamente 7.0 años, aproximadamente 7.5 años, aproximadamente 8.0 años, aproximadamente 8.5 años, aproximadamente 9.0 años, aproximadamente 9.5 años o aproximadamente 10.0 años después de obtener la primera muestra de prueba del sujeto.

Cuando se usa para monitorear la progression de la enfermedad, el ensayo anterior se puede usar para monitorear la progresión de la enfermedad enpacientes que sufren de condiciones agudas. Las condiciones agudas, también conocidas como condiciones de cuidado crítico, se refieren a enfermedades agudas que amenazan la vida u otras condiciones médicas críticas que involucran, por ejemplo, el sistema cardiovascular o sistema excretor. Típicamente, las condiciones de cuidado crítico se refieren a aquellas condiciones que requieren intervención médica aguda en un escenario de hospital (incluyendo, pero sin limitarse a, la sala de emergencias, la unidad de cuidado intensivo, centro de trauma, u otro escenario de cuidado emergente) o administración por un paramédico u otro personal médico del campo. Para las condiciones de cuidado crítico, el monitoreo repetido se hace generalmente dentro de un marco de tiempo relativamente corto, a saber, minutos, horas o días (p.e., aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11

horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días o aproximadamente 7 días), y el ensayo inicial así mismo se hace generalmente dentro de un marco de tiempo más corto, p.e., aproximadamente minutos, horas o días de la aparición de la enfermedad o condición.

Los ensayos también pueden usarse para monitorear la progression de enfermedad en sujetos que sufren de condiciones crónicas o no agudas. Las condiciones de cuidado no crítico o no agudas se refieren a condiciones diferentes a enfermedad aguda, que amenaza la vida u otras condiciones médicas críticas que involucran, por ejemplo, el sistema cardiovascular y/o sistema excretor. Típicamente, las condiciones no agudas incluyen aquellas de largo tiempo de duración o crónicas. Para condiciones no agudas, el monitoreo repetido se hace con un marco de tiempo más largo, p.e., horas, días, semanas, meses o años (p.e., aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas,

aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas, aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 51 semanas, aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 1.5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2.5 años, aproximadamente 3.0 años, aproximadamente 3.5 años, aproximadamente 4.0 años, aproximadamente 4.5 años, aproximadamente 5.0 años, aproximadamente 5.5. años, aproximadamente 6.0 años, aproximadamente 6.5 años, aproximadamente 7.0 años, aproximadamente 7.5 años, aproximadamente 8.0 años, aproximadamente 8.5 años, aproximadamente 9.0 años, aproximadamente 9.5 años o aproximadamente 10.0 años), y generalmente el ensayo inicial así mismo, se hace dentro de un marco de tiempo más largo, p.e., aproximadamente horas, días, meses o años de la aparición de la enfermedad o condición.

Adicionalmente, los ensayos anteriores se pueden realizar usando una primera muestra de prueba obtenida de un sujeto en donde la primera muestra de prueba es obtiene de una fuente, tal como orina, suero o plasma. Opcionalmente, los ensayos anteriores pueden ser entonces repetidos usando una segunda muestra de prueba obtenida del sujeto, donde la segunda muestra de prueba se obtiene de otra fuente. Por ejemplo, si la primera

muestra de prueba fue obtenida de orina, la segunda muestra de prueba puede ser obtenida de suero o plasma. Los resultados obtenidos de los ensayos usando la primera muestra de prueba y la segunda muestra de prueba pueden ser comparados. Se puede usar la comparación para evaluar el estado de una enfermedad o condición en el sujeto.

Más aún, la presente revelación también se relaciona con métodos para determinar si un sujeto predis´puesto a o que sufre de una enfermedad, trastorno o condición dada, se beneficiará del tratamiento. En particular, la revelación se relaciona con métodos y productos de diagnóstico de analito acompañante. Así, el método para "monitorear el tratamiento de enfermedad en un sujeto" aquí descrito también puede óptimamente abarcar la selección o identificación de candidatos para terapia.

Así, en realizaciones particulares, la revelación también prove un método para determinar si un sujeto que tiene, o en riesgo de una enfermedad, trastorno o condición dada es un candidato para terapia. Generalmente, el sujeto es uno que ha experimentado algún síntoma de una enfermedad, trastorno o condición dada o que ha sido realmente diagnosticado que tiene, o está en riesgo para una enfermedad, trastorno o condición dada, y/o que demuestra una concentración o cantidad desfavorable de analito o un fragmento del mismo, como se describe aquí.

El método comprende opcionalmente un ensayo aquí descrito, en donde el analito es evaliado antes y después del tratamiento de un sujeto con una o más composiciones farmacéuticas (p.e., particularmente con un farmacéutico relacionado con un mecanismo de acción que involucra analito), con terapia inmunosupresora, o mediante inmunoabsorción, o donde el analito es evaluado después de tal tratamiento y la concentration o la cantidad de analito es comparada contra un nivel predeterminado. Una concentración desfavorable de cantidad de analito observada después del tratamiento confirma que el sujeto no se beneficiará de recibir tratamiento adicional o continuado, mientras que una concentración o cantidad favorable de analito observada después del tratamiento confirma que el sujeto se debeficiará de recibir tratamiento adicional o continuado. Esta confirmación ayuda al manejo de estudios clínicos, y la provisión de cuidado al paciente mejorado.

Es evidente que, aunque ciertas realizaciones presentes son ventajosas cuando se emplean para evaliar una enfermedad, trastorno o condición dada aquí discutida, los ensayos y kits pueden emplearse para evaluar el analito en otras enfermedades, trastornos y condiciones. El método de ensayo puede también involucrar el ensayo de otros marcadores y similares.

El método de ensayo también se puede usar para identificar un compuesto que mejora una enfermedad, trastorno o condición dada. Por ejemplo, una célula que expresa analito puede ser contactada con un compuesto candidate. El nivel de expresión de analito en la célula contactada con el compuesto puede ser comparado con el de una célula de control usando el método de ensayo aquí descrito.

II. Kit

También se provee un kit para ensayar una muestra de prueba para la presencia, cantidad o concentración de un analito (o un fragmento del mismo) en una muestra de prueba. El kit comprende al menos un componente para ensayar la muestra de prueba para el analito (o un fragmento del mismo) e instrucciones para ensayar la muestra de prueba para el analito (o un fragmento del mismo). El al menos un componente para ensayo de la muestra de prueba para el analito (o un fragmento del mismo) puede incluir una composición que comprende una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento, un variante, o un fragmento de un variante de la misma), que está opcionalmente inmovilizado en una fase sólida.

El kit puede comprender al menos un componente para ensayar la muestra de prueba para un analito mediante inmunoensayo, p.e., inmunoensayo de micropartícula quimioluminiscente, e instrucciones para ensayar la muestra de prueba para un analito mediante inmunoensayo, p.e., inmunoensayo de micropartícula quimioluminiscente. Por ejemplo, el kit puede comprender al menos un compañero de unión específico para un analito, tal como un anticuerpo anti-analito, monoclonal/policlonal (o un fragmento del mismo que se puede unir al analito, un variante del mismo que se puede unir al analito, o un fragmento de un variante que sepuede unir al analito) o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento, un variante, o un fragmento de un variante del mismo), cualquiera de los cuales puede estar detectablemente marcado. Alternativamente o adicionalmente, el kit puede comprender analito marcado

detectablemente (o un fragmento del mismo que se puede unir a un anti-analito, anticuerpo monoclonal/policlonal o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento, un variante, o un fragmento de un variante del mismo)), que puede competir con cualquier analito en una muestra de prueba para unión a un anti-analito, anticuerpo monoclonal/policlonal (o un fragmento del mismo que puede unirse al analito, un variante del mismo que se puede unir al analito, o un fragmento de un variante que se puede unir al analito) o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento, un variante, o un fragmento de un variante del mismo), cualquiera de los cuales puede estar inmovilizado en un soporte sólido. El kit puede comprende un calibrador o control, p.e., analito aislado o purificado. El kit puede comprender al menos un recipiente (p.e., tubo, placas microtituladoras o tiras, que pueden estar ya recubiertas con un primer compañero de unión específica, por ejemplo) para conducir el ensayo, y/o un amortiguador, tal como un amortiguador de ensayo o un amortiguador de lavado, uno cualquiera que puede ser proporcionado como una solución concentrada, una solución de sustrato para el marcador detectable (p.e., un marcador enzimático), o una solución de parada. Preferiblemente, el kit comprende todos los componentes, p.e., reactivos, estándares, amortiguadores, diluyentes, etc., que son necesarios para realizar en ensayo. Las instrucciones pueden estar en forma de papel o legible por computadora, tal como un disco, CD, DVD, o similares.

Cualquier anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-analito o una DVD-Ig anti-analito, o trazedor puede incorporar un marcador detectable aquí descrito, tal como un fluoróforo, una mitad radioactiva, una enzima, un marcador de biotina/avidina, un cromóforo, un marcador quimioluminiscente, o similares, o el kit puede incluir reactivos para realizar el marcado detectable. Los anticuerpos, calibradores y/o controls pueden ser proporcionados en recipientes separados o pre-dispensados en un formato de ensayo apropiado, por ejemplo, en placas microtituladoras.

Opcionalmente, el kit incluye cualquier componente de control de calidad (por ejemplo, páneles de sensibilidad, calibradores, y controles positivos). La preparación de los reactivos de control de calidad es bien conocida en la técnica y se describen en hojas insertas para una variedad de productos de inmunodiagnóstico. Los miembros de panel de sensibilidad se usan opcionalmente para establecer cualquier característica de desempeño, y

además opcionalmente son indicadores útiles de la integridad de los reactivos de kit de inmunoensayo, y los ensayos de estandarización.

El kit puede también incluir opcionalmente otros reactivos requeridos para conducer un ensayo diagnóstico o facilitar evaluaciones de control de calidad, tales como amortiguadores, sales, enzimas, co-factores de enzima, sustratos de enzima, reactivos de detección, y similares. También se pueden incluir en el kit otros componentes, tales como amortiguadores y soluciones para el aislamiento y/o tratamiento de una muestra de prueba (p.e., reactivos de pretratamiento). El kit puede incluir adicionalmente uno o más controles. Uno o más de los components del kit puede estar liofilizado, en cuyo caso el kit puede comprender además reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados.

Los diferentes componentes del kit son opcionalmente proporcionados en recipientes adecuados según sea necesario, p.e., una placa microtituladora. El kit puede además incluir recipientes para albergar o almacenar una muestra (p.e., un recipiento o un cartucho para una muestra de orina). Cuando sea apropiado, el kit también puede contener opcionalmente recipientes de reación, recipientes de mezclado, y otros componentes que facilitan la preparación de reactivos o la muestra de prueba. El kit puede incluir también uno o más instrumentos para ayudar a la obtención de una muestra de prueba, tal como una jeringa, pipeta, forceps, cuchara medidora, o similares.

Si el carcador detectable es al menos un compuesto de acridinio, el kit puede comprender al menos una acridinio-9-carboxamida, al menos un aril éster de acridinio-9-carboxilato, o cualquier combinación de los mismos. Si el marcador detectable es al menos un compuesto de acridinio, el kit también puede comprender una fuente de peróxido de hidrógeno, tal como un amortiguador, una solución, y/o al menos un solución básica. Si se desea, el kit puede contener una fase sólida, tal como una partícula magnética, perla, tubo de prueba, placa microtituladora, cubeta, membrana, molécula de andamiaje, película, papel filtro, disco o chip.

III. Adaptación del Kit y Método

El kit (o componentes del mismo), así como el método para determiner la presencia, cantidad o concentración de un analito en una muestra de prueba mediante un ensayo, tal como un inmunoensayo aquí descrito, puede ser adaptado para uso en una variedad de sistemas automatizados y semi-automatizados (incluyendo aquellos en donde la fase sólida comprende una micropartícula), como se describe, p.e., en las Patentes U.S. Nos. 5,089,424 y 5,006,309, y como son comercializados, p.e., por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) como ARCHITECT®.

Algunas de las diferencias entre un sistema automatizado o semi-automatizado comparadas con un sistema no automatizado (p.e., ELISA) incluyen la forma en que se une el sustrato al primer compañero de unión específica (p.e., un anti-analito, anticuerpo monoclonal/policlonal (o un fragmento del mismo, un variante del mismo, o un fragmento de un variante del mismo) o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento de la misma, un variante de la misma, o un fragmento de un variante de la misma); cualquier forma, formación de emparedaro y reactividad de analito pueden ser afectadas), y la longitud y el tiempo de la captura, detección y/o cualquier paso de lavado opcional. Mientras que un formato no automatizado, tal como una ELISA, puede requerir un tiempo de incubación relativamente más largo con la muestra y el reactivo de captura (p.e., aproximadamente 2 horas), un formato automatizado o semi-automatizado (p.e., ARCHITECT®, Abbott Laboratories) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (p.e., aproximadamente 18 minutos para ARCHITECT®). Igualmente, mientras que un formato no automatizado, tal como una ELISA, puede incubar un anticuerpo de detección, tal como el reactivo conjugado, por un tiempo de incubación relativamente más largo (p.e., aproximadamente 2 horas), un formato automatizado o semi-automatizado (p.e., ARCHITECT®) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (p.e., aproximadamente 4 minutos para el ARCHITECT®).

Otras plataformas disponibles en Abbott Laboratories incluyen, pero no se limitan a, AxSYM®, IMx® (ver, p.e., Pat. U.S. No. 5,294,404, la cual está aquí incorporada mediante referencia en su totalidad), PRISM®, EIA (perla), y Quantum™ II, así como otras plataformas. Adicionalmente, los ensayos, kits y componentes se pueden emplear en otros formatos, por ejemplo, sobre

sistemas de ensayo electroquímicos u otros realizados de mano o de diagnóstico inmediato. La presente revelación es, por ejemplo, aplicable al sistema de inmunoensayo electroquímico de diagnóstico inmediato de Abbott comercial (i-STAT®, Abbott Laboratories) que realiza inmunoensayos de emparedado. Los inmunosensores y sus métodos de fabricación y operación en dispositivos de prueba de uso sencillo se describen en, por ejemplo, Patente U.S. No. 5,063,081, Pub. de Sol. de Pat. U.S. No. 2003/0170881, Pub. de Sol. de Pat.U.S. No. 2004/0018577, Pub. de Sol. de Pat.U.S. No. 2005/0054078, y Pub. de Sol. de Pat. U.S. No. 2006/0160164, que están incorporadas en su totalidad mediante referencia para sus enseñanzas a este respecto.

En particular, con respecto a la adaptación de un ensayo de analito al sistema I-STAT®, se prefiere la siguiente configuración. Se fabrica un chop de silicio microfabricado con un par de electrodos de trabajo amperométricos de oro y un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata. Sobre uno de los electrodos de trabajo, se adhieren perlas de poliestireno (0.2 mm de diámetro) con anticuerpo anti-analito, monoclonal/policlonal inmovilizado (o un fragmento del mismo, un variante del mismo, o un fragmento de un variante del mismo) o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento de la misma, una variante de la misma, o un fragmento de una variante de la misma), a un recubrimiento polímero de polivinil alcohol estampado sobre el electrodo. Este chip es ensamblado en un cartucho I-STAT® con un formato fluídico adecuado para inmunoensayo. Sobre una porción de la pared de la cámara que alberga la muestra en el cartucho hay una capa que comprende un compañero de unión específica para un analito, tal como un anticuerpo anti-analito, monoclonal/policlonal (o un fragmento del mismo, un variante del mismo, o un fragmento de un variante del mismo que se puede unir al analito) o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento de la misma, un variante de la misma, o un fragmento de un variante de la misma que se puede unir al analito), cada uno de los cuales puede estar marcado detectablemente. Dentro del bolsillo de fluido del cartucho está un reactivo acuoso que incluye p-aminofenol fosfato.

En operación, se agrega una muestra que se sospecha que contiene un analito a la cámara sujetadora del cartucho de prueba, y el cartucho es insertado en el lector I-STAT®. Después que el compañero de unión específica para un analito se ha disuleto en la muestra, un elemento de bombeo dentro del cartucho fuerza a la muestra en un conducto que contiene el chip. Aquí

oscila para promover la formación del emparedado. En el penúltimo paso del ensayo, el fluido es forzado del bolsillo y en el conducto para lavar la muestra fuera del chip y a una cámara de lavado. En el paso final del ensayo, el marcador de fosfatasa alcalina reacciona con p-aminofenol fosfato para clivar el grupo fosfato y permitir que el p-aminofenol liberado sea oxidado electroquímicamente en el electrodo de trabajo. Con base en la corriente medida, el lector es capaz de calcular la cantidad de analito en la muestra por medio de un algoritmo incrustado y curva de calibración determinada en fábrica.

Sobra decir que los métodos y kits aquí descritos necesariamente abarcan otros reactivos y métodos para realizar el inmunoensayo. Por ejemplo, se abarcan varios amortiguadores tales como los conocidos enla técnica y/o que pueden ser fácilmente preparados u optimizados para ser empleados, p.e., para lavado, como un diluyente conjugado, diluyente de micropartícula, y/o como un diluyente calibrador. Un diluyente conjugado ejemplar es el diluyente conjugado ARCHITECT® empleado en ciertos kits (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y que contiene ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), una sal, un bloqueador de proteína, un agente antimicrobiano, y un detergente. Un diluyente calibrado ejemplar es el diluyente calibrador humano ARCHITECT® empleado en ciertos kits (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), que comprenden un amortiguador que contiene MES, otra sal, un bloqueador de proteína, y un agente antimicrobiano. Adicionalmente, somo se describe en la Solicitud de Patente U.S. No. 61/142,048 presentada el 31 de Diciembre de 2008, se puede obtener generación de señal mejorada, p.e., en un formato de cartucho I-Stat, usando una secuencia de ácido nucleico enlazada al anticuerpo de señal como un amplificador de señal.

EJEMPLIFICACION

Ejemplo 1: Diseño, Construcción y Análisis de una DVD-Ig

Ejemplo 1.1: Ensayos Empleados para Identificar y Caracterizar Anticuerpos Base y DVD-Ig

Los siguientes ensayos fueron empleados a lo largo de los Ejemplos para

identificar y caracterizar anticuerpos base y DVD-Ig, a menos de que se indique de otra manera.

Ejemplo 1.1.1: Ensayos Empleados para Determinar Unión y Afinidad de los Anticuerpos Base y DVD-Ig por sus Antígeno(s) Objetivo

Ejemplo 1.1.1A: ELISA de Unión Directa

Se llevaron a cabo Ensayos Inmunoabsorbentes Ligados a Enzimas para seleccionar anticuerpos, que se unan al antigeno Objetivo deseado, como sigue. Se recubrieron placas de ELISA de alto enlace (Corning Costar # 3369, Acton, MA) con 100 μL/pozo de 10 μg/ml del antígeno Objetivo deseado (R&D Systems, Minneapolis, MN) o dominio extra-celular/proteina de fusión FC del antígeno Objetivo deseado (R&D Systems, Minneapolis, MN) o anticuerpo monoclonal de ratón anti-poliHistidina (R&D Systems # MAB050, Minneapolis, MN) en un solución salina amortiguada de fosfato (10X PBS, Abbott Bioresearch Center, Media Prep# MPS-073, Worcester, MA) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS que contiene 0.02% de Tween 20. Las placas fueron bloqueadas mediante la adición de 300 μL/pozo de solución de bloqueo (leche en polvo seca sin grasa, diversos provedores al por menor, diluida al 2% en PBS) durante 1/2 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas cuatro veces después del bloqueo con PBS que contiene 0.02% de Tween 20.

Alternativamente, se adicionaron cien microlitros por pozo de 10 μg/ml del antígeno Objetivo deseado Histidina (His) etiquetado (R&D Systems, Minneapolis, MN) a placas de ELISA recubiertas con anticuerpo monoclonal de ratón anti-poliHistidina tal como se describió anteriormente y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron cuatro veces con PBS que contiene 0.02% de Tween 20.

Se adicionaron cien microlitros de anticuerpo o preparaciones diluidas de DVD-Ig en solución de bloqueo como se describió anteriormente a la placa de antígeno Objetivo deseado o la placa de antígeno Objetivo deseado/fusión FC o a la placa de anticuerpo anti-poliHistidina/antígeno Objetivo deseado His etiquetado preparada como se describió anteriormente y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron cuatro veces con PBS que contiene 0.02% de Tween 20.

Se adicionaron cien microlitros de 10ng/mL de anticuerpo de cabra anti-IgG humana-FC específico HRP conjugado (Southern Biotech # 2040-05, Birmingham, AL) a cada pozo de la placa del antígeno Objetivo deseado o la placa de anticuerpo anti-poliHistidina/ antígeno Objetivo deseado Histidina etiquetado. Alternativamente, se adicionaron cien microlitros de 10 ng/mL de anticuerpo de cabra anti-IgG humana-de cadena ligera kappa específico HRP conjugado (Southern Biotech # 2060-05 Birmingham, AL) a cada pozo de la placa de antígeno Objetivo deseado/fusión FC y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas 4 veces con PBS que contiene 0.02% de Tween 20.

Se adicionaron cien microlitros de solución TMB mejorada (Neogen Corp. #308177, K Blue, Lexington, KY) a cada pozo y se incubaron durante10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante adición de 50 µL de ácido sulfúrico 1N. Las placas fueron leídas espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm.

La Tabla 3 contiene una lista de antígenos utilizados en el Ensayo de Unión Directa.

La Tabla 4 contiene los datos de unión expresados como EC50 en nM para aquellos anticuerpos y constructos de DVD-Ig evaluados en el ensayo de ELISA de unión directa.

En el ELISA de Unión Directa, ocasionalmente no se observa la unión la unión, probablemente porque el sitio de unión del anticuerpo en el antígeno objetivo, estaba bien sea "enmascarado" o el antígeno está "distorsionado" cuando se recubrió la superficie plástica. La incapacidad de una DVD-Ig para enlazar su objetivo también puede deberse a una limitación estérica impuesta sobre la DVD-Ig por el formato de ELISA de Unión Directa. Los anticuerpos base y las DVD-Igs que no se unieron en el formato de ELISA de Unión Directa se enlazaron al antígeno objetivo en otros formatos de ELISA, tales como FACS, Biacore o bioensayo. La no unión de una DVD-Ig también fue restaurada mediante el ajuste de la longitud del enlazante entre los dos dominios variables de la DVD-Ig, tal como se mostró previamente.

Tabla 3: Antígenos Empleados en ELISA de Enlace Directo

Ensayo	Antígeno	Designación del Vendedor	Vendedor	# de catálogo
CD-22	CD22/FC	Siglec-2 ECD/FC quimera	R&D	1968-SL-050
CD-40	CD40/FC	CD40 ECD/FC quimera-His tag	R&D	1493-CD-050
CD-80	CD80/FC	B7-1 ECD/FC quimera	R&D	140-B1-100
DLL4	DLL4	DLL4 ECD/His tag	R&D	1506-D4-050
EGFR	EGFR/FC	EGFR ECD/FC quimera	R&D	344-ER-050
HER-2	HER-2/FC	ErbB2 ECD/FC quimera-His tag	R&D	1129-ER-050
HGF	HGF	HGF-His tag	R&D	294-HG-025
IGF1	IGF1	IGF-I	R&D	291-G1-050
IGF2	IGF2	IGF-2	R&D	292-G2-050
IGF1R	IGF1R	IGF1R ECD	R&D	391-GR-050
NRP1	NRP1	Neuropilin-1 Npn-1-His tag	R&D	3870-N1-025
PlGF	PlGF	GF Placentario	R&D	264-PG-050
RON	RON	MSP Receptor ECD-His tag	R&D	1947-MS-050
VEGF	VEGF	VEGF 1-165 aa	R&D	293-VE-010
ErbB3	ErbB3	ErbB3 ECD/FC Quimera-His tag	R&D	348-RB-050

ECD = Dominio Extracelular

/quimera FC = antígeno/IgG FC proteína de fusión de dominio

Tabla 4: ELISA de Unión Directa de Anticuerpos Base y Constructos de DVD-Ig

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	ELISA de Unión directa de VD N-terminal EC50 (nM)	ELISA de Unión directa de VD C-terminal EC50 (nM)
AB006	CD-19		0.04	
AB001	CD-20			
DVD001	CD-20	CD-19		12.93
DVD002	CD-19	CD-20	0.07	
AB007	CD-80		0.77	
AB001	CD-20			
DVD005	CD-20	CD-80		9.77
DVD006	CD-80	CD-20	1.09	
AB008	CD-22		3.44	
AB001	CD-20			
DVD007	CD-20	CD-22		30.54
DVD008	CD-22	CD-20	4.79	
AB009	CD-40		0.99	
AB001	CD-20			
DVD009	CD-20	CD-40		3.55
DVD010	CD-40	CD-20	0.82	
AB002	CD-3			
AB004	HER-2		0.15	
DVD011	CD-3	HER-2		6.63
DVD012	HER-2	CD-3	1.24	

AB002	CD-3			
AB006	CD-19		0.14	
DVD013	CD-3	CD-19		7.29
DVD014	CD-19	CD-3	0.12	
AB033	EGFR		0.66	
AB004	HER-2		1.9	
DVD015	EGFR	HER-2	0.41	148.48
DVD016	HER-2	EGFR	1.25	5.23
AB002	CD-3			
AB033	EGFR		0.28	
DVD017	EGFR	CD-3	0.3	
DVD018	CD-3	EGFR		1.93
AB033	EGFR		0.27	
AB011	IGF1R		0.28	
DVD021	EGFR	IGF1R	0.33	134.95
DVD022	IGF1R	EGFR	0.26	0.74
AB005	RON		0.26	
AB033	EGFR		0.28	
DVD023	EGFR	RON	0.23	40.18
DVD024	RON	EGFR	0.54	1.87
AB033	EGFR		0.27	
AB012	HGF		0.22	
DVD025	EGFR	HGF	0.31	251.45
DVD026	HGF	EGFR	0.33	7.89
AB004	HER-2		0.44	
AB010	IGF1,2		4.77/10.02	
DVD029	HER-2	IGF1/IGF2	1226.04	229.33/206.12
DVD030	IGF1/IGF2	HER-2	1.75/5.49	10.65
AB004	HER-2		0.15	
AB011	IGF1R		0.28	
DVD031	HER-2	IGF1R	0.28	171.04
DVD032	IGF1R	HER-2	0.16	11.03
AB005	RON		0.21	
AB012	HGF		0.19	
DVD033	RON	HGF	0.22	11.95
DVD034	HGF	RON	0.27	116.46
AB014	VEGF		0.87	
AB033	EGFR		0.28	
DVD035	VEGF	EGFR	0.74	1.24
DVD036	EGFR	VEGF	0.18	336.13
AB014	VEGF		2.71	
AB004	HER-2		0.15	
DVD037	VEGF	HER-2	1.86	1.44
DVD038	HER-2	VEGF	0.66	106.77
AB001	CD-20			
AB014	VEGF		2.71	
DVD039	VEGF	CD-20	1.27	
DVD040	CD-20	VEGF		71.18
AB014	VEGF		0.87	
AB010	IGF1,2		4.77/18.13	
DVD041	VEGF	IGF1/IGF2	0.68	381.18/7335.24
DVD042	IGF1/IGF2	VEGF	2.54/17.62	42.3
AB015	DLL-4		0.31	
AB014	VEGF		2.71	
DVD043	VEGF	DLL4	28.25	2.12

DVD044	DLL4	VEGF	0.53	10.88
AB014	VEGF		2.95	
AB012	HGF		0.19	
DVD045	VEGF	HGF	2.87	184.53
DVD046	HGF	VEGF	0.5	46.3
AB005	RON		0.26	
AB014	VEGF		2.95	
DVD047	VEGF	RON	19.2	94.82
DVD048	RON	VEGF	0.46	42.95
AB014	VEGF		2.95	
AB016	NRP1		0.58	
DVD049	VEGF	NRP1	1.71	0.5
DVD050	NRP1	VEGF	0.46	219.02
AB015	DLL-4		0.31	
AB047	PlGF		0.2	
DVD257	DLL4	PlGF	0.28	2
DVD258	PlGF	DLL4	0.08	2.3
AB014	VEGF		1.09	
AB047	PlGF		0.2	
DVD259	VEGF	PlGF	0.79	1.3
DVD260	PlGF	VEGF	0.12	19.06
AB062	ErbB3		1.93	
AB033	EGFR		0.68	
DVD299	ErbB3	EGFR	1.96	17.38
DVD300	EGFR	ErbB3	0.49	7633.3
AB063	ErbB3		0.28	
AB033	EGFR		0.68	
DVD305	ErbB3	EGFR	0.44	24.39
DVD306	EGFR	ErbB3	0.36	150.92

Se mantuvo la unión de todos los constructos de DVD-Ig y fue comparable con la de los anticuerpos base. Todos los dominios variables N-terminales se unen con una afinidad alta similar a la del anticuerpo base así como también los dominios variables C-terminales de los constructos de DVD-Ig DVD009, DVD016, DVD018, DVD022, DVD024, DVD035, DVD37, DVD043, DVD044, DVD49, DVD257, DVD258 y DVD259.

Las Tablas 5 y 6 contienen los datos de VEGF del ELISA de Unión Directa para tres anticuerpos base VEGF y 96 constructos de DVD-Ig tanto con los dominios variables C-terminales (C-term.) o N-terminales (N-term.) derivados de los dominios variables de los Anticuerpos de Referencia VEGF base (Ref. Ab.) AB014 - VEGF (seq. 1), AB071 - VEGF (seq. 2) y AB070 - VEGF (seq. 3). Estos dominios variables están apareados con cuatro dominios variables DLL-4 derivados de cuatro DLL-4 Ref. Ab. (AB015 - DLL-4 (seq. 1), AB069- DLL-4 (seq.2), AB073- DLL-4 (seq.3), y AB072 - DLL-4 (seq.4). Los dominios variables de DVD-Ig están conectados mediante 2 longitudes de enlazante

(Corto y Largo en bien sea la cadena pesada (enlazante HC) y/o en la cadena ligera (enlazante LC), de donde resultan cuatro posibles combinaciones de enlazante: Corto-Corto, Largo-Largo, Corto-Largo y Largo-Corto. La combinación de estos 5 factores (3 secuencias VEGF x 2 Orientaciones x 2 enlazantes HC x 2 enlazantes LC x 4 secuencias DLL-4) resultan en el factorial completo del experimento de 96 DVDs.

Tabla 5: ELISA de Unión Directa de 96 Constructos de DVD con Varias Secuencias de VEGF, Orientaciones y Combinaciones de Longitud de enlazante para VEGF

ID de DVD	ID de Secuencia	Posi-ción	Enlazante HC	Enlazante LC	Otro Dominio DVD	VEGF de DVD EC50 (nM)	ID de Ab. Ref.	RefAb VEGF EC50 (nM)
DVD043	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 1)	1.25	AB014	2.36
DVD044	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 1)	407.52	AB014	2.36
DVD469	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 1)	1262.59	AB014	2.36
DVD470	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 1)	1.87	AB014	2.36
DVD475	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 1)	19.17	AB014	1.51
DVD476	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 1)	0.55	AB014	1.51
DVD481	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 1)	150.24	AB014	1.51
DVD482	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 1)	1.30	AB014	1.51
DVD467	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 1)	1805.23	AB071	60.82
DVD468	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 1)	25.55	AB071	60.82
DVD473	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 1)	388.01	AB071	60.82
DVD474	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 1)	17.93	AB071	60.82
DVD479	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 1)	455.50	AB071	68.55
DVD480	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 1)	22.98	AB071	68.55
DVD485	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 1)	121.21	AB071	68.55
DVD486	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 1)	27.96	AB071	68.55
DVD465	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 1)	396.45	AB070	1.82
DVD466	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 1)	2.61	AB070	1.82
DVD471	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 1)	30.05	AB070	1.82
DVD472	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 1)	9.22	AB070	1.82
DVD477	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 1)	41.66	AB070	3.59
DVD478	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 1)	2.72	AB070	3.59
DVD483	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 1)	46.09	AB070	3.59
DVD484	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 1)	4.84	AB070	3.59
DVD441	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 2)	247.99	AB014	1.52
DVD442	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 2)	0.59	AB014	1.52
DVD447	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 2)	5.05	AB014	1.52
DVD448	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 2)	1.59	AB014	1.52
DVD453	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 2)	35.28	AB014	1.50

DVD454	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 2)	1.43	AB014	1.50
DVD459	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 2)	6.17	AB014	1.50
DVD460	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 2)	0.94	AB014	1.50
DVD445	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 2)	14482.02	AB071	48.07
DVD446	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 2)	14.38	AB071	48.07
DVD451	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 2)	2404.95	AB071	48.07
DVD452	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 2)	17.75	AB071	48.07
DVD457	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 2)	1475.74	AB071	40.24
DVD458	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 2)	21.51	AB071	40.24
DVD463	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 2)	1730.97	AB071	40.24
DVD464	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 2)	19.31	AB071	40.24
DVD443	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 2)	610.53	AB070	1.05
DVD444	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 2)	2.44	AB070	1.05
DVD449	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 2)	15.61	AB070	1.05
DVD450	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 2)	12.06	AB070	1.05
DVD455	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 2)	26.71	AB070	1.11
DVD456	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 2)	1.63	AB070	1.11
DVD461	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 2)	10.44	AB070	1.11
DVD462	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 2)	8.00	AB070	1.11
DVD511	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 3)	35.11	AB014	0.75
DVD512	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 3)	0.71	AB014	0.75
DVD517	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 3)	9.78	AB014	0.75
DVD518	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 3)	162.44	AB014	0.75
DVD523	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 3)	9.67	AB014	0.49
DVD524	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 3)	0.30	AB014	0.49
DVD529	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 3)	2.64	AB014	0.49
DVD530	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 3)	0.79	AB014	0.49
DVD515	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 3)	3015.10	AB071	35.19
DVD516	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 3)	24.65	AB071	35.19
DVD521	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 3)	654.85	AB071	35.19
DVD522	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 3)	23.53	AB071	35.19
DVD527	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 3)	2380.25	AB071	52.97
DVD528	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 3)	27.69	AB071	52.97
DVD533	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 3)	1260.61	AB071	52.97
DVD534	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 3)	23.61	AB071	52.97
DVD513	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 3)	58.54	AB070	0.97
DVD514	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 3)	67.41	AB070	0.97
DVD519	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 3)	77.17	AB070	0.97
DVD520	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 3)	247.74	AB070	0.97
DVD525	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 3)	21.79	AB070	1.42
DVD526	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 3)	96.22	AB070	1.42
DVD531	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 3)	60.39	AB070	1.42
DVD532	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 3)	28.91	AB070	1.42
DVD487	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 4)	39.78	AB014	1.61
DVD488	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 4)	4.98	AB014	1.61
DVD493	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 4)	2.26	AB014	1.61
DVD494	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 4)	712.21	AB014	1.61

DVD499	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 4)	5.07	AB014	1.41
DVD500	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 4)	5.28	AB014	1.41
DVD505	VEGF (Seq. 1)	C-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 4)	1.27	AB014	1.41
DVD506	VEGF (Seq. 1)	N-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 4)	1.84	AB014	1.41
DVD491	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 4)	1249.97	AB071	45.67
DVD492	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 4)	8.42	AB071	45.67
DVD497	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 4)	858.21	AB071	45.67
DVD498	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 4)	30.61	AB071	45.67
DVD503	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 4)	429.96	AB071	37.84
DVD504	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 4)	16.74	AB071	37.84
DVD509	VEGF (Seq. 2)	C-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 4)	121.28	AB071	37.84
DVD510	VEGF (Seq. 2)	N-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 4)	23.89	AB071	37.84
DVD489	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 4)	180.95	AB070	2.80
DVD490	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Corto	Corto	DLL4 (seq. 4)	6.70	AB070	2.80
DVD495	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 4)	69.95	AB070	2.80
DVD496	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Largo	Largo	DLL4 (seq. 4)	107.87	AB070	2.80
DVD501	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 4)	45.16	AB070	2.44
DVD502	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Largo	Corto	DLL4 (seq. 4)	3.25	AB070	2.44
DVD507	VEGF (Seq. 3)	C-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 4)	34.85	AB070	2.44
DVD508	VEGF (Seq. 3)	N-term.	Corto	Largo	DLL4 (seq. 4)	7.88	AB070	2.44

Se mantuvo la unión de todos los constructos de DVD-Ig a VEGF y fue comparable con la de los anticuerpos base. Todos los dominios variables N-terminales se unieron con una alta afinidad similar a la del anticuerpo base. Algunas combinaciones específicas de longitud de enlazante en la cadena pesada y la cadena ligera mejoraron la afinidad de unión de los dominios C-terminales en comparación con el anticuerpo base. Específicamente hay una mejoría estadísticamente significativa (p=0.019) en la afinidad del dominio C-terminal con un enlazante largo en lugar de un enlazante corto en la cadena ligera.

Tabla 6: <u>ELISA de Unión Directa de 96 Constructos de DVD-Ig Con Varias Secuencias DLL4, Orientaciones Y Combinaciones de Longitud Enlazante para DLL</u>

ID de DVD-Ig	ID de Secuencia	Orien-tación	Enlazante HC	Enlazante LC	Dominio Variable de otras DVD-Ig	DLL4 de DVD-Ig EC50 (nM)	ID del Ab. Ref.	Ref.Ab. DLL4 EC50 (nM)
DVD043	DLL4 (Seq. 1)	C-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 1)	0.67	AB015	1.39
DVD044	DLL4 (Seq. 1)	N-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 1)	0.25	AB015	1.39

ID de DVD-Ig	ID de Secuencia	Orien-tación	Enlazante HC	Enlazante LC	Dominio Variable de otras DVD-Ig	DLL4 de DVD-Ig EC50 (nM)	ID del Ab. Ref.	Ref.Ab. DLL4 EC50 (nM)
DVD469	DLL4 (Seq. 1)	N-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 1)	2.78	AB015	1.39
DVD470	DLL4 (Seq. 1)	C-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 1)	0.19	AB015	1.39
DVD475	DLL4 (Seq. 1)	N-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 1)	0.23	AB015	1.23
DVD476	DLL4 (Seq. 1)	C-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 1)	0.30	AB015	1.23
DVD481	DLL4 (Seq. 1)	N-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 1)	3.30	AB015	1.23
DVD482	DLL4 (Seq. 1)	C-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 1)	0.36	AB015	1.23
DVD441	DLL4 (Seq. 4)	N-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 1)	0.04	AB069	0.10
DVD442	DLL4 (Seq. 4)	C-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 1)	10.55	AB069	0.10
DVD447	DLL4 (Seq. 4)	N-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 1)	0.12	AB069	0.10
DVD448	DLL4 (Seq. 4)	C-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 1)	0.41	AB069	0.10
DVD453	DLL4 (Seq. 4)	N-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 1)	0.09	AB069	0.04
DVD454	DLL4 (Seq. 4)	C-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 1)	1.01	AB069	0.04
DVD459	DLL4 (Seq. 4)	N-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 1)	0.26	AB069	0.04
DVD460	DLL4 (Seq. 4)	C-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 1)	0.64	AB069	0.04
DVD511	DLL4 (Seq. 2)	N-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 1)	0.10	AB073	0.08
DVD512	DLL4 (Seq. 2)	C-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 1)	1.71	AB073	0.08
DVD517	DLL4 (Seq. 2)	N-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 1)	0.10	AB073	0.08
DVD518	DLL4 (Seq. 2)	C-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 1)	5.90	AB073	0.08
DVD523	DLL4 (Seq. 2)	N-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 1)	0.09	AB073	0.03
DVD524	DLL4 (Seq. 2)	C-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 1)	0.22	AB073	0.03
DVD529	DLL4 (Seq. 2)	N-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 1)	0.10	AB073	0.03
DVD530	DLL4 (Seq. 2)	C-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 1)	0.22	AB073	0.03
DVD487	DLL4 (Seq. 3)	N-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 1)	0.14	AB072	1.29
DVD488	DLL4 (Seq. 3)	C-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 1)	1.84	AB072	1.29
DVD493	DLL4 (Seq. 3)	N-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 1)	0.06	AB072	1.29
DVD494	DLL4 (Seq. 3)	C-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 1)	39.48	AB072	1.29
DVD499	DLL4 (Seq. 3)	N-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 1)	0.09	AB072	0.70
DVD500	DLL4 (Seq. 3)	C-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 1)	0.57	AB072	0.70
DVD505	DLL4 (Seq. 3)	N-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 1)	0.09	AB072	0.70
DVD506	DLL4 (Seq. 3)	C-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 1)	0.32	AB072	0.70
DVD467	DLL4 (Seq. 1)	N-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 2)	0.54	AB015	0.30
DVD468	DLL4 (Seq. 1)	C-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 2)	2.28	AB015	0.30
DVD473	DLL4 (Seq. 1)	N-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 2)	1.80	AB015	0.30
DVD474	DLL4 (Seq. 1)	C-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.57	AB015	0.30
DVD479	DLL4 (Seq. 1)	N-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 2)	1.69	AB015	0.28
DVD480	DLL4 (Seq. 1)	C-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 2)	0.60	AB015	0.28
DVD485	DLL4 (Seq. 1)	N-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 2)	1.41	AB015	0.28
DVD486	DLL4 (Seq. 1)	C-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.59	AB015	0.28
DVD445	DLL4 (Seq. 4)	N-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 2)	0.17	AB069	0.20
DVD446	DLL4 (Seq. 4)	C-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 2)	13.92	AB069	0.20
DVD451	DLL4 (Seq. 4)	N-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.40	AB069	0.20
DVD452	DLL4 (Seq. 4)	C-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.34	AB069	0.20

ID de DVD-Ig	ID de Secuencia	Orien-tación	Enlazante HC	Enlazante LC	Dominio Variable de otras DVD-Ig	DLL4 de DVD-Ig EC50 (nM)	ID del Ab. Ref.	Ref.Ab. DLL4 EC50 (nM)
DVD457	DLL4 (Seq. 4)	N-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 2)	0.13	AB069	0.21
DVD458	DLL4 (Seq. 4)	C-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 2)	1.54	AB069	0.21
DVD463	DLL4 (Seq. 4)	N-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.50	AB069	0.21
DVD464	DLL4 (Seq. 4)	C-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.80	AB069	0.21
DVD515	DLL4 (Seq. 2)	N-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 2)	0.20	AB073	0.11
DVD516	DLL4 (Seq. 2)	C-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 2)	4.33	AB073	0.11
DVD521	DLL4 (Seq. 2)	N-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.26	AB073	0.11
DVD522	DLL4 (Seq. 2)	C-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.48	AB073	0.11
DVD527	DLL4 (Seq. 2)	N-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 2)	0.20	AB073	0.11
DVD528	DLL4 (Seq. 2)	C-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 2)	0.81	AB073	0.11
DVD533	DLL4 (Seq. 2)	N-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.25	AB073	0.11
DVD534	DLL4 (Seq. 2)	C-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.47	AB073	0.11
DVD491	DLL4 (Seq. 3)	N-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 2)	0.39	AB072	1.99
DVD492	DLL4 (Seq. 3)	C-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq. 2)	1.77	AB072	1.99
DVD497	DLL4 (Seq. 3)	N-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.53	AB072	1.99
DVD498	DLL4 (Seq. 3)	C-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.45	AB072	1.99
DVD503	DLL4 (Seq. 3)	N-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 2)	0.33	AB072	1.85
DVD504	DLL4 (Seq. 3)	C-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq. 2)	0.53	AB072	1.85
DVD509	DLL4 (Seq. 3)	N-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.21	AB072	1.85
DVD510	DLL4 (Seq. 3)	C-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq. 2)	0.42	AB072	1.85
DVD465	DLL4 (Seq. 1)	N-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq.3)	0.57	AB015	0.60
DVD466	DLL4 (Seq. 1)	C-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq.3)	19.84	AB015	0.60
DVD471	DLL4 (Seq. 1)	N-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq.3)	0.89	AB015	0.60
DVD472	DLL4 (Seq. 1)	C-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq.3)	2.78	AB015	0.60
DVD477	DLL4 (Seq. 1)	N-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq.3)	0.69	AB015	0.58
DVD478	DLL4 (Seq. 1)	C-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq.3)	2.53	AB015	0.58
DVD483	DLL4 (Seq. 1)	N-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq.3)	0.63	AB015	0.58
DVD484	DLL4 (Seq. 1)	C-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq.3)	1.75	AB015	0.58
DVD443	DLL4 (Seq. 4)	N-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq.3)	0.20	AB069	0.23
DVD444	DLL4 (Seq. 4)	C-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq.3)	30.54	AB069	0.23
DVD449	DLL4 (Seq. 4)	N-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq.3)	0.36	AB069	0.23
DVD450	DLL4 (Seq. 4)	C-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq.3)	1.99	AB069	0.23
DVD455	DLL4 (Seq. 4)	N-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq.3)	0.24	AB069	0.24
DVD456	DLL4 (Seq. 4)	C-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq.3)	2.48	AB069	0.24
DVD461	DLL4 (Seq. 4)	N-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq.3)	0.52	AB069	0.24
DVD462	DLL4 (Seq. 4)	C-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq.3)	7.99	AB069	0.24
DVD513	DLL4 (Seq. 2)	N-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq.3)	0.66	AB073	0.22
DVD514	DLL4 (Seq. 2)	C-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq.3)	21.05	AB073	0.22
DVD519	DLL4 (Seq. 2)	N-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq.3)	1.53	AB073	0.22
DVD520	DLL4 (Seq. 2)	C-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq.3)	17.34	AB073	0.22
DVD525	DLL4 (Seq. 2)	N-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq.3)	1.00	AB073	0.21
DVD526	DLL4 (Seq. 2)	C-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq.3)	1.57	AB073	0.21

ID de DVD-Ig	ID de Secuencia	Orien-tación	Enlazante HC	Enlazante LC	Dominio Variable de otras DVD-Ig	DLL4 de DVD-Ig EC50 (nM)	ID del Ab. Ref.	Ref.Ab. DLL4 EC50 (nM)
DVD531	DLL4 (Seq. 2)	N-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq.3)	0.57	AB073	0.21
DVD532	DLL4 (Seq. 2)	C-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq.3)	1.43	AB073	0.21
DVD489	DLL4 (Seq. 3)	N-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq.3)	0.62	AB072	63.43
DVD490	DLL4 (Seq. 3)	C-term.	Corto	Corto	VEGF (Seq.3)	9.27	AB072	63.43
DVD495	DLL4 (Seq. 3)	N-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq.3)	0.33	AB072	63.43
DVD496	DLL4 (Seq. 3)	C-term.	Largo	Largo	VEGF (Seq.3)	5.59	AB072	63.43
DVD501	DLL4 (Seq. 3)	N-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq.3)	0.18	AB072	63.24
DVD502	DLL4 (Seq. 3)	C-term.	Largo	Corto	VEGF (Seq.3)	3.17	AB072	63.24
DVD507	DLL4 (Seq. 3)	N-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq.3)	0.71	AB072	63.24
DVD508	DLL4 (Seq. 3)	C-term.	Corto	Largo	VEGF (Seq.3)	0.61	AB072	63.24

Se mantuvo la unión de todos los constructos de DVD-Ig a DLL4 y fue comparable con la de los anticuerpos base. Todos los dominios variables N-terminales se unieron con una alta afinidad similar a la del anticuerpo base. Algunas combinaciones específicas de longitud de enlazante en la cadena pesada y la cadena ligera mejoraron la afinidad de unión de los dominios C-terminales en comparación con el anticuerpo base. Específicamente existe una tendencia a la mejoría de la afinidad del dominio C-terminal con un enlazante largo en la cadena ligera y/o cadena pesada en lugar de un enlazante corto en ambas cadenas, la ligera y la pesada.

Ejemplo 1.1.1.B: ELISA de Captura – VEGF

Se incubaron placas de ELISA (Nunc, MaxiSorp, Rochester, NY) durante la noche a 4 °C con anticuerpo Fc anti-humano (5 µg/ml en PBS, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Las placas se lavaron tres veces en amortiguador de lavado (PBS que contiene 0.05% de Tween 20), y se bloquearon durante 1 hora a 25 °C en amortiguador de bloqueo (PBS que contiene BSA al 1%). Los pozos se lavaron tres veces, y se adicionaron diluciones seriales de cada anticuerpo o DVD-Ig en PBS que contiene BSA al 0.1% a los pozos y se incubaron a 25 °C durante 1 hora. Los pozos se lavaron tres veces, y se adicionó VEGF (2nM) biotinilado a las placas y se incubaron durante 1 hora a 25 °C. Los pozos se lavaron tres veces, y posteriormente se incubaron durante1 hora a 25 °C con estreptavidina-HRP (KPL #474-3000, Gaithersburg, MD). Los pozos se lavaron tres veces, y se adicionaron 100 µl de

ULTRA-TMB ELISA (Pierce, Rockford, IL) por pozo. Siguiendo el desarrollo del color, la reacción se detuvo con HCL 1N y se midió la absorbancia a 450 nM. Los datos de ELISA de captura de VEGF se indican en la Tabla 7.

Ejemplo 1.1.1.C: ELISA de Captura IgG-Fc – RON

Se recubrieron placas de 96 pozos Nunc-Immuno con 2 μg/mL de anticuerpo de cabra anti-IgG humana-FC específico (Jackson Immunoresearch # 109-055-098, West Grove, PA, 50 μL/pozo) en PBS (Gibco #10010-023 de Invitrogen, Grand Islnd, NY), y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con amortiguador de lavado (PBS, 0.05% de Tween 20) y se bloquearon subsecuentemente con 100 μL/pozo de amortiguador de bloqueo (PBS, BSA al 2%) durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces y se incubaron con 50μL/pozo de una solución de 1 μg/mL del anticuerpo o DVD-Ig apropiado durante una hora a temperatura ambiente. Luego de una hora de incubación, las placas se lavaron tres veces y se incubaron con 50 μL/pozo de proteina RON recombinante his-etiquetada (R&D Systems # 1947-MS, Minneapolis, MN, 1000nM a 0nM rango de dosis final) durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces, y se adicionaron 50 μL/pozo de un anticuerpo de conejo-anti-His etiqueta-HRP (Abcam abll87, Cambridge, MA, diluido a 1:10,000 en solución BSA/PBS 2%) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Luego del lavado final, se adicionaron 50 μl/pozo del substrato TMB (Pierce #34028, Rockford, IL), y la reacción se finalizó después de cinco minutos utilizando 50 μl/pozo de H_2SO_4 2N. La absorbancia se leyó a 450 nm (lector de placa Spectra Max Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se calcularon los EC50 en GraphPad Prism 4.03. Los datos de ELISA de captura RON se muestran en la Tabla 7.

Ejemplo 1.1.1.D: ELISA de Captura - IGF1,2

Se recubrieron placas Nunc-Immuno de 96 pozos con 5 μg/ml de anticuerpo contra IgG humana (fragmento específico Fcγ, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, #109-005-098, 100 μl/pozo) en D-PBS (Gibco #14190, San Diego, CA) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Se lavaron las placas de ELISA tres veces en amortiguador de lavado (PBS, 0.05% de Tween 20) y

posteriormente se bloquearon con 200 µl/pozo de amortiguador de bloqueo (D-PBS, BSA al 1%) durante 1 hora a 25 °C. Posteriormente las placas fueron lavadas e incubadas con 100 µl/pozo de anticuerpos o DVD-Igs (0.01 µg/mL-100 µg/mL en amortiguador de bloqueo) durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron posteriormente tres veces y se incubaron con IGF1 o IGF2 humana marcada con biotina (rango de dosis 0.02 nM -100 nM en amortiguador de bloqueo, 100 µl/pozo) durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron tres veces y se incubaron con estreptavidina conjugada con HRP (KPL #474-3000, Gaithersburg, MD, dilución 1:10,000 en amortiguador de bloqueo, 100 µl/pozo) durante 1 hora a 25 °C. Luego del lavado final, las placas se incubaron con 100 µl/pozo de sustrato de ELISA (1-Step Ultra TMB- ELISA, Pierce #340280, Rockford, IL). La reacción se detuvo después de 5 minutos a 25 °C con 100 µl/pozo de $H2SO_4$ 2N y la absorbancia se leyó a 450 nm. Los datos de ELISA de captura IGF 1,2 se muestran en la Tabla 7.

Ejemplo 1.1.1.E: ELISA de Captura - DLL4

Se recubrieron placas Nunc-Immuno de 96 pozos (#439454, Rochester, NY) con 5 µg/ml de anticuerpo contra IgG humana (fragmento específico Fc, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA #109-005-098, 100 µL/pozo) en D-PBS (Gibco #14190, Grand Island, NY) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas de ELISA se lavaron tres veces con amortiguador de lavado (PBS, 0.05% de Tween 20) y luego se bloquearon con 200 µl/pozo de amortiguador de bloqueo (D-PBS, BSA al 1%, $CaCl_2$ 1 mM, 0.05% de Tween 20) durante 1 hora a 25 °C. Las placas se lavaron tres veces y se incubaron con 100 µ1/pozo de anticuerpos DLL4 (0.0001-100 nM, dilución serial 10 veces en amortiguador de bloqueo) durante 1 hora a 25 °C, y posteriormente se lavaron nuevamente tres veces. Las placas que contienen Ab DLL4 capturado se incubaron con dominio extracelular DLL4 humano marcado con biotina (10 nM en amortiguador de bloqueo, 100 µl/pozo) durante 1 hora a 25 °C, se lavaron tres veces, y se incubaron con estreptavidina conjugada con HRP (KPL #474-3000C, lavado tres veces, e incubado con estreptavidina conjugada con HRP (KPL #474-3000, Gaithersburg, MD, 1:10,000 dilución en amortiguador de bloqueo, 100 µl/pozo) durante1 hora a 25 °C. Luego del lavado final, las placas se incubaron con 100 µl/pozo de substrato de ELISA (1-Step Ultra TMB-ELISA, Pierce #340280, Rockford, IL). La reacción se detuvo después de 2 minutos a

25 °C con 100 µl/pozo de H_2SO_4 2N y la absorbancia se leyó a 450 nm. Los datos de ELISA de captura DLL4 se muestran en la Tabla 7.

Ejemplo 1.1.1.F: ELISA de Captura - ErbB3 o EGFR

Se recubrieron placas de ELISA de 96 pozos con cabra IgG anti-humana Fc (Jackson Immunoresearch, PA) a una concentración de 33 nM, y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con PBS que contiene 0.05% de Tween 20 y se bloquearon con 200 µl/pozo de BSA 1%/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se adicionaron cincuenta µl de DVD-Ig o anticuerpo 5 nM a cada pozo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron, y posteriormente se incubaron con 50 µl/pozo de ErbB3 biotinilado o EGFR biotinilado a varias concentraciones durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente y posteriormente se incubaron con 50 µl/pozo de estreptavidina-HRP conjugado (KPL #474-3000, Protein Research Products, MD) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron tres veces, y se adicionaron 100 µl de ELISA ULTRA-TMB (Pierce, Rockford, IL) por pozo. Siguiendo el desarrollo de color, la reacción se detuvo con HCL 1N y se midió la absorbancia a 450 nM.

La Tabla 7 contiene la afinidad, expresada como EC50 en nM, de anticuerpos base y constructos de DVD-Ig en los VEGF, RON, EGFR, IGFR, IGF-1,2, HER-2, DLL4, y ErbB3.

Tabla 7: ELISA de Captura de Antígeno VEGF, RON, EGFR, ErbB3, IGFR, IGF-1,2, DLL4 y HER-2 de Anticuerpos Base y Constructos de DVD-Ig

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal	Dominio Variable C-terminal	Unión de Ag N-terminal en ELISA de Captura (EC50, nM)	Unión de Ag C-terminal en ELISA de Captura (EC50, nM)
AB004	HER-2		0.4	
AB010	IGF1,2		4.8, 10	
DVD029	HER-2	IGF1,2		229, 206
DVD030	IGF1,2	HER-2	1.8, 5.5	10.7
AB033	EGFR		0.3	

AB011	IGF1R		0.3	
DVD021	EGFR	IGF1R	0.3	135
DVD022	IGF1R	EGFR	0.3	0.7
AB005	RON		1.6	
DVD024	RON	EGFR	1.96	
DVD023	EGFR	RON		>100
AB004	HER-2		0.2	
AB011	IGF1R		0.3	
DVD031	HER-2	IGF1R	0.3	171
DVD032	IGF1R	HER-2	0.2	11
AB005	RON		0.7	
AB012	HGF			
DVD033	RON	HGF	2.5	
DVD034	HGF	RON		
AB014	VEGF		0.24	
DVD035	VEGF	EGFR	0.24	
AB014	VEGF		0.24	
DVD038	HER-2	VEGF		2.00
AB014	VEGF		0.9	
AB010	IGF1,2		4.8, 18.1	
DVD041	VEGF	IGF1,2	0.7	381, 7335
DVD042	IGF1,2	VEGF	2.5, 17.6	42.3
AB015	DLL-4		0.03	
AB014	VEGF		0.24	
DVD044	DLL4	VEGF	0.06	4.20
DVD043	VEGF	DLL4	0.20	0.50
AB014	VEGF		0.24	
AB012	HGF			
DVD045	VEGF	HGF	0.29	>100
AB005	RON		1.3	
AB014	VEGF		0.24	
DVD048	RON	VEGF	2.7	3.60
DVD047	VEGF	RON	0.36	>100
AB014	VEGF		0.24	
DVD049	VEGF	NRP1	4.80	
DVD050	NRP1	VEGF		2.30
AB014	VEGF		0.53	
DVD260	PlGF	VEGF		1.70
AB062	ErbB3		0.26	
DVD299	ErbB3	EGFR	0.32	>10.0

AB063	ErbB3		0.67	
AB033	EGFR			
DVD305	ErbB3	EGFR	1.16	
DVD306	EGFR	ErbB3		>10.0

Se mantuvo la unión de todos los constructos DVD-Ig al antígeno soluble y fue comparable con los anticuerpos base. Todos los dominios variables N-terminales se unieron con una afinidad alta similar a la del anticuerpo base así como también los dominios variables C-terminales de DVD022, DVD038, DVD043, DVD048, DVD50 y DVD260.

Ejemplo 1.1.1.G: Determinación de Afinidad utilizando la tecnología BIACORE

Tabla 8: Reactivo Utilizado en Análisis Biacore

Ensayo	Antígeno	Designación del Vendedor	Vendedor	# de Catálogo
DLL4	DLL4	DLL ECD His tag	R&D	1506-D4-050
EGFR	EGFR	EGFR ECD	R&D	1095-ER
HER-2	HER-2/FC	ErbB2/FC quimera-His tag	R&D	1129-ER-050
HGF	HGF	HGF	R&D	294-HG-025
IGF1	IGF1	IGF-I	R&D	291-G1-050
IGF2	IGF2	IGF-2	R&D	292-G2-050
IGF1R	IGF1R	IGF1R ECD	R&D	391-GR-050
NRP1	NRP1	Neuropilin-1 Npn-1-His tag	R&D	3870-N1-025
PlGF	PlGF	GF Placentario	R&D	264-PG-050
RON	RON	MSP Receptor ECD-His tag	R&D	1947-MS-050
VEGF	VEGF	VEGF	R&D	293-VE-010
ErbB3	ErbB3	ErbB3/FC Quimera-His tag	R&D	348-RB

ECD = Dominio Extracelular

/FC = antígeno/IgG FC proteína de fusión de dominio

Métodos BIACORE:

El ensayo BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NI) determina la afinidad de los anticuerpos o DVD-Ig con medidas cinéticas de las constantes de asociación y de disociación. La unión de los anticuerpos o DVD-Ig a un antígeno objetivo (por ejemplo, un antígeno recombinante objetivo purificado) se determina mediante medidas basadas en resonancia de plasmón superficial

con un instrumento Biacore® 1000 o 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia) utilizando HBS-EP de corrida (HEPES 10 mM [pH 7.4], NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, y surfactante P20 0.005%) a 25 °C. Todos los químicos se obtuvieron a partir de Biacore® AB (Uppsala, Suecia) o de otra forma a partir de una fuente diferente como la descrita en el texto. Por ejemplo, aproximadamente 5000 RU de cabra anti-IgG de ratón, (Fcγ), anticuerpo policlonal de fragmento específico (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4.5) se inmovilizaron directamente a través de un chip biosensor CM5 grado investigación usando un equipo de acoplamiento a amina estándar de acuerdo con las instrucciones y procedimientos del fabricante a 25 µg/ml. Las porciones que no reaccionaron en la superficie del biosensor son bloqueadas con etanolamina. Se utilizó la superficie de carboximetil dextrano modificada en flujo celular 2 y 4 como una superficie de reacción. Se utilizó el carboximetil dextrano no modificado sin cabra anti-IgG de ratón en flujo celular 1 y 3 como superficie de referencia. Para el análisis cinético, se ajustan simultáneamente las ecuaciones de velocidad derivadas del modelo dla unión 1:1 de Langmuir, a las fases de asociación y disociación de las ocho inyecciones (usando análisis de ajuste global) con el uso del software Biaevaluation 4.0.1. Los anticuerpos o DVD-Ig purificados se diluyeron en HEPES-solución salina amortiguada para captura a través de superficies de reacción específicas de cabra anti-IgG de ratón. Los anticuerpos o DVD-Ig a ser capturados como un ligando (25 µg/ml) se inyectaron sobre matrices de reacción a una velocidad de flujo de 5 µl/min. Se determinaron las constantes de velocidad de asociación y disociación, k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (s^{-1}) bajo una velocidad de flujo continua de 25 µl/min. Las constantes de velocidad se derivan haciendo medidas de enlace cinético a diferentes concentraciones de antígeno en el rango de 10 - 200 nM. Posteriormente se calcula la constante de disociación en el equilibrio (M) de la reacción entre los anticuerpos o DVD-Igs y el antígeno objetivo a partir de las constantes de velocidad cinéticas seguidas por medio de la siguiente fórmula: $K_D = k_{off}/k_{on}$. Se registra la unión como una función del tiempo y se calculan las constantes de velocidad cinética. En este ensayo, se pueden medir asociaciones tan rápidas como 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ y disociaciones tan lentas como $10^{-6}s^{-1}$.

Tabla 9: Análisis BIACORE de Anticuerpos Base y Constructos DVD

ID de Anticuerpo	Dominio	Dominio	k_{on}	k_{off}	K_D

			(M-1s-1)	(s-1)	(M)
AB011	IGF1R		7.32E+04	6.21E-05	8.48E-10
DVD021	EGFR		1.22E+06	1.80E-03	1.47E-9
DVD021		IGF1R			
DVD022	IGF1R		1.06E+05	8.25E-05	7.78E-10
DVD022		EGFR	8.03E+04	2.26E-04	2.81E-9
AB004	HER-2		3.22E+05	1.28E-05	3.97E-11
AB011	IGF1R		7.32E+04	6.21E-05	8.48E-10
DVD031	HER-2		3.30E+05	7.02E-06	2.12E-11
DVD031		IGF1R			
DVD032	IGF1R		5.10E+04	4.23E-05	8.29E-10
DVD032		HER-2	1.84E+04	9.31E-06	5.05E-10
AB004	HER-2		3.22E+05	1.28E-05	3.97E-11
AB010	IGF1		3.17E+06	1.23E-03	3.88E-10
AB010	IGF2		6.47E+06	2.74E-06	4.23E-13
DVD029	HER-2		2.42E+05	9.64E-06	3.98E-11
DVD029		IGF1	6.65E+04	4.23E-04	6.36E-9
DVD029		IGF2	1.04E+05	3.15E-05	3.02E-10
DVD030	IGF1		3.96E+06	1.16E-03	2.92E-10
DVD030	IGF2		8.46E+06	1.98E-05	2.34E-12
DVD030		HER-2	1.54E+05	7.36E-04	4.77E-9
AB033	EGFR		7.93E+04	1.39E-03	1.75E-8
AB004	HER-2		3.22E+05	1.28E-05	3.97E-11
DVD015	EGFR		1.79E+06	1.96E-03	1.09E-9
DVD015		HER-2			
DVD016	HER-2		2.44E+05	4.36E-06	1.78E-11
DVD016		EGFR	2.36E+04	4.53E-04	1.92E-8
AB014	VEGF		1.47E+05	3.03E-05	2.07E-10
AB010	IGF1				
AB010	IGF2		3.35E+06	<1.00E-06	<2.99E-13
DVD041	VEGF		5.26E+05	2.39E-06	4.55E-12
DVD041		IGF1			
DVD041		IGF2	8.09E+04	<1.00E-06	<1.24E-11
DVD042	IGF1				
DVD042	IGF2		5.20E+06	5.18E-06	9.98E-13
DVD042		VEGF	3.45E+04	1.46E-05	4.21E-10
AB005	RON		3.66E+04	7.39E-04	2.02E-8
AB033	EGFR		7.93E+04	1.39E-03	1.75E-8
DVD024	RON		4.56E+04	8.52E-04	1.86E-8
DVD024		EGFR			
DVD023	EGFR		2.08E+06	2.22E-03	1.06E-9
DVD023		RON			

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	k_{on} (M-1s-1)	k_{off} (s-1)	K_D (M)
AB005	RON		3.66E+04	7.39E-04	2.02E-8
AB012	HGF		>1.00E+7	2.84E-04	<2.84E-11
DVD033	RON		1.56E+05	1.18E-03	7.60E-09
DVD033		HGF	2.97E+05	9.20E-05	3.10E-10
DVD034	HGF		3.05E+06	6.55E-05	2.15E-11
DVD034		RON			
AB005	RON		3.66E+04	7.39E-04	2.01E-8
AB014	VEGF		3.06E+05	3.99E-06	1.30E-11
DVD048	RON				
DVD048		VEGF	3.85E+04	4.50E-05	1.17E-9
DVD047	VEGF		3.46E+05	2.79E-05	8.06E-11
DVD047		RON			
AB015	DLL-4		4.00E+05	1.66E-04	4.14E-10
AB014	VEGF		1.47E+05	3.03E-05	2.07E-10
DVD044	DLL4		5.90E+05	2.05E-04	3.47E-10
DVD044		VEGF	3.67E+04	1.13E-05	3.08E-10
DVD043	VEGF		4.94E+05	8.26E-06	1.67E-11
DVD043		DLL4	9.37E+04	2.17E-04	2.32E-09
AB015	DLL-4				
AB047	PIGF		3.80E+06	1.08E-04	2.84E-11
DVD257	DLL4		8.35E+05	1.96E-04	2.34E-10
DVD257		PIGF	3.02E+05	1.11E-04	3.67E-10
DVD258	PIGF		>1.00E+07	2.54E-03	<2.54E-10
DVD258		DLL4			
AB014	VEGF		1.47E+05	3.03E-05	2.07E-10
AB033	EGFR		8.85E+05	1.23E-03	1.39E-09
DVD035	VEGF		2.25E+05	1.73E-05	8.23E-11
DVD035		EGFR			
DVD036	EGFR		1.21E+06	1.57E-03	1.30E-09
DVD036		VEGF	4.80E+04	3.19E-04	6.65E-09
AB014	VEGF		3.07E+05	3.39E-05	1.06E-11
AB004	HER-2		3.02E+05	1.03E-05	3.40E-11
DVD037	VEGF		4.45E+05	<1.00E-06	<2.25E-12
DVD037		HER-2	7.61E+03	2.83E-06	3.72E-10
DVD038	HER-2		1.95E+05	4.81E-06	2.47E-11
DVD038		VEGF	3.67E+04	<1.00E-06	<2.27E-11
AB014	VEGF		1.47E+05	3.03E-05	2.07E-10
AB012	HGF		>1.00E+7	2.84E-04	<2.84E-11

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	k_{on} (M-1s-1)	k_{off} (s-1)	K_D (M)
DVD045	VEGF		2.01E+05	3.05E-06	1.52E-11
DVD045		HGF	1.84E+05	1.66E-04	9.01E-10
DVD046	HGF		>1.00E+7	2.36E-04	<2.36E-11
DVD046		VEGF			
AB014	VEGF		3.06E+05	3.99E-06	1.30E-11
AB016	NRP1		1.47E+05	3.90E-04	2.67E-9
DVD049	VEGF				
DVD049		NRP1	1.42E+05	1.81E-04	1.28E-9
DVD050	NRP1		1.82E+05	2.61E-04	1.440E-9
DVD050		VEGF	1.82E+05	2.61E-04	1.440E-9
AB014	VEGF		3.07E+05	3.39E-05	1.06E-10
AB047	PlGF		3.80E+06	1.08E-04	2.85E-11
DVD259	VEGF		5.02E+05	2.06E-05	4.12E-11
DVD259		PlGF	2.99E+05	9.87E-05	3.30E-10
DVD260	PlGF		4.27E+06	5.14E-05	1.20E-11
DVD260		VEGF	4.99E+04	2.05E-05	4.11E-10
AB033	EGFR		8.85E+05	1.23E-03	1.39E-09
AB012	HGF		>1.00E+7	2.84E-04	<2.84E-11
DVD025	EGFR		7.31E+05	1.44E-03	1.98E-09
DVD025		HGF	3.05E+05	2.28E-04	7.46E-10
DVD026	HGF		4.19E+06	6.67E-05	1.59E-11
DVD026		EGFR			
AB062	ErbB3		8.66E+04	1.17E-04	1.360E-9
AB033	EGFR		7.93E+04	1.39E-03	1.75E-8
DVD299	ErbB3		1.95E+05	1.60E-04	8.20E-10
DVD299		EGFR	3.26E+04	4.48E-04	1.37E-8
DVD300	EGFR		1.52E+06	1.69E-03	1.11E-9
DVD300		ErbB3			
AB063	ErbB3		1.17E+06	1.75E-04	1.50 E-10
AB033	EGFR		7.93E+04	1.39E-03	1.75 E-8
DVD305	ErbB3		2.27E+06	1.37E-04	6.03E-11
DVD305		EGFR	3.99E+04	3.17E-04	7.940 E-9
DVD306	EGFR		1.82E+06	1.86E-03	1.020 E-9
DVD306		ErbB3			

La unión de todos los constructos DVD-Ig caracterizados mediante la tecnología Biacore se mantuvo y fue comparable con la de los anticuerpos

base. Todos los dominios variables N-terminales se unieron con una afinidad alta similar a la del anticuerpo base así como también los dominios variables C-terminales de los constructos DVD-Ig DVD022, DVD016, DVD042, DVD 044, DVD043, DVD038, DVD049, DVD260, DVD299, y DVD305.

Ejemplo 1.1.2: Ensayos Empleados para Determinar la Actividad Funcional de Anticuerpos Base y DVD-Ig

Ejemplo 1.1.2.A: Bioensayo de Citoquina

Se analizó la capacidad de una anti-citoquina o de un anticuerpo base anti-factor de crecimiento o DVD-Ig, que contiene secuencias de anti-citoquina o de anti-factor de crecimiento para inhibir o neutralizar una citoquina objetivo o la bioactividad del factor de crecimiento, mediante la determinación del potencial inhibidor del anticuerpo o DVD-Ig. Por ejemplo, se puede utilizar la capacidad de un anticuerpo anti-IL-4 para inhibir la producción de IgE mediada por IL-4. Por ejemplo, se aíslan células B naive humanas de la sangre periférica, respectivamente, capas leucoplaquetarias mediante centrifugación por densidad Ficoll-paque, seguido por separación magnética con perlas MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) específicas para anticuerpos de cabra F(ab)2 marcados con sIgD FITC humano seguido por perlas MACS anti-FITC. Se ajustan las células B naive clasificadas magnéticamente a 3 x 10^5 células por ml en XV15 y se sembraron en 100 µl por pozo de placas de 96 pozos en un arreglo de 6 x 6 en el centro de la placa, rodeado de pozos llenos de PBS durante los 10 días del cultivo a 37 °C en presencia de CO_2 al 5%. Se prepara una placa por cada anticuerpo a ser evaluado, que consiste de 3 pozos cada uno de controles no inducidos e inducidos y repeticiones quintuplicadas de titulaciones de anticuerpo comenzando en 7 µg/ml y corriendo en diluciones de 3 veces hasta concentraciones finales de 29 ng/ml adicionado en 50µl de pre-dilución concentrada cuatro veces. Para inducir la producción de IgE, se adicionaron rhIL-4 a 20 ng/ml más anticuerpo monoclonal anti-CD40 (Novartis, Basel, Switzerly) a concentraciones finales de 0.5 µg/ml en 50 µl a cada pozo, y se determinaron las concentraciones de IgE al final del periodo de cultivo mediante el método de ELISA de emparedado estándar.

Ejemplo 1.1.2.B: Ensayo de Liberación de Citoquina

Se analizó la capacidad de un anticuerpo base o DVD-Ig para causar la liberación de citoquina. Se extrajo sangre periférica de tres donantes sanos mediante venipuntura en tubos vacutainer heparinizados. La sangre entera es diluida 1:5 con medio RPMI-1640 y se colocó en placas de cultivo de tejido de 24 pozos a 0.5 mL por pozo. Los anticuerpos anti-citoquina (por ejemplo, anti-IL-4) se diluyeron en RPMI-1640 y se colocaron en las placas a 0.5 mL/pozo para dar concentraciones finales de 200, 100, 50, 10, y 1 µg/mL. La dilución final de la sangre entera en las placas de cultivo es 1:10. Se adicionaron LPS y PHA a pozos separados a una concentración final de 2 µg/mL y 5 µg/mL como un control positivo para la liberación de citoquina. Se utilizó IgG humano policlonal como anticuerpo de control negativo. El experimento se desarrolló por duplicado. Las placas se incubaron a 37 °C en CO_2 al 5%. Veinticuatro horas después los contenidos de los pozos se transfirieron a tubos de ensayo y se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm. Los sobrenadantes libres de células se recogen y congelan para los ensayos de citoquina. Las células dejadas en las placas y en los tubos se lisaron con 0.5 mL de solución de lisis, y se colocaron a -20 °C y se descongelaron. Se adicionan 0.5 mL de medio (para llevar el volumen al mismo nivel de las muestras de sobrenadante libre de células) y se recogen las preparaciones de células y se congelan para los ensayos de citoquina. Se ensayaron los sobrenadantes libres de células y los lisados celulares para niveles de citoquina mediante ELISA, por ejemplo, para niveles de IL-8, IL-6, IL-1β IL-1RA, o TNF-α.

Ejemplo 1.1.2.C: <u>Estudio de Reactividad Cruzada de Citoquina</u>

Se analizó la capacidad de un anticuerpo base anti-citoquina o DVD-Ig directo a citoquina(s) de interés para reacción cruzada con otras citoquinas. Se inmovilizaron anticuerpos base o DVD-Ig en una matriz de biosensor Biacore. Se unió un mAb Fc anti-humano covalentemente a través de grupos amino libres a la matriz de dextrano mediante la activación inicial de los grupos carboxilo sobre la matriz con N-hidroxisuccinimida (NHS) 100mM y clorhidrato de N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) 400mM. Se inyectaron aproximadamente 50µL de cada preparación de anticuerpo o DVD-Ig a una concentración de 25µg/mL, diluidos en acetato de sodio, pH 4.5, a través del biosensor activado y las aminas libres en la proteína se enlazaron directamente a los grupos carboxilo activados. Típicamente, se inmovilizaron 5000 Unidades de Resonancia (RU). Se desactivaron los EDC-ésteres de matriz que no

reaccionaron mediante una inyección de etanolamina 1 M. Se preparó un segundo flujo celular como un estándar de referencia mediante la inmovilización de IgGI/K humano empleando el equipo estándar de acoplamiento de amina. Se llevaron a cabo las medidas de SPR utilizando el chip biosensor CM. Todos los antígenos a ser analizados sobre la superficie del biosensor se diluyeron en amortiguador de corrida HBS-EP que contiene 0.01% de P20.

Para examinar la especificidad de unión a citoquina, se inyectó exceso de citoquina de interés (100nM, por ejemplo, humana recombinante soluble) a través de la superficie del biosensor de anticuerpo base anti-citoquina o DVD-Ig inmovilizado (tiempo de contacto 5 minutos). Antes de la inyección de la citoquina de interés e inmediatamente después, fluye solo amortiguador de HBS-EP a través de cada celda de flujo. Se toma la diferencia neta en las señales entre la línea base y el punto correspondiente a aproximadamente 30 segundos después de completar la inyección de la citoquina para representar el valor de unión final. Nuevamente, la respuesta se midió en Unidades de Resonancia. Las matrices del biosensor se regeneraron utilizando HCl 10mM antes de la inyección de la siguiente muestra cuando se observa un evento de unión, de otra forma se inyectó amortiguador de corrida sobre las matrices. Las citoquinas humanas (por ejemplo, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-22, IL-23, IL-27, TNF-α, TNF-β, e IFN-γ, por ejemplo) también se inyectaron simultáneamente sobre la superficie de ratón IgG1/K de referencia inmovilizado para registrar cualquier experiencia de enlace no específico. Mediante la preparación de una superficie de referencia y de reacción, Biacore puede sustraer automáticamente los datos de la superficie de referencia de los datos de la superficie de reacción con el fin de eliminar la mayor parte del cambio de índice de refracción y el ruido de la inyección. Por lo tanto, es posible comprobar la verdadera respuesta de enlace atribuida a una reacción de enlace de anticuerpo anti-citoquina o DVD-Ig.

Cuando se inyectó una citoquina de interés a través de un anticuerpo anti-citoquina inmovilizado, se observó unión significativa. HCl 10mM de regeneración remueve completamente todas las proteínas no covalentemente asociadas. El examen del sensorgrama muestra que la unión del anticuerpo anti-citoquina o DVD-Ig inmovilizado a la citoquina soluble es fuerte y robusta.

Después de la confirmación del resultado esperado con la citoquina de interés, se evaluó el panel de las citoquinas humanas recombinantes restantes, para cada anticuerpo o DVD-Ig separadamente. Se registró la cantidad de anticuerpo anti-citoquina o DVD-Ig unida o citoquina no enlazada durante cada ciclo de inyección. Los resultados de tres experimentos independientes se utilizaron para determinar el perfil de especificidad de cada anticuerpo o DVD-Ig. Se seleccionaron los anticuerpos o DVD-Ig con la unión esperada a la citoquina de interés y sin unión a cualquier otra citoquina.

Ejemplo 1.1.2.D: <u>Reactividad Cruzada en Tejido</u>

Se realizaron estudios de reactividad cruzada en tejido en tres etapas, con la primera etapa incluyendo criosecciones de 32 tejidos, la segunda etapa incluyendo hasta 38 tejidos, y la 3ª etapa incluyendo tejidos adicionales de 3 adultos no relacionados tal como se describe a continuación. Los estudios se hicieron típicamente a dos niveles de dosis.

Eatapa 1: Criosecciones (aproximadamente 5 μm) de tejidos humanos (32 tejidos (típicamente: Glándula Suprarrenal, Tracto Gastrointestinal, Próstata, Vejiga, Corazón, Músculo Esquelético, Células Sanguíneas, Riñón, Piel, Médula, Hígado, Médula Espinal, Seno, Pulmón, Bazo, Cerebelo, Nodo Linfático, Testículos, Corteza Cerebral, Ovario, Timo, Colon, Páncreas, Tiroides, Endotelio, Paratiroides, Uréter, Ojo, Pituitaria, Útero, Trompa de Falopio y Placenta) a partir de un donante humano obtenidos en una autopsia o biopsia) se fijaron y secaron sobre portaobjetos. Se llevó a cabo la tinción con peroxidasa de las secciones de tejido, utilizando el sistema avidina-biotina.

Etapa 2: Criosecciones (aproximadamente 5 μm) de tejidos humanos 38 tejidos (incluyendo suprarrenal, sangre, vaso sanguíneo, médula, cerebelo, cerebro, cuello uterino, esófago, ojo, corazón, riñón, intestino delgado, hígado, pulmón, nodo linfático, glándula mamaria de seno, ovario, oviducto, páncreas, paratiroides, nervio periférico, pituitaria, placenta, próstata, glándula salival, piel, intestino grueso, médula espinal, bazo, estómago, músculo estriado, testículo, timo, tiroides, amígdala, uréter, vejiga urinaria, y útero) a partir de 3 adultos no relacionados obtenidos en una autopsia o biopsia) se fijaron y secaron sobre portaobjetos. Se llevó a cabo la tinción con peroxidasa de las secciones de tejido, utilizando el sistema avidina-biotina.

Estadio 3: Crioseccciones (aproximadamente 5 μm) de tejidos de mono cynomolgus (38 tejidos (incluyendo suprerrenal, sangre, vaso sanguíneo, médula, cerebelo, cerebro, cuello uterino, esófago, ojo, corazón, riñón, intestino delgado, hígado, pulmón, nodo linfático, glándula mamaria de seno, ovario, oviducto, páncreas, paratiroides, nervio periférico, pituitaria, placenta, próstata, glándula salival, piel, intestino grueso, médula espinal, bazo, estómago, músculo estriado, testículo, timo, tiroides, amígdala, uréter, vejiga urinaria, y útero) a partir de 3 monos adultos no relacionados obtenidos en una autopsia o biopsia) se fijaron y secaron sobre portaobjetos. Se llevó a cabo la tinción con peroxidasa de las secciones de tejido, utilizando el sistema avidina-biotina.

El anticuerpo o DVD-Ig se incubó con el IgG anti-humano secundario biotinilado y se desarrolló dentro de un complejo inmune. Se adicionó el complejo inmune a las concentraciones finales de 2 y 10 μg/mL de anticuerpo o DVD-Ig sobre las secciones de tejido sobre el portaobjetos y posteriormente las secciones de tejido reaccionaron durante 30 minutos con un equipo de avidina-biotina-peroxidasa. Subsecuentemente, se aplicó DAB (3,3'-diaminobenzidina), un sustrato para la reacción de la peroxidasa, durante 4 minutos para la tinción del tejido. Se utilizaron perlas de antígeno-sefarosa como control positivo de las secciones de tejido. Los estudios de antígeno objetivo y bloqueo de suero humano sirvieron como controles adicionales. Se pre-incubó el complejo inmune a las concentraciones finales de 2 y 10 μg/mL de anticuerpo o DVD-Ig con antígeno objetivo (concentración final de 100 μg/ml) o suero humano (concentración final 10%) durante 30 minutos, y posteriormente se adicionó sobre las secciones de tejido sobre el portaobjetos y posteriormente las secciones de tejido reaccionaron durante 30 minutos con un equipo de avidina-biotina-peroxidasa. Subsecuentemente, se aplicó DAB (3,3'-diaminobenzidina), un sustrato para la reacción de la peroxidasa, durante 4 minutos para la tinción del tejido.

Se juzgó que cualquier tinción específica es bien sea una reactividad esperada (por ejemplo, consistente con la expresión del antígeno) o inesperada con base en la expresión conocida del antígeno objetivo en cuestión. Se anotó la intensidad y frecuencia de cualquier tinción juzgada como específica. La tinción de tejido entre la etapa 2 (tejido humano) y la etapa 3 (tejido de mono cynomolgus) se juzgó bien sea como similar o diferente.

Ejemplo 1.1.2.E: Inhibición de la Proliferación/Supervivencia HUVEC por Anticuerpo Base VEGF y Constructos DVD-Ig

Antes del plaqueamiento para el ensayo, se mantuvieron células endoteliales vasculares umbilicales humanas normales o HUVEC (paso 2-6) en EBM-2 (Lonza-Clonetics, Walkersville, MD) complementado con EGM -2 SingleQuots (Lonza-Clonetics, Walkersville, MD, #CC-4176). Las células de HUVEC fueron plaqueadas a 10,000 células/pozo en placas de 96 pozos negras recubiertas con colágeno en (100µl) de EMB-2 con 0.1% de FBS en la ausencia de factores de crecimiento. Al día siguiente se reemplazó el medio con FBS al 0.1% en la ausencia de factores de crecimiento. Al día siguiente se reemplazó el medio con 100µl de EMB-2 (sin factores de crecimiento o sueron) y se incubaron durante cuatro horas antes de la adición de VEGF y anticuerpos/DVD-Igs. Se diluyeron anticuerpos monoclonales anti-VEGF o DVD-Igs (en concentraciones finales de 67 nM, 6.7 nM y 0.67 nM) en EMB-2 con BSA al 0.1% y se pre-incubaron con $VEGF_{165}$ recombinante humano (50ng/ml) durante 1 hora a 25°C en 50µl. Posteriormente se adicionaron mezclas de anticuerpo/DVD-Ig y VEGF a las células (50µl), y las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera humedecida, 5% de CO_2 durante 72 horas. Se midió la supervivencia/proliferación celular indirectamente mediante la determinación de los niveles de ATP utilizando un equipo ATPlite (Perkin Elmer, Waltham, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La Tabla 10 proporciona los datos que muestran la inhibición de la proliferación/supervivencia de HUVEC.

Tabla 10: Inhibición de Proliferación/Supervivencia de HUVEC por Anticuerpo Base VEGF Y Constructos DVD-Ig

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Inhibición en VD N-terminal de proliferación HUVEC (% de inhibición a 67, 6.7 y 0.67nM de Ab/DVD-Ig)	Inhibición en VD C-terminal de proliferación HUVEC (% de inhibición a 67, 6.7 y 0.67nM de Ab/DVD-Ig)
AB014	VEGF		67nM=98%, 6.7nM=91%, 0.67nM=12%	
DVD038	HER-2	VEGF		67nM=45%, 6.7nM=-18%,

				0.67nM=-22%
AB014	VEGF		67nM=98%, 6.7nM=91%, 0.67nM=12%	
DVD044	DLL4	VEGF		67nM=99%, 6.7nM=19%, 0.67nM=6%
DVD043	VEGF	DLL4	67nM=89%, 6.7nM=51%, 0.67nM=-22%	
AB014	VEGF		67nM=97%, 6.7nM=91%, 0.67nM=62%	
DVD048	RON	VEGF		67nM=91%, 6.7nM=88%, 0.67nM=62%
DVD047	VEGF	RON	67nM=65%, 6.7nM=31%, 0.67nM=-5%	
AB014	VEGF		67nM=97%, 6.7nM=91%, 0.67nM=62%	
DVD049	VEGF	NRP1	67nM=108%, 6.7nM=86%, 0.67nM=43%	
DVD050	NRP1	VEGF		67nM=103%, 6.7nM=74%, 0.67nM=15%
AB014	VEGF		67nM=98%, 6.7nM=91%, 0.67nM=12%	
DVD260	PlGF	VEGF		67nM=51%, 6.7nM=7%, 0.67nM=-16%

Todas los DVD-Igs que contienen VDs a partir de AB014 inhibieron la proliferación celular de HUVEC causada por VEGF. Los DVD044, DVD048, DVD040 DVD050 inhibieron la proliferación celular de HUVEC en > 90% a concentración de DVD-Igs de 67nM.

Ejemplo 1.1.2.F: Efecto Inhibidor del Crecimiento de Célula de Tumor de Anticuerpos Monoclonales IGF1,2 o DVD-Igs In Vitro.

Se adicionaron anticuerpos monoclonales IGF 1,2 o DVD-Igs diluidos en D-PBS-BSA (solución salina amortiguada de fosfato de Dulbecco con 0.1%BSA) 20μL a células de tumor humano en concentraciones finales de 0.01 μg/mL-100 μg/mL en 200μL. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera humedecida, 5% de CO_2 durante tres días. Se cuantificó el número de células

vivas en cada pozo utilizando reactivos de MTS de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI) para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento del tumor. Se utilizaron pozos sin tratamiento de anticuerpo como controles de 0% de inhibición mientras que se consideró que los pozos sin células muestran un 100% de inhibición.

Tabla 11: Ensayo de Inhibición de Proliferación de Línea H929, IGFR Con Anticuerpos Base y Constructos DVD-Ig de IGF1R e IGF1,2

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	IC50 nM del Ensayo Celular de Inhibición de Proliferación en VD N-terminal (línea H929, IGF1R)	IC50 nM del Ensayo Celular de Inhibición de Proliferación en VD C-terminal (línea H929, IGF1R)
AB033	EGFR		>67 (5% max)	
AB004	HER-2		>67 (10% max)	
DVD015	EGFR	HER-2	> 50 (20% max)	
DVD016	HER-2	EGFR		> 50 (15% max)
AB033	EGFR		> 67 (5% max)	
AB011	IGF1R		0.1 (65% max)	
DVD021	EGFR	IGF1R		> 50 (10% max)
DVD022	IGF1R	EGFR	0.05 (70% max)	
AB004	HER-2		> 67 (10% max)	
AB010	IGF1,2		1.6 (70% max)	
DVD029	HER-2	IGF1,2		6.8 (40% max)
DVD030	IGF1,2	HER-2	0.8 (70% max)	
AB004	HER-2		> 67 (10%)	
AB011	IGF1R		0.1 (65% max)	
DVD031	HER-2	IGF1R		> 50 (10% max)
DVD032	IGF1R	HER-2	0.1 (60% max)	

Todas las DVD-Igs que contienen VDs a partir de AB033, AB004, AB011, o AB010 bien sea en la posición N- terminal o C-terminal mostraron inhibición en el ensayo de proliferación celular A431.

Ejemplo 1.1.2.G: Efecto Inhibidor de Crecimiento de un Anticuerpo Monoclonal de EGFR o DVD-Igs In Vitro

Se adicionaron anticuerpos monoclonales de EGFR o DVD-Igs diluidos en D-PBS-BSA (solución salina amortiguada de fosfato de Dulbecco con 0.1%BSA) 20μL a células de tumor humano en concentraciones finales de 0.01 μg/mL-100 μg/mL en 180μL. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera humedecida, 5% de CO_2 durante tres días. Se cuantificó el número de células vivas en cada pozo utilizando reactivos de MTS de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI) para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento del tumor. Se utilizaron pozos sin tratamiento de anticuerpo como controles de 0% de inhibición mientras que se consideró que los pozos sin células muestran un 100% de inhibición.

Tabla 12: Ensayo de Inhibición de Proliferación de Línea Celular EGFR A431, Con Anticuerpos Base y Constructos DVD-Ig de EGFR

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	**Dominio Variable N-terminal (VD)**	**Dominio Variable C-terminal (VD)**	**IC50 nM del Ensayo Celular de Inhibición de Proliferación en VD N-terminal (línea A431, EGFR)**	**IC50 nM del Ensayo Celular de Inhibición de Proliferación en VD C-terminal (línea A431 EGFR)**
AB033	EGFR		1.0 (65% max)	
AB004	HER-2		> 67 (10% max)	
DVD015	EGFR	HER-2	1.7 (65% max)	
DVD016	HER-2	EGFR		5.4 (80% max)
AB033	EGFR		1.0 (65% max)	
AB011	IGF1R		> 67 (5% max)	
DVD021	EGFR	IGF1R	1.5 (50% max)	
DVD022	IGF1R	EGFR		3.4 (65% max)
AB004	HER-2		> 67 (10% max)	
AB010	IGF1,2		> 67 (10% max)	
DVD029	HER-2	IGF1,2	> 50 (10% max)	
DVD030	IGF1,2	HER-2	> 50 (10% max)	
AB004	HER-2		> 67 (10% max)	
AB011	IGF1R		> 67 (5% max)	
DVD031	HER-2	IGF1R	> 50 (10% max)	
DVD032	IGF1R	HER-2	> 50 (10% max)	
AB014	VEGF		> 67 (0%)	
AB010	IGF1,2		>67 (10% max)	
DVD041	VEGF	IGF1,2	> 50 (0%)	

Todas las DVD-Igs que contienen VDs a partir de AB033, AB004, AB011, AB010, AB014 bien sea en la posición N- terminal o C-terminal mostraron inhibición de ensayo de proliferación celular A431.

Tabla 13: Ensayo de Inhibición de Proliferación de Línea Celular EGFR/IGF1R GEO, Con Anticuerpos base y Constructos DVD-Ig de EGFR, IGF1R e IGF1,2

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	IC50 nM del Ensayo Celular de Inhibición de Proliferación N-terminal (línea GEO, EGFR/ IGF1R)	IC50 nM del Ensayo Celular de Inhibición de Proliferación C-terminal (línea GEO, EGFR/ IGF1R)
AB033	EGFR		0.2 (60% max)	
AB004	HER-2		> 67 (15% max)	
DVD015	EGFR	HER-2	13 (60% max)	
DVD016	HER-2	EGFR		10 (40% max)
AB033	EGFR		0.2 (60% max)	
AB011	IGF1R		> 67 (15% max)	
DVD021	EGFR	IGF1R	0.32 (60% max)	0.32 (60% max)
DVD022	IGF1R	EGFR	3.0 (40% max)	3.0 (40% max)
AB004	HER-2		> 67 (15% max)	
AB010	IGF1,2		20% a 67 nM	
DVD029	HER-2	IGF1,2	> 50 (10% max)	> 50 (10% max)
DVD030	IGF1,2	HER-2	> 50 (10% max)	> 50 (10% max)
AB004	HER-2		> 67 (15% max)	
AB011	IGF1R		> 67 (15% max)	
DVD031	HER-2	IGF1R	> 50 (10% max)	> 50 (10% max)
DVD032	IGF1R	HER-2	> 50 (10% max)	> 50 (10% max)

Todas las DVD-Igs que contienen VDs a partir de AB033, AB004, AB011, AB010, AB014 bien sea en la posición N-terminal o C-terminal mostraron inhibición de ensayo de proliferación celular GEO.

Ejemplo 1.1.2.H Efecto Inhibidor del Crecimiento de Tumor Celular de Anticuerpos Base HER2 o Constructos de DVD-Igs *In Vitro*

Se adicionaron anticuerpos monoclonales de HER2 o DVD-Igs diluidos en D-PBS-BSA (solución salina amortiguada de fosfato de Dulbecco con 0.1%BSA) 20μL a células de tumor humano que expresan HER2 (BT474) en concentraciones finales de 0.01 μg/mL-100 μg/mL (180μL). Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera humedecida, 5% de CO_2 durante tres días. Se cuantificó el número de células vivas en cada pozo utilizando reactivos de MTS de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI) para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento del tumor. Se utilizaron pozos sin tratamiento de anticuerpo como controles de 0% de inhibición mientras que se consideró que los pozos sin células muestran un 100% de inhibición.

Tabla 14: Ensayo de Inhibición de Proliferación de Línea Celular Erb2(Her-2) BT474, Con Anticuerpos base Anti-Her-2 Y Constructos DVD-Ig

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	IC50 nM del Ensayo Celular de Inhibición de Proliferación en VD N-terminal (línea BT474, ErbB2)	IC50 nM del Ensayo Celular de Inhibición de Proliferación en VD C-terminal (línea BT474, ErbB2)
AB004	HER-2		0.9	
DVD015	EGFR	HER-2		> 50
DVD016	HER-2	EGFR	1.7	
AB004	HER-2		0.9	
DVD029	HER-2	IGF1,2	2.7	
DVD030	IGF1,2	HER-2		> 50
AB004	HER-2		0.9	
DVD031	HER-2	IGF1R	2.2	
DVD032	IGF1R	HER-2		> 50

Todas las DVD-Igs que contienen VDs a partir de AB004 bien sea en la posición N-terminal o C-terminal mostraron inhibición en el ensayo de proliferación celular BT474.

Ejemplo 1.1.2.1: Inhibición del Incremento de Svegfr1 (Sflt1) Dependiente de DLL4 Recombinante en Células Eahy.926 mediante Anticuerpo Base DLL4 Y Constructos DVD-Ig

Se recubrieron placas de cultivo de tejido de 96 pozos con 100 µl/pozo de dominio extracelular DLL4 humano a 5 µg/ml en D-PBS (Gibco #14190, Grand Island, NY) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron una vez con D-PBS y se sembraron 4000 células EA.hy926/pozo en la ausencia o presencia de anticuerpos o DVD-Igs. Se midió la proliferación celular cuatro días después utilizando el Equipo de Ensayo de Proliferación Celular CyQUANT (Invitrogen, #C35007, Eugene, OR). Se detectó la expresión de sVEGFRI en el medio condicionado por medio de un equipo de ELISA mediante las recomendaciones del fabricante (R&D Systems #DVR100B, Minneapolis, MN). Se normalizaron los niveles de sVEGFR1 hasta el RFU determinado por ensayo CyQUANT para explicar las diferencias en la proliferación celular.

Tabla 15: Inhibición del Incremento de Svegfr1 (Sflt1) Dependiente de DLL4 en Células Eahy.926 por Anticuerpos Base DLL4 O Constructos DVD-Ig

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Ensayo Flt1 Soluble en VD N-terminal (% de Neutralización @ Ab nM)	Ensayo Flt1 Soluble en VD C-terminal (% de Neutralización @ Ab nM)
AB015	DLL-4		75.2% @9.2 nM, 78.7% @27.7 nM, 86.6% @83.3 nM	
DVD044	DLL4	VEGF	39.8% @9.2 nM, 76.2% @27.7 nM, 79.9% @83.3 nM	
DVD043	VEGF	DLL4		1.1% @9.2 nM, 50.3% @27.7 nM, 57.9% @83.3 nM

Las DVD-Igs que contienen VD a partir de AB015 en bien sea la posición N-terminal o C-terminal mostraron inhibición dependiente de la dosis de la liberación de sFLT inducida por DLL4 a partir de las células Eahy.926.

Ejemplo 1.1.2.J: Efecto Tumoricida de un Anticuerpo Base o DVD-Ig In Vitro

Los anticuerpos base o DVD-Ig que se enlazan a los antígenos objetivo sobre tumores celulares pueden ser analizados para actividad tumoricida. Brevemente, se diluyeron los anticuerpos base o DVD-Ig en D-PBS-BSA (solución salina amortiguada de fosfato de Dulbecco con 0.1%BSA) y se adicionaron a células de tumor humano en concentraciones finales de 0.01 μg/mL hasta 100 μg/mL 200μL. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera humedecida, 5% de CO_2 durante tres días. Se cuantificó el número de células vivas en cada pozo utilizando reactivos de MTS de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI) para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento del tumor. Se utilizaron pozos sin tratamiento de anticuerpo como controles de 0% de inhibición mientras que se consideró que los pozos sin células muestran un 100% de inhibición.

Para la evaluación de la apóptosis, se determinó la activación de la caspasa-3 mediante el siguiente protocolo: se lisaron células tratadas con anticuerpo en placas de 96 pozos en 120 μl de amortiguador de lisis 1x (Hepes 1.67mM, pH 7.4, KCl 7mM, $MgCl_2$ 0.83 mM, EDTA 0.11mM, EGTA 0.11mM, CHAPS 0.57%, DTT 1mM, tableta de cóctel de inhibidor de proteasa 1x; EDTA-libre; Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ) a temperatura ambiente con agitación durante 20 minutos. Después de la lisis celular, se adicionaron 80 μl de un amortiguador de reacción de caspasa-3 (Hepes 48mM, pH 7.5, sucarosa 252mM, CHAPS 0.1%, DTT 4mM, y sustrato Ac-DEVD- AMC 20 μM; Biomol Research Labs, Inc., Plymouth Meeting, PA) y las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C. Las placas se leyeron sobre un 1420 VICTOR Multilabel Counter (Perkin Elmer Life Sciences, Downers Grove, IL) utilizando los siguientes ajustes: excitación= 360/40, emisión= 460/40. Un incremento de las unidades de fluorescencia a partir de células tratadas con anticuerpo con respecto a las células tratadas con isotipo de anticuerpo de control es indicador de apoptosis.

Ejemplo 1.1.2.K: Inhibición de Proliferación de Tumor Celular de U87-MG mediante Anticuerpo Base HGF y Constructos DVD-Ig

Se colocaron en placa células de tumor de glioma humano U87-MG a 2,000 células/pozo en 100 µl en discos de 96 en medio de RPMI complementado con suero bovino fetal al 5%, y se incubaron a 37°C, 5% CO_2 durante la noche. Al siguiente día las células se trataron con diluciones seriales de anticuerpo o DVD-Igs (rango de dosis 0.013 nM hasta 133 nM), y se incubaron a 37°C en una atmósfera humedecida, 5% de CO_2 durante 5 días. Se midió la supervivencia/proliferación celular indirectamente mediante la determinación de los niveles de ATP utilizando un equipo ATPlite (Perkin Elmer, Waltham, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla 16: Inhibition de la Proliferación de Tumor U87-MG mediante Anticuerpo Base anti-HGF y Constructos DVD-Ig

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Inhibición de proliferación de U87MG en VD N-terminal (EC50)	Inhibición de proliferación de U87MG en VD C-terminal (EC50)
AB012	HGF		12	
DVD025	EGFR	HGF		>200
AB012	HGF		12	
DVD033	RON	HGF		>200
DVD034	HGF	RON	136	
AB012	HGF		12	
DVD045	VEGF	HGF		>200
AB008	CD22		>200	

Las DVD-Igs que contienen un VD a partir de AB012 en la posición C-terminal o N-terminal inhibieron la proliferación del tumor celular U87-MG.

Ejemplo 1.1.2.L: Inhibición de de la Interacción de RON con MSP1 mediante Anticuerpo Base RON y Constructos DVD-Ig In Vitro

Se recubrieron placas de 96 pozos con 50µl/pozo de un anticuerpo de cadena anti-MSPα (R&D Systems #MAB352, Minneapolis, MN, 2µg/mL), y las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces en amortiguador de lavado (PBS que contiene 0.05% de Tween 20), y se

bloquearon posteriormente con 100ul/pozo de amortiguador de bloqueo (PBS que contiene BSA al 2%) durante una hora a 25°C. Posteriormente las placas se lavaron tres veces, y se incubaron con 50µl/pozo de una solución 10nM de MSP1 humano recombinante (R&D Systems #352-MS, Minneapolis, MN) durante una hora a 25°C. Durante la incubación de la placa, se pre-incubaron diluciones seriales de 10 veces de los anticuerpos a ser evaluados (rango de dosis 0nM hasta 1000nM) con His-RON ECD parcial recombinante 10nM (R&D Systems #1947-MS, Minneapolis, MN) a 25°C durante una hora. Las placas incubadas con MSP1 humano recombinante se lavaron tres veces, y posteriormente se añadieron 50µl/pozo de los complejos de anticuerpo/His-RON en triplicado. Después de una hora de incubación a 25°C, las placas se lavaron, y se adicionaron 50µl/pozo de un sustrato de TMB (Pierce #34028, Rockford, IL) y se incubaron durante cinco minutos a 25°C. La reacción se terminó después de cinco minutos utilizando 50µl/pozo de H_2SO_4 2N. Se leyó la absorbancia a 450 nm (lector de placa Spectra Max Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se calcularon los EC50s en GraphPad Prism 4.03. Los resultados se proporcionan en la Tabla 17 a continuación.

Ejemplo 1.1.2.M: El Anticuerpo Base VEGF y los Constructos DVD-Ig Previenen la Interacción de $VEGF_{165}$ con VEGFR1

Se incubaron placas de ELISA (Nunc, MaxiSorp, Rochester, NY) durante la noche a 4°C con 100 µl de PBS que contiene proteína de fusión dominio extracelular FC VEGFR1 recombinante (5µg/ml, R&D systems, Minneapolis, MN). Las placas se lavaron tres veces en amortiguador de lavado (PBS que contiene 0.05% de Tween 20), y se bloquearon durante 1 hora a 25°C en amortiguador de bloqueo (PBS que contiene BSA al 1%). Se incubaron diluciones seriales de cada anticuerpo/DVD-Ig en PBS que contiene BSA al 0.1% con 50µl de VEGF biotinilado 2nM durante 1 hora a 25°C. Posteriormente se adicionaron las mezclas de anticuerpo/DVD-Ig-VEGF biotinilatdo (100µl) a los pozos recubiertos de VEGFR1-Fc y se incubaron a 25°C durante 10 minutos. Los pozos se lavaron tres veces, y se incubaron posteriormente durante 1 hora a 25°C con 100µl de estreptavidina-HRP (KPL #474-3000, Gaithersburg, MD). Los pozos se lavaron tres veces, y se adicionaron 100µl de ULTRA-TMB ELISA (Pierce, Rockford, IL) por pozo. Siguiendo el desarrollo del

color, la reacción se detuvo con HCL 1N y se midió la absorbancia a 450 nM. Los resultados se proporcionan en la Tabla 17 a continuación.

Ejemplo 1.1.2.N: Inhibición de la Interacción de DLL4 con Notch-1 mediante Anticuerpo Base DLL4 y Constructos DVD-Ig In Vitro

Se recubrieron placas Nunc-Immuno de 96 pozos (Nunc, #439454, Rochester, NY) con Notch-1 humano 16 nM (R&D Systems #3647-TK, Minneapolis, MN, 100 µl/pozo en D-PBS) y se incubaron durante la noche a 4°C. Posteriormente las placas se lavaron una vez con buffer de lavado (PBS, 0.05% de Tween 20) y se bloquearon con 200 µl/pozo de amortiguador de bloqueo (D-PBS, BSA al 1%, $CaCl_2$ 1 mM, 0.05% de Tween 20) durante 1 hora a 25°C. Mientras se bloquea, se mezclaron 300 µl de dominio extracelular DLL4 humano marcado con biotina (14 nM) con anticuerpo o DVD-Ig (3.4 pM-66 nM, dilución serial 3 veces en amortiguador de bloqueo) durante 1 hora a 25°C. Las placas de ensayo se lavaron después del bloqueo, y se incubaron con mezclas de anticuerpo DLL4 o DVD-Ig (100 µl/pozo, 1 hora a 25°C). Las placas se lavaron nuevamente y se adicionaron 100 µl/pozo de estreptavidina conjugada con HRP (KPL #474-3000, Gaithersburg, MD, diluido 1:10,000 en amortiguador de bloqueo) durante 1 hora a 25°C. Después de un lavado final, se desarrollaron las placas utilizando 100 µl/pozo de sustrato (1-Step Ultra TMB-ELISA, Pierce #340280, Rockford, IL), y la reacción se detuvo después de una incubación de 10-20 minutos a 25°C utilizando 100 µl/pozo de H_2SO_4 2N, y se leyó al absorbancia a 450 nm. Los resultados se proporcionan en la Tabla 17 a continuación.

Ejemplo 1.1.2.O: Inhibición de la Interacción de HGF con c-Met mediante Anticuerpo Base HGF y Constructos DVD-Ig

Se recubrieron placas de ELISA (Nunc, MaxiSorp) con 100 µl/pozo de HGF humano recombinante (2µg/ml de HGF en PBS, R&D systems) durante la noche a 4°C. Se co-incubaron diluciones seriales de cada anticuerpo/DVD-Ig y fusión Fc c-Met soluble 2nM (R&D systems) (50µl), y se adicionaron a pozos recubiertos de HGF. Se detectó el enlace a c-Met con anti-c-Met biotinilado (BAF358, R&D Systems) y 100µl de estreptavidina-HRP (KPL). Se lavaron los pozos tres veces en PBST (PBS que contiene 0.05% de Tween 20), y se

adicionaron 100µl de ULTRA-TMB ELISA (Pierce) por pozo. Siguiendo el desarrollo del color, la reacción se detuvo con HCL 1N y se midió la absorbancia a 450 nM. Los datos se evaluaron calculando el porcentaje de inhibición comparado con la señal máxima (anticuerpo control o sin anticuerpo añadido) y se calcularon los valores de IC_{50}.

La siguiente tabla contiene los datos de afinidad, expresados como IC_{50} en nM, de los anticuerpos base y los constructos de DVD-Ig en los ensayos de ELISA de competencia de enlace ligando-receptor para RON, VEGF, DLL4, y HGF tal como se describió anteriormente.

Tabla 17: Inhibición de la Interacción de Ligando-Receptor Con Anticuerpos base RON, VEGF DLL4, Y HGF Y Constructos DVD-Ig In Vitro

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Ensayo de Competencia de Unión a Ligando-receptor en VD N-terminal (IC50, nM)	Ensayo de Competencia de Unión a Ligando-receptor en VD C-terminal (IC50, nM)
AB005	RON		8.1	
DVD024	RON	EGFR	9.6	
DVD023	EGFR	RON		
AB005	RON		0.32	
DVD033	RON	HGF	**0.0000097	
DVD034	HGF	RON		
AB014	VEGF		21.40	
DVD035	VEGF	EGFR	23.90	
AB014	VEGF		21.40	
DVD038	HER-2	VEGF		73.00
AB015	DLL-4		0.37	
AB014	VEGF		21.4	
DVD044	DLL4	VEGF	0.50	143
DVD043	VEGF	DLL4	24.1	13.10
AB005	RON		0.1	
AB014	VEGF		21.4	
DVD048	RON	VEGF	0.1127	114
DVD047	VEGF	RON	30.5	21.28
AB014	VEGF		21.40	

DVD050	NRP1	VEGF		79.00
AB015	DLL-4		0.4	
DVD257	DLL4	PIGF	0.38	
DVD258	PIGF	DLL4		17.47
AB014	VEGF		21.40	
DVD260	PIGF	VEGF		13.00
AB012	HGF		0.18	
DVD025	EGFR	HGF		>100
AB012	HGF		0.18	
DVD045	VEGF	HGF		>100
AB012	HGF		0.18	
DVD033	RON	HGF		8.7
DVD034	HGF	RON	0.34	

Todas las DVD-Igs que contienen VD a partir de AB005, AB015, AB015, AB012, bien sea en las posiciones N-terminal o C-terminal mostraron inhibición de ligando hacia sus respectivos receptores. El dominio N-terminal de DVD-Ig bloqueó la interacción ligando-receptor así como también el anticuerpo base.

Ejemplo 1.1.2. P: Inhibición de la Fosforilación de IGFR Inducida por IGF mediante Anticuerpos Base o Constructos DVD-Ig In Vitro

Se colocaron en placa células de carcinoma humano en placas de 96 pozos a 40,000 células/pozo en 180µl de medio libre de suero (DMEM+ 0.1% BSA), y se incubaron durante la noche a 37°C, 5% de CO_2. Se recubrieron placas Costar EIA (Lowell, MA) con 100 µl/pozo de Ab de captura de IGFR (R&D Systems ca #MAB391, Minneapolis, MN, 4µg/ml concentración final), y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente con agitación. Al día siguiente, se lavaron las placas de ELISA recubiertas de anticuerpo IGFR (tres veces con PBST = 0.05% de Tween 20 en PBS, pH 7.2 - 7.4), y se adicionaron 200µl de solución de bloqueo (BSA 1%, NaN_3 0.05% en PBS, pH 7.2 - 7.4.) para bloquear durante 2 horas a temperatura ambiente sobre un balancín. Se co-incubaron las células de tumor humano con anticuerpos o DVD-Igs y ligando de IGF. Se adicionaron anticuerpos monoclonales de IGF 1,2 o DVD-Igs diluidos en D-PBS-BSA (solución salina amortiguada de fosfato de Dulbecco con 0.1%BSA) a células de carcinoma humano a concentraciones finales de 0.01 µg/mL-100 µg/mL. Se adicionaron simultáneamente los factores de crecimiento (IGF1 e IGF2) a las células a concentraciones de 1-100ng/mL

(200µL), y se incubaron las células a 37°C en una atmósfera humedecida, 5% de CO_2 durante 1 hora. Las células se lisaron en 120µl/pozo de amortiguador de extracción celular frío (Tris 10 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, Triton 1% X-100, Glicerol 10%, SDS 0.1%, y coctel de inhibidor de proteasa), y se incubaron a 4°C durante 20 minutos con agitación. Se adicionaron los lisados celulares (100µl) a la placa de ELISA, y se incubaron durante la noche a 4°C con agitación suave. Al día siguiente, se lavaron las placas de ELISA, y se adicionaron 100 µl/pozo de Ab de detección de pTyr-HRP (equipo de ELISA p-IGFIR, R&D System # DYC1770, Minneapolis, MN), y se incubaron las placas durante 2 horas a 25°C en la oscuridad. Se desarrollaron las placas para determinar fosfo-IGF1R mediante las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en las Tablas 18 y 19.

Tabla 18: Inhibición de la Fosforilación de IGF1R Mediante Anticuerpos Base de IGF1 Con Anti-IGF1,2 O Constructos DVD-Ig

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Ensayo Celular de pIGF1R en VD N-terminal (IC50 nM de Neutralización de hIGF1)	Ensayo Celular de pIGF1R en VD C-terminal (IC50 nM de Neutralización de hIGF1)
AB010	IGF1,2		1.7	
DVD029	HER-2	IGF1,2		14.22 (40% max)
DVD030	IGF1,2	HER-2	1.9	
AB010	IGF1,2		1.7	
DVD041	VEGF	IGF1,2		16.8 (40% max)
DVD042	IGF1,2	VEGF	1.8	

Las DVD-Igs que contienen VD a partir de AB010 bien sea en la posición N-terminal o la C-terminal mostraron inhibición de la fosforilación del receptor IGF1R inducida por IGF1. La VD de AB010 en la posición N-terminal de DVD-Ig bloqueó la fosforilación del receptor así como también el anticuerpo base AB010.

Tabla 19: Inhibición de la Fosforilación de IGF1R Mediante Anticuerpos Base de IGF2 Con Anti-IGF1,2 O Constructos DVD-Ig

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Ensayo Celular de pIGFR1 en VD N-terminal (IC50 nM inducida por IGF2)	Ensayo Celular de pIGFR1 en VD C-terminal (IC50 nM inducida por IGF2)
AB010	IGF1,2		0.3	
DVD029	HER-2	IGF1,2	ND	1.9
DVD030	IGF1,2	HER-2	0.4	ND
AB010	IGF1,2		0.3	
DVD041	VEGF	IGF1,2	ND	1.5
DVD042	IGF1,2	VEGF	0.3	ND

Las DVD-Igs que contienen VD a partir de AB010 bien sea en la posición N-terminal o la C-terminal mostraron inhibición de la fosforilación del receptor IGF1R inducida por IGF2. La VD de AB010 en la posición N-terminal de DVD-Ig bloqueó la fosforilación del receptor así como también el anticuerpo base AB010.

Ejemplo 1.1.2.Q: <u>Inhibición de la Fosforilación de Akt Mediada por HGF Mediante Anticuerpo base HGF Y Constructos DVD-Ig</u>

Se colocaronen placa células de tumor de pulmón de células gigantes H1299 a 20,000 células/pozo (100µl volumen total) en placas de 96 pozos y se privaron de suero durante 18 horas a 37°C, 5% de CO_2. Se diluyeron anticuerpos monoclonales Anti-HGF o DVD-Igs (concentraciones finales de 67 nM, 6.7 nM, y 0.67 nM) en Medio Esencial Mínimo de Dulbecco que contiene BSA 0.1% y se pre-incubaron con HGF humano recombinante (50ng/ml) en 50µl durante 1 hora a 25°C. Posteriormente estas mezclas de anticuerpo/DVD-Ig y HGF (50µl) se adicionaron a las células, y las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera humedecida, 5% de CO_2 durante aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, las células se fijaron mediante la adición de un volumen igual de formaldehído 7.6% a cada pozo y las placas se incubaron durante 15 minutos a 25°C. Después de la fijación, se lavaron las células cinco veces en PBS que contiene 0.1% de Triton X-100. Las células se trataron posteriormente con 150µl de amortiguador de bloqueo LI-COR Odyssey (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) por pozo, y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación moderada. Se removió el amortiguador de

bloqueo y las células se incubaron a 4°C durante la noche con anticuerpo primario diluido en amortiguador de bloqueo (dilución 1:300 Phospho Ser473-Akt, Cell Signaling Technology #4060, Boston, MA). Los pozos se lavaron posteriormente cinco veces con PBS que contiene 0.1% de Tween 20, y se incubaron posteriormente con anticuerpo secundario (dilución 1:400 de un anti-conejo IRDye™ 680CW LI-COR (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) en 1XPBS con 0.2% de Tween 20) durante 1 hora a 25°C. Las células se lavaron cinco veces con PBS que contiene 0.1% de Tween 20, y se generaron imágenes utilizando un Sistema de Imagen de Infrarrojo Odyssey.

Tabla 20: Inhibición de la Fosforilación de AKT Mediada por HGF Mediante Anticuerpo Base HGF Y Constructos DVD-Ig

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Inhibición de Fosforilación de Akt en VD N-Terminal (% de Inhibición a 67, 6.7 y 0.67nM de Ab/DVD)	Inhibición de Fosforilación de Akt VD de C-Terminal (% de Inhibición a 67, 6.7 y 0.67nm de Ab/DVD)
AB012	HGF		67nM=106%, 6.7nM=110%, 0.67nM=79%	
DVD033	RON	HGF		67nM=95%, 6.7nM=91%, 0.67nM=24%
DVD034	HGF	RON	67nM=111%, 6.7nM=105%, 0.67nM=99%	
AB012	HGF		67nM=106%, 6.7nM=110%, 0.67nM=79%	
DVD045	VEGF	HGF		67nM=64%, 6.7nM=-2%, 0.67nM=-15%
AB008	CD22		67nM=8%, 6.7nM=-13%	

Las DVD-Igs que contienen VD a partir de AB012 bien sea en la posición N-terminal o la C-terminal mostraron buena inhibición de la fosforilación de AKT inducida por HGF. La VD de AB012 en la posición N-terminal de DVD-Ig bloqueó la fosforilación de AKT así como también el anticuerpo base AB012.

Ejemplo 1.1.2.R: Inhibición de la Fosforilación de VEGFR2 (KDR) Mediante Anticuerpo Base VEGF Y Constructos DVD-Ig

Se colocaron en placa células NIH3T3 que expresan VEGFR2 humano (KDR) a 20,000 células/pozo (100µl) en placas de 96 pozos en DMEM complementado con FBS 10%. Al día siguiente, se lavaron las células dos veces con DMEM y se privaron de suero durante tres horas en DMEM sin FBS. Se pre-incubó anticuerpo base Anti-VEGF o DVD-Igs (a concentraciones finales de 67 nM, 6.7 nM y 0.67 nM) diluido en DMEM con BSA 0.1% con $VEGF_{165}$ humano recombinante (50ng/ml) durante 1 hora a 25°C. Estas mezclas de anticuerpo/DVD-Ig y VEGF se adicionaron posteriormente a las células, y se incubaron las placas a 37°C en una atmósfera humedecida, 5% de CO_2 durante 10 minutos. Se lavaron las células dos veces con PBS enfriado con hielo y se lisaron mediante la adición de 100µl/ pozo de Amortiguador de Lisis Celular (Cell Signaling, Boston, MA) complementado con NP40 0.1%. Se juntaron las muestras del duplicado y se adicionaron 170µl a los pozos de las placas de ELISA recubiertas previamente con anticuerpo anti-VEGFR2 (R&D systems, AF357, Minneapolis, MN) y se incubaron a 25°C con agitación suave durante dos horas. Se lavaron los pozos cinco veces con amortiguador de lavado (PBS que contiene 0.05% de Tween 20), y se incubaron con 50µl de dilución 1:2000 de anticuerpo anti-fosfotirosina biotinilado (4G10; Millipore, Billerica, MA) durante 1 hora a 25°C. Se lavaron los pozos cinco veces con PBS que contiene 0.05% de Tween 20, y se incubaron posteriormente durante 1 hora a 25°C con estreptavidina-HRP (KPL #474-3000, Gaithersburg, MD). Los pozos se lavaron tres veces con estreptavidina-HRP (KPL #474-3000, Gaithersburg, MD)). Los pozos se lavaron tres veces con PBS que contiene 0.05% de Tween 20, y se adicionaron 100µl de ULTRA-TMB ELISA (Pierce, Rockford, IL) por pozo. Siguiendo el desarrollo del color, la reacción se detuvo con HCL 1N y se midió la absorbancia a 450 nM. Los resultados se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21: Inhibición de la Fosforilación de VEGFR2 (KDR) Mediante Anticuerpos Base VEGF O Constructos DVD-Ig

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable C-terminal (VD)	Dominio Variable N-terminal (VD)	Inhibición de Pkdr en VD N-Terminal (EC50)	Inhibición de Pkdr en VD C-Terminal (EC50)
AB014	VEGF		0.45	
DVD044	DLL4	VEGF		10.40
DVD043	VEGF	DLL4	0.54	
AB014	VEGF		0.45	
DVD048	RON	VEGF		31.80
DVD047	VEGF	RON	0.47	

Las DVD-Igs que contienen VD a partir de AB014 bien sea en la posición N-terminal o la C-terminal mostraron buena inhibición de la fosforilación de KDR inducida por VEGF. La VD de AB014 en la posición N-terminal de DVD-Ig bloqueó la fosforilación de KDR así como también el anticuerpo base AB014.

Ejemplo 1.1.2.S: Inhibición de la Fosforilación de EGFR Inducida por EGF Mediante Anticuerpo Base EGFR O Constructos DVD-Ig In Vitro

Se adicionaron anticuerpos monoclonales de EGFR o DVD-Igs diluidos en D-PBS-BSA (solución salina amortiguada de fosfato de Dulbecco con 0.1%BSA) a células de carcinoma humano a concentraciones finales de 0.01 μg/mL-100 μg/mL (180μL). Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera humedecida, 5% de CO_2 durante 1 hora. Se adicionaron factores de crecimiento (EGF) a una concentración final de 1-100ng/mL (20μL) a las células durante 5-15 minutos para estimular el receptor de autofosforilación (EGFR). Se utilizaron pozos sin anticuerpo de tratamiento como controles de 0% de inhibición mientras que se consideró que los pozos sin estimulación de factor de crecimiento muestran 100% de inhibición. Se hicieron los lisados celulares mediante incubación con amortiguador de extracción celular (Tris 10 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, Triton X-100 1%, Glicerol 10%, SDS 0.1%, y coctel de inhibidor de proteasa). Se determinó la fosfo-EGFR en estos lisados celulares utilizando el equipo de ELISA p-EGFR a partir de R&D Systems (#DYC1095, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en las Tablas 22 y 23.

Tabla 22: Inhibición de la Fosforilación de EGFR Inducida por EGF Mediante Anticuerpos Base Anti-EGFR Y Constructos DVD-Ig

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Ensayo Celular de pEGFR de VD N-terminal (IC50 nM inducida por EGF)	Ensayo Celular de pEGFR de VD C-terminal (IC50 inducida por EGF)
AB033	EGFR		7.3	
DVD015	EGFR	HER-2	7.9	
DVD016	HER-2	EGFR		>50 (10 % max)
AB033	EGFR		7.3	
DVD021	EGFR	IGF1R	7.7	
DVD022	IGF1R	EGFR		> 50 (20% max)

Las DVD-Igs que contienen VD a partir de AB033 bien sea en la posición N-terminal o la C-terminal mostraron buena inhibición de la fosforilación de EGFR inducida por EGF. La VD de AB033 en la posición N-terminal de DVD-Ig (DVD015, DVD021) bloqueó la fosforilación de EGFR así como también el anticuerpo base AB033.

Tabla 23: Inhibición de la Fosforilación de EGFR Inducida por EGF Mediante Anticuerpos Base Anti-EGFR Y Constructos DVD-Ig

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Ensayo Celular N-Terminal, Inhibición de phEGFR inducida por EGF (IC50, nM)	Ensayo Celular C-Terminal, Inhibición de phEGFR inducida por EGF (IC50, nM)
AB033	EGFR		0.35	
DVD024	RON	EGFR	ND	7.143
DVD023	EGFR	RON	0.54	ND

Las DVD-Igs que contienen VD a partir de AB033 bien sea en la posición N-terminal o la C-terminal mostraron buena inhibición de la fosforilación de EGFR inducida por EGF. La VD de AB033 en la posición N-terminal de DVD-Ig (DVD023) bloqueó la fosforilación de EGFR así como también el anticuerpo base AB033.

Ejemplo 1.1.2.T: Inhibición de la Fosforilación de ERK1/2 Y AKT Inducida por MSP1 *In Vitro* Mediante Anticuerpo Base RON Y Constructos DVD-Ig

Se tripsinizaron células de tumor de colon DU145 sub-confluente que crecieron en FBS 10%/Medio Esencial Mínimo y se sembraron dentro de placas de cultivo de tejido de 6 pozos (0.25 x 10^6 células/2ml de volumen final), y se incubaron a 37°C, 5% de CO_2 durante 18-24 horas. Después de la incubación, se lavaron las células dos veces con D-PBS 1X y se privaron durante la noche en medio libre de suero. Al día siguiente, se incubaron la células con 900µl de medio libre de suero que contiene 1 µM de anticuerpos monoclonales o DVD-Igs durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación de anticuerpo, las células se trataron posteriormente con MSP1 13nM (37°C, 30 minutos). Las células se lavaron dos veces con D-PBS enfriado con hielo y se cosecharon en 150µl de Amortiguador de Extracción Celular (Biosource International, Carlsbad, CA) que contiene 100µl de coctel inhibidor de fosfatasa HALT® (Thermo Scientific, Rockford, IL), una tableta de inhibidor de proteasa libre de EDTA Complete® (1 tableta/10ml, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania), y PMSF. Los lisados celulares se incubaron sobre hielo durante 30 minutos con agitación excéntrica intermitente, se pre-aclararon mediante centrifugación (10 min, 14,000 RPM, 4°C), y se procesaron durante el análisis Western blot. Se resolvió un total de 15µg de lisado celular mediante SDS-PAGE sobre un Gel NuPage Bis-Tris 4-12% con amortiguador de corrida MOPS 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las proteínas se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se bloquearon en leche no grasa al 5% en TBS-T (TBS 1X/0.1% de Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del bloqueo, se incubaron las membranas durante la noche a 4°C con una dilución 1:1000 de tanto un anticuerpo policlonal de conejo fosfo-p44/42 MAPK (Thr^{202}/Tyr^{204}) (Cell Signaling, Danvers, MA) o un anticuerpo monoclonal de conejo fosfo-AKT (Ser^{473}) (Cell Signaling, Danvers, MA). Las manchas se lavaron tres veces (TBS-T 1X, 15 minutos), y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:5000 de IgG anti-conejo, anticuerpo de cabra secundario conjugado a HRP (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) en una solución 5% leche no grasa/TBS-T. Las manchas se lavaron tres veces (TBS-T 1X, 15 min), y el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa se activó mediante una incubación de 5

min. con SuperSignal West Dura Luminol/Enhancer Solution® (Millipore, Temecula, CA), y se detectó y cuantificó la quimioluminiscencia con un Analizador de Imagen Luminescente LAS-3000 (FUJIFilm, Tokyo, Japón). La densidad de la banda se determinó utilizando Software MultiGauge (FUJIFilm, Tokyo, Japón) y se cuantificó la señal total quimioluminiscente para cada banda. Para determinar los niveles totales de ERK1/2 y AKT, se despojaron las membranas durante 15 minutos con Reblot Plus Strong Solution® 1X (Thermo Scientific, Rockford, IL) y se volvieron a analizar con una dilución 1:1000 de bien sea un anticuerpo policlonal de conejo p44/42 MAPK (Cell Signaling, Danvers, MA) o un anticuerpo monoclonal de conejo AKT (Cell Signaling, Danvers, MA), y se procesaron tal como se describió anteriormente para los fosfo-anticuerpos. Se estandarizaron los niveles de Ph-ERK y ph-Akt hasta ERK total o Akt total, respectivamente.

Tabla 24: <u>Inhibición de la Fosforilación de ERK1/2 Inducida por MSP1 Mediante Anticuerpos Base RON O Constructos DVD-Ig</u>

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Ensayo Celular de VD N-Terminal, Inhibición de phERK1/2 inducida por RON (% de neutralización @ nM de Ab)	Ensayo Celular de VD C-Terminal, Inhibición de phERK1/2 inducida por RON (% de neutralización @ nM de Ab)
AB005	RON		80% a 1000nM	
DVD024	RON	EGFR	97% a 1000nM	
AB005	RON		80% a 1000nM	
DVD033	RON	HGF	60% a 1000nM	

Las DVD-Igs que contienen VD a partir de AB005 en la posición N-terminal mostraron excelente inhibición de la fosforilación de ERK1/2 inducida por MSP1. El perfil de inhibición de DVD024 y DVD033 fue similar al perfil de inhibición del anticuerpo base AB005.

Ejemplo 1.1.2.U: <u>Eficacia de un DVD-Ig Sobre el Crecimiento de Xenoinjertos de Flanco Subcutáneo de Carcinoma Humano</u>

Se hicieron crecer células de carcinoma epidermoide humano A-431 *in vitro* hasta viabilidad del 99%, 85% de confluencia en frascos de cultivo de tejido. Se

inyectaron subcutáneamente ratones hembra SCID (Charles Rivers Labs, Wilmington, MA) de 19-25 gramos en el costado derecho con 1 x 10^6 células de tumor humano (1:1 matrigel) en el día de estudio 0. Se inició la administración (IP, QD, 3x/semana) de IgG humana de control o DVD- Ig después de que los ratones se hicieron coincidir por tamaño en grupos de ratones con volúmenes de tumor medio de aproximadamente 200 a 320 mm^3. Los tumores se midieron dos veces a la semana comenzando desde aproximadamente el día 10 después de la inyección del tumor celular.

Se apreció la reducción en el volumen del tumor en animales administrados con EGFR + IGF 1/2 DVD Ig con respecto a los tumores en animales que recibieron únicamente IgG de control. Para dos constructos diferentes EGFR + IGF 1/2 DVD Ig, los % de TGIs fueron 69 y 64 tal como se midieron cuatro días después del final de la semana 3 de la fase de dosificación.

Ejemplo 1.1.2.V: <u>Unión de los Anticuerpos Monoclonales a la Superficie de las Líneas Celulares de Tumor Humano como se Determinó mediante Citometría de Flujo</u>

Se recogieron las líneas celulares estables que sobreexpresan un antígeno de superficie celular de interés o líneas celulares de tumor humano a partir de los frascos de cultivo de tejido y se resuspendieron en solución salina amortiguada de fosfato (PBS) que contiene 5% suero fetal bovino (PBS/FBS). Antes de la tinción, se incubaron las células de tumor humano sobre hielo con (100µl) de IgG humana a 5µg/ml en PBS/FCS. Se incubaron 1-5 x10^5 células con anticuerpo o DVD-Ig (2 µg/mL) en PBS/FBS durante 30-60 minutos sobre hielo. Las células se lavaron dos veces y se adicionaron 100µl de F(ab')2 cabra IgG anti-humana, Fcγ-ficoeritrina (dilución 1:200 en PBS) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat.# 109-116-170). Después de 30 minutos de incubación sobre hielo, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS/FBS. Se midió la fluorescencia utilizando un Becton Dickinson FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

La Tabla 25 muestra los datos de FACS para los constructos de DVD-Ig. La media geométrica es la raíz n del producto de la multiplicación de n señales fluorescentes (a1 x a2 x a3....an). Con los datos log-transformados se utilizó la media geométrica para normalizar la carga de la distribución de los datos. La

siguiente tabla contiene la media geométrica de la FACS de anticuerpos base y constructos de DVD-Ig.

Tabla 25: Separación de Células Activadas por Fluoresencia de Constructos DVD-Ig

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Media Geométrica FACS N-terminal	Media Geométrica FACS C-terminal
AB006	CD-19		979	
AB001	CD-20			
DVD001	CD-20	CD-19		161
DVD002	CD-19	CD-20	1102	
AB001	CD-20		95.8	
AB002	CD-3		461	
DVD003	CD-20	CD-3	45.9	5.7
DVD004	CD-3	CD-20	673	3.59
AB007	CD-80		25.4	
AB001	CD-20			
DVD005	CD-20	CD-80		6
DVD006	CD-80	CD-20	70.7	
AB002	CD-3		897	
AB004	HER-2		27.7	
DVD011	CD-3	HER-2	1096	3.39
DVD012	HER-2	CD-3	7.14	41.6
AB002	CD-3		461/897	
AB006	CD-19		661/989	
DVD013	CD-3	CD-19	417	103
DVD014	CD-19	CD-3	1090	23.3
AB033	EGFR		955.4	
AB004	HER-2		24.77	
DVD015	EGFR	HER-2	1006.4	200.07
DVD016	HER-2	EGFR	75.67	384.4
AB033	EGFR		955.4	
AB011	IGF1R		1684.5	
DVD021	EGFR	IGF1R	888.4	733.5
DVD022	IGF1R	EGFR	2016.5	411.4
AB005	RON		54.46	
AB033	EGFR		955.4	

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Media Geométrica FACS N-terminal	Media Geométrica FACS C-terminal
DVD024	RON	EGFR	0.38	309.4
DVD023	EGFR	RON	1001.4	164.96
AB033	EGFR		955.4	
AB012	HGF			
DVD025	EGFR	HGF	1045.4	
DVD026	HGF	EGFR		143.4
AB004	HER-2		24.77	
AB010	IGF1,2			
DVD029	HER-2	IGF1,2	22.37	
DVD030	IGF1,2	HER-2		0.23
AB004	HER-2		24.77	
AB011	IGF1R		1684.5	
DVD031	HER-2	IGF1R	4.99	24.7
DVD032	IGF1R	HER-2	34.6	4.9
AB005	RON		54.46	
AB012	HGF			
DVD033	RON	HGF	6.46	
DVD034	HGF	RON		0.39
AB014	VEGF			
AB033	EGFR		955.4	
DVD035	VEGF	EGFR		162.4
DVD036	EGFR	VEGF	1081.4	
AB014	VEGF			
AB004	HER-2		24.77	
DVD037	VEGF	HER-2		1.03
DVD038	HER-2	VEGF	7.47	
AB015	DLL-4		308.27	
AB014	VEGF			
DVD044	DLL4	VEGF	297.27	
DVD043	VEGF	DLL4		68.37
AB014	VEGF			
AB012	HGF			
DVD045	VEGF	HGF		
DVD046	HGF	VEGF		
AB005	RON		54.46	
AB014	VEGF			
DVD048	RON	VEGF	29.86	

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Media Geométrica FACS N-terminal	Media Geométrica FACS C-terminal
DVD047	VEGF	RON		0.51
AB014	VEGF			
AB016	NRP1		338.4	
DVD049	VEGF	NRP1		352.4
DVD050	NRP1	VEGF	336.4	
AB015	DLL-4		308.27	
AB047	PIGF			
DVD257	DLL4	PIGF	274.27	
DVD258	PIGF	DLL4		5.57

Todas las DVDs mostraron unión por sus objetivos de superficie celular. Los dominios N-terminales de los DVDs se unieron a sus objetivos sobre la superficie celular tan bien como o mejor que el anticuerpo base. La unión puede restaurarse o mejorarse mediante el ajuste de la longitud del enlazante.

Ejemplo 1.1.2.W: Unión de Anticuerpo Base EGFR y Constructos de DVD-Ig a la Superficie de Líneas Celulares de Tumor Humano tal como se Determinó Mediante Citometría de Flujo

Se recogieron las líneas celulares estables que sobreexpresan EGFR de superficie celular o líneas celulares de tumor humano a partir de los frascos de cultivo de tejido y se resuspendieron en solución salina amortiguada de fosfato de Dulbecco (DPBS) que contiene 1% suero fetal de becerro (DPBS/FCS). Se incubaron 1-5 x10^5 células con 100µL de anticuerpos o DVD-Igs (10 µg/mL) en DPBS/FCS durante 30-60 minutos sobre hielo. Las células se lavaron dos veces y se adicionaron 50µl de cabra IgG-ficoeritrina anti-humana, (dilución 1:50 en DPBS/BSA) (Southern Biotech Associates, Birmingham, AL cat#2040-09). Después de 30-45 minutos de incubación sobre hielo, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 125µL/pozo de formaldehído al 1% en DPBS/FCS. Se midió la fluorescencia utilizando un Becton Dickinson LSRII (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tabla 26: Afinidad de Unión de Anticuerpos Base anti-EGFR y Constructos de DVD-Ig a la Línea Celular EGFR A431 mediante FACS

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Unión Ag de VD N-terminal a A431 FACS (EC50, nM)	Unión Ag de VD C-terminal a A431 FACS (EC50, nM)
AB005	RON			
AB033	EGFR		4.2	
DVD024	RON	EGFR	ND	25.43
DVD023	EGFR	RON	5.38	ND

Todas las DVDs se unieron a sus objetivos de superficie celular. Los dominios N-terminales de los DVDs se unieron a sus objetivos sobre la superficie celular tan bien como el anticuerpo base.

Tabla 27: Afinidad de Unión de Anticuerpos Base anti-EGFR y Constructos de DVD-Ig para Línea Celular BAFvar3 mediante FACS

ID de Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Unión Ag de VD N-terminal a BAFvar3 FACS (EC50, nM)	Unión Ag de VD C-terminal a BAFvar3 FACS (EC50, nM)
AB005	RON			
AB033	EGFR		0.5	
DVD024	RON	EGFR	ND	17.8
DVD023	EGFR	RON	0.6	ND

Todas las DVDs se unieron a sus objetivos de superficie celular. Los dominios N-terminales de los DVDs se unieron a sus objetivos sobre la superficie celular tan bien como el anticuerpo base.

Ejemplo 1.2: Generación de Anticuerpos Monoclonales Base a un Antígeno Humano de Interés

MAbs de ratón base capaces de unirse a y neutralizer un antígeno humano de interés y un variante del mismo, se obtienen de la siguiente forma:

Ejemplo 1.2.A: Inmunización de Ratones con un Antígeno Humano de Interés

Veinte microgramos de antígeno humano purificado recombinante (p.e., IGF1,2) mezclados con adyuvante de Freund complejo o adyuvante de inmunoensayo (Qiagen, Valencia, CA) son inyectados subcutáneamente en cinco ratones de 6-8 semanas Balb/C, cinco ratones C57B/6, y cinco ratonres AJ en dl Día 1. En los días 24, 38, y 49, se inyectan subcutáneamente veinte microgramos de variante de antígeno humano purificado recombinante mezclaco con adyuvante de Freund incompleto o adyuvante de Inmunoensayo en los mismos ratones. En el día 84 o día 112 o día 144, los ratones son inyectados intravenosamente con 1 µg del antígeno humano purificado recombinante de interés.

Ejemplo 1.2.B: Generación de un Hibridoma

Esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados descritos en el Ejemplo 1.2.A son fusionados con células SP2/O-Ag-14 a una relación de 5:1 de acuerdo con el método establecido en Kohler, G. y Milstein (1975) Nature, 256:495 para generar hibridomas. Los productos de fusion son colocados en placa en medio de selección que contiene azaserina e hipoxantina en placas de 96 pozos a una densidad de $2.5x10^6$ células del bazo por pozo. Siete a diez días después de la fusión, se observan colonias de hibridoma macroscópicas. El sobrenandante de cada pozo que contiene las colonias de hibridoma es evaluado mediante ELISA para la presencia de anticuerpo al antígeno de interés (como se describe en el Ejemplo 1.1.1.A). Los sobrenadantes que muestran actividad específica de antígeno son entonces evaluados para actividad (como se describe en los ensayos del Ejemplo 1.1.2), por ejemplo, la capacidad de neutralizar al antígeno de interés en un bioensayos tal como es descrito en el Ejemplo 1.1.2.I).

Ejemplo 1.2.C: Identificación y Caracterización de Anticuerpos Monoclonales Base a un Antígeno de interés Objetivo Humano

Ejemplo 1.2.C.1: Anáisis del Anticuerpo Monoclonal Base que Neutraliza la Actividad

Los sobrenadantes de hibridoma son ensayados para la presencia de anticuerpos base que se unen a un antígeno de interés, generados de acuerdo con los Ejemplos 1.2.A y 1.2.B, y también son capaces de unirse a un variante del antígeno de interés ("variante de antígeno"). Los sobrenadantes con anticuerpos positivos en ambos ensayos son luego evaluados para su potencia de neutralización de antígeno, por ejemplo, en el bioensayo de citoquina del Ejemplo 1.1.2.I. Los hibridomas que producen los anticuerpos con valores IC_{50} en el bioensayo de menos de 1000pM, en una realización, menos de 100pM son escalados y clonados mediante dilución limitante. Las células de hibridoma son expandidas en medio que contiene 10% de suevo fetal bovino de IgG bajo (Hyclone #SH30151, Logan, UT). En promedio, 250 mL de cada sobrenadante de hibridoma (derivado de una población de clon) son cosechados, concentrados y purificados mediante cromatografía de afinidad de proteína A, como se describe en Harlow, E. y Lane, D. 1988 "Antibodies: A Laboratory Manual". Se determina la capacidad de los mAbs purificados para inhibir la actividad de su antígeno objetivo, por ejemplo, usando el bioensayos de citoquina descrito en el Ejemplo 1.1.2.I.

Ejemplo 1.2.C.2: Análisis de la Reactividad Cruzada de Anticuerpo Monoclonal Base al Antígeno de interés de Cynomolgus Objetivo

Para determinar si los mAbs seleccionados aqupi descritos reconocen el antígeno de interés cynomolgus, se conduce un anásis BIACORE aquí descrito (Ejemplo 1.1.1.G) usando antígeno objetivo cynomolgus recombinante. En adición, también se pueden medir las potencias de neutralización de los mAbs contra el antígeno de interés cynomolgus recombinante en el bioensayos de citoquina (Ejemplo 1.1.2.I). Los mAbs con buena reactividad cruzada (en una realización, entre 5 veces la reactividad para el antígeno humano) son seleccionados para futura caracterización.

Ejemplo 1.2.D: Determinación de la Secuencia de Amino Ácido de la Región Variable para cada Anticuerpo Monoclonal Anti-Humano Murino

El aislamiento de los ADNc, expresión y caracterización de los mAbs de ratón anti-humano recombinantes se conduce de la siguiente manera. Para determinación de cada secuencia de amino ácido, aproximadamente 1 x 10^6

células de hibridoma son aisladas mediante centrifugación y procesadas para aislar el ARN total con Trizol (Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total es sometido a síntesis de primera cadena de ADN usando el Sistema de Síntesis de Primera Cadena SuperScript (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Se usa Oligo(dT) para sebar la síntesis de primera cadena para seleccionar poli(A)+ ARN. El producto de ADNc de primera cadena es entonces amplificado mediante PCR con cebadores diseñados para amplificación de regiones variables de inmunoglobulina murina (Conjuntos de Ig-Cebador, Novagen, Madison, WI). Los productos de PCR son resueltos en un gel de agarosa, extirpados, purificados y luego subclonados con el kit de clonación TOPO en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y transformados en E.coli TOP10 químicamente competente (Invitrogen, Carlsbad, CA). La PCR de colonia es realizada sobre los transformantes para identificar clones que contienen inserto. El ADN plásmido es aislado de los clones que contienen inserto usando un kit de Miniprep QIAprep (Qiagen, Valencia, CA). Los insertos en los plásmidos son secuenciados en ambas cadenas para determinar las secuencias de ADN de cadena pesada o ligera usando cebadores M13 delantero y M13 reverso (Fermentas Life Sciences, Hanover MD). Se identifican las secuencias de cadena pesada variable y ligera variable de los mAbs. En una realización, los criterios de selección para un panel de mAbs guía para el desarrollo del siguiente paso (humanización) incluyen los siguientes:

- El anticuerpo no contiene ningún sitio de glicosilación enlazado a N (NXS), excepto el estándar en CH2
- El anticuerpo no contiene ninguna cisteína extra adicional a las cisteínas normales en cada anticuerpo
- La secuencia de anticuerpo está alineada con las secuencias de líena germinal más cercadas para VH y VL y se debe revisar la ocurrencia de cualquier amino ácido inusual en otros anticuerpos humanos naturales
- La Glutamina N-terminal (Q) es cambiada a ácido Glutámico (E) si no afecta la actividad del anticuerpo. Esto reducirá la heterogeneidad debido a la ciclización de Q
- El clivado de secuencia de señal eficiente es confirmado mediante Espectrofotometría de Masas. Esto se puede hacer con material de célula COS o célula 293

- La secuencia de proteína es revisada para el riesgo de desamidación de Asn que podría producir pérdida de actividad
- El anticuerop tiene un bajo nivel de agregación
- El anticuerpo tiene solubilidad >5-10 mg/ml (en fase de investigación); >25 mg/ml
- El anticuerpo tiene un tamaño normal (5-6 nm) por Dispersión de Luz Dinámica (DLS)
- El anticuerpo tiene una heterogeneidad de carga baja
- El anticuerpo carece de liberación de citoquina (ver Ejemplo 1.1.2.B)
- El anticuerpo tiene especificidad para la citoquina prevista (ver Ejemplo 1.1.2.C)
- El anticuerpo carece de reactividad cruzada de tejido inesperada (ver Ejemplo 1.1.2.D)
- El anticuerpo tiene similitude entre reactividad cruzada de tejido humano y cynomolgus (ver Ejemplo 1.1.2.D)

Ejemplo 1.2.2: <u>Anticuerpos Base Humanizados Recombinantes</u>

Ejemplo 1.2.2.1: <u>Construcción y Expressión de Anticuerpos Base Anti Humano Quiméricos Recombinantes</u>

El ADN que codifica la región constante de cadena pesada de mAbs base anti-humano murinos es reemplazado por un fragmento de ADNc que codifica la región constante de IgG1 humana que contiene 2 mutaciones de amino ácido de región bisagra mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657). La región constante de cadena ligera de cada uno de estos anticuerpos es reemplazada por región constante kappa humana. Los anticuerpos quiméricos de cadena total son expresados transitoriamente expresados en células COS mediante co-transfección de ADNc de cadena pesada y ligera quimérica ligados en el plásmido de expresión pBOS (Mizushima y Nagata, Nucleic Acids Research 1990, Vol 18, pg 5322). Los sobrenadantes de célula que contienen anticuerpo quimérico recombinante son purificados mediante cromatografía en Sefarosa Proteína A y el anticuerpo unido es eluido mediante la adición de amortiguador ácido. Los anticuerpos son neutralizados y dializados en PBS.

El ADNc de cadena pesada que codifica un mAb quimérico es co-transfectado con su ADNc de cadena ligera quimérico (ambos ligados en el vector pBOS) en células COS. El sobrenadante de célula que contiene el anticuerpo quimérico recombinante es pueificado mediante cromatografía en Sefarosa Proteína A y el anticuerpo unido es eluido mediante la adición de amortiguador ácido. Los anticuerpos son neutralizados y dializados en PBS.

Los mAbs base anti-humano quiméricos purificados son entonces evaluados para su habilidad de unirse (mediante Biacore) y para actividad funcinal, p.e., para inhibir la producción inducida por citoquina de IgE descrita en los Ejemplos 1.1.1.G y 1.1.2.B. Los mAbs quiméricos que mantienen la actividad de los mAbs de hibridoma base son seleccionados para futuro desarrollo.

Ejemplo 1.2.2.2: <u>Construcción y Expresión de Anticuerpos Base Antihumanos Humanizados</u>

Ejemplo 1.2.2.2.A: <u>Selección de Marcos de Anticuerpo Humanos</u>

Cada secuencia de gen de cadena pesada variable y ligera variable murina se alinea por separado contra 44 secuencias de cadena pesada variable de línea germinal de inmunoglobulina humana o 46 secuencias de cadena ligera de línea germinal (derivadas del sitio web NCBI Ig Blast en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html.) usando el software NTI de vector.

La humanización se basa en la homología de secuencia de amino ácido, análisis de grupo de CDR, frecuencia de uso entre anticuerpos humandos expresados, e información disponible sobre las estructuras de cristal de los anticuerpos humanos. Teniendo en cuenta los posibles efectos en la unión de anticuerpo, el emparejamiento VH- VL, y otros factores, los residuos murinos son mutados a residuos humanos cuando los residuos de marco murino y humano son diferentes, con unas pocas excepciones. Las estrategias de humanización adicionales están diseñadas con base en un análisis de secuencias de anticuerpo de línea germinal humana, o un subgrupo de las

mismas, que poseen un alto grado de homología, p.e., similitud de secuencia, con la secuencia de amino ácido real de las regiones variables de anticuerpo murinas.

El modelamiento de homología se usa para identificar residuos únicos a las secuencias de anticuerpo murinas que se predice que son críticas para la estructura del sitio de combinación del anticuerpo, las CDRs. El modelamiento de homología es un método por computadora por medio del cual se generan coordinadas tridimensionales aproximadas para una proteína. La fuente de las coordinadas iniciales yla guía para su refinamiento adicional es una segunda proteína, la proteína de referencia, para la cual se conocen las coordinadas tridimensionales y la secuencia con la cual se relaciona la secuencia de la primera proteína. La relación entre las secuencias de dos proteínas se usa para generar una correspondencia entre la proteína de referencia y la proteína para la cual se desean las coordinadas, la proteína objetivo. Las secuencias primarias de las proteínas de referencia y objetivo son alineadas con coordinadas de porciones idénticas de las dos proteínas transferidas directamente de la proteína de referencia a la proteína objetivo. Las coordinadas para porciones no coincidentes de las dos proteínas, p.e., de mutaciones de residuo, inserciones, o deleciones, son construidas a partir de plantillas estructurales genéricas y la energía refinada para asegurar la consistencia con las coordenadas del modelo ya transferido. Esta estructura de proteína por computadora puede ser refinada adicionalmente o empleada directamente en estudios de modelamiento. La calidad de la estructura modelo se determina mediante la precisión de la opinión que las proteínas de referencia y ojetivo están relacionadas y la precisión con la cual se construye la alineación de secuencia.

Para los mAbs murinos, se usa una combinación de búsqueda BLAST e inspección visual para identificar estructuras de referencia adecuadas. La identidad de secuencia de 25% entre las secuencias de amino ácido de referencia y objetivo es considerada la mínima necesaria para intentar un ejercicio de modelamiento de homología. Las alineaciones de secuencia son construidas manualmente y los coordinados del modelo son generados con el programa Jackal (ver Petrey, D. et al. (2003) Proteins 53 (Suppl. 6): 430–435).

Las secuencias primarias de las regiones de marco murina y humanas de los anticuerpos seleccionados comparten identidad significativa. Las posiciones de residuo que difieren son candidatas para inclusion del residuo murino en la secuencia humanizada con el fin de retener la potencia de unión observada del anticuerpo murino. Una lista de residuos de marco que difieren entre las secuencias humana y murina se construye manualmente. La Tabla 28 muestra las secuencias de marco elegidas para este estudio.

Tabla 28: Secuencia del Dominio Constante de Cadena Pesada y Dominio Constante de Cadena Ligera de IgG Humana

Proteína	SEQ ID NO	Secuencia
		12345678901234567890123456789012345678901
Región constante de hIgG1 tipo salvaje	**95**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Región constante de hIgG1 mutante	**96**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Region constante kappa de Ig	**SEQ ID NO.:97**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Region constante Lambda de Ig	**SEQ ID NO.:98**	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

La probabilidad que un residuo de marco dado afecte las propiedades de unión del anticuerpo depende de su proximidad a los residuos de la CDR. Por lo tanto, al usar estructuras modelo, los residuos que difieren entre las

secuencias que difieren entre las secuencias murina y humana son clasificados de acuerdo con su distancia desde cualquier átomo en las CDRs. Aquellos residuos que caen dentro de 4.5 Å de cualquier átomo de la CDR son identificados como los más importantes y se recomiendan como candidatos para retención del residuo murino en el anticuerpo humanizado (p.e., retro mutación).

Los anticuerpos humanizados construidos *in silico* son construidos usando oligonucleótidos. Para cada ADNc de region variable se diseñan 6 oligonucleótidos de 60-80 nucleótidos para superponerse entre sí por 20 nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de cada oligonucleótido. En una reacción de apareamiento, todos los 6 oligonulceótidos son combinados, ebullidos y apareados en la presencia de dNTPs. Se agrega polimerasa I de ADN, fragmento grande (Klenow) (New England Biolabs #M0210, Beverley, MA.) para rellenar aproximadamente 40bp espacios entre los oligonucleótidos que se superponen. Se lleva a cabo PCR para amplificar el gen de región variable entero uando dos cebadores extremos que contienen secuencias salientes complementarias a los múltiples sitios de clonación en un vector de pBOS modificado (Mizushima, S. y Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 17). Los productos de PCR derivados de cada ensamble de ADNc son separados sobre un gel de agarosa y la banda correspondiente al tamanño de ADNc de región variable predicho es extirpada y purificada. La región variable es insertada en marco en un fragmento de ADNc que codifica la region constante de IgG1 humana que contiene 2 mutaciones de amino ácido de región bisagra mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (Lund et al. (1991) J. Immunol. 147:2657). La región de cadena ligera variable es insertada en marco con la región constante kappa humana mediante recombinación homóloga. Las colonias bacterianas son aisladas y el ADN plásmido extraído. Los insertos de ADNc son secuenciados en su totalidad. Las cadenas pesada y ligera humanizadas correctas correspondientes a cada anticuerpo son co-transfectadas en células COS para producir transitoriamente anticuerpos anti-humano de largoitud total humanizados. Los sobrenadantes de célula que contienen anticuerpo quimérico recombinante son purificados mediante cromatografía en Sefarosa

Proteína A y el anticuerpo unido es aluído mediante la adición de amortiguador ácido. Los anticuerpos son neutralizados y dializados en PBS.

Ejemplo 1.2.2.3: Caracterización de Anticuerpos Humanizados

Se determina la capacidad de los anticuerpos humanizados purificados para inhibir una actividad funcional, p.e., usando el bioensayo de citoquina descrito en los Ejemplos 1.1.2.A. Las afinidades de unión de los anticuerpos humanizados a antígeno humano recombinante se determinan usando la medida de resonancia de plasmón superficial (Biacore®) descrita en el Ejemplo 1.1.1.B. Los valores de IC_{50} de los bioensayos y la afinidad de los anticuerpos humanizados son clasificados. Los mAbs humanizados que mantienen totalmente la actividad de los mAbs de hibridoma base son seleccionados como candidatos para futuro desarrollo. Los 2-3 mAbs humanizados más favorables con caracterizados adicionalmente.

Ejemplo 1.2.2.3.A: Análisis Farmacocinético de los Anticuerpos Humanizados

Los estudios farmacocinéticos se realizan en ratas Sprague-Dawley y monos cynomolgus. Ratas y monos macho y hembra son dosificados intravenosamente o subcutáneamente con una dosis única de 4mg/kg de mAb y las muestras son analizadas usando ELISA de captura de antígeno, y se determinan los parámetros farmacocinéticos mediante análisis no compartimental. Brevemente, las placas de ELISA son recubiertas con anticuerpo anti-biotina de cabra (5 mg/ml, 4°C, durante la noche), bloqueadas con Superblock (Pierce), e incubadas con antígeno humano biotinilado a 50 ng/ml en 10% de Superblock TTBS a temperatura ambiente por 2 horas. Las muestran en suero son diluidas serialmente (0.5% de suero, 10% de Superblock en TTBS) e incubadas sobre la placa por 30 minutos a temperatura ambiente. La detección se realiza con anticuerpo anti humano de cabra marcado con HRP y se determinan las concentraciones con la ayuda de curvas estándar usando el ajuste logístico de cuatro parámetros. Los valores para los parámetros farmacocinéticas son determinados mediante modelo no compartimental usando el software WinNonlin (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Se seleccionan los mAbs humanizados con buen perfil farmacocinético (T1/2 es de 8-13 días o mejor, con baja depuración y excelente biodisponibilidad 50-100%).

Ejemplo 1.2.2.3.B: Análisis Fisicoquímico y de Estabilidad In Vitro de los Anticuerpos Monoclonales Humanizados

Cromatografía de exclusión de tamaño

Los anticuerpos son diluidos hasta 2.5 mg/mL con agua y se analizan 20 mL en un sistema de HPLC Shimadzu usando una columna de gel TSK G3000 SWXL (Tosoh Bioscience, cat# k5539-05k). Las muestras son eluídas de la columna con sulfato de sodio 211 mM, fosfato de sodio 92 mM, pH 7.0, a una velocidad de flujo de 0.3 mL/minuto. Las condiciones de operación del sistema de HPLC son las siguientes:

Fase Móvil:	Na_2SO_4 211 mM, Na_2HPO_4*$7H_2O$ 92 mM, pH 7.0
Gradiente:	Isocrático
Velocidad de flujo:	0.3 mL/minuto
Largoitud de onda del detector:	280 nm
Temp. del enfriador Automuestreador:	4°C
Tempperatura del horno de columna:	Ambiente
Tiempo de corrida:	50 minutos

La Tabla 29 contiene los datos de pureza de anticuerpos base y constructos de DVD-Ig expresados como porcentaje de monómero (proteína no agregada del peso molecular esperado) determinada mediante el protocolo anterior.

Tabla 29: Pureza de los Anticuerpos Base y Contructos de DVD-Ig Determinados Mediante Cromatografía de Exclusión de Tamaño

ID del Anticuerpo Base o DVD-Ig	Dominio variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	% de Monómero (pureza)
AB033	EGFR		99.75
AB004	HER-2		95.6
DVD015	EGFR	HER-2	96.98
DVD016	HER-2	EGFR	93.41
AB033	EGFR		99.75
AB011	IGF1R		98.23
DVD021	EGFR	IGF1R	99.25
DVD022	IGF1R	EGFR	99.53
AB005	RON		79.34

AB033	EGFR		99.75
DVD024	RON	EGFR	96.86
DVD023	EGFR	RON	97.27
AB033	EGFR		99.75
AB012	HGF		98.97
DVD025	EGFR	HGF	99.21
DVD026	HGF	EGFR	99.48
AB004	HER-2		95.6
AB010	IGF1,2		93.2
DVD029	HER-2	IGF1,2	88.2
DVD030	IGF1,2	HER-2	96.9
AB004	HER-2		95.6
AB011	IGF1R		98.23
DVD031	HER-2	IGF1R	94.53
DVD032	IGF1R	HER-2	98.1
AB005	RON		79.34
AB012	HGF		98.97
DVD033	RON	HGF	100
DVD034	HGF	RON	100
AB014	VEGF		97.81
AB033	EGFR		99.75
DVD035	VEGF	EGFR	97.7
DVD036	EGFR	VEGF	99.36
AB014	VEGF		97.81
AB004	HER-2		95.6
DVD037	VEGF	HER-2	45.4
DVD038	HER-2	VEGF	96.9
AB014	VEGF		97.81
AB010	IGF1,2		93.2
DVD041	VEGF	IGF1,2	94.7
DVD042	IGF1,2	VEGF	92.4
AB015	DLL-4		97.52
AB014	VEGF		97.81
DVD044	DLL4	VEGF	48.66
DVD043	VEGF	DLL4	96.72
AB014	VEGF		97.81
AB012	HGF		98.97
DVD045	VEGF	HGF	97.88
DVD046	HGF	VEGF	98.14
AB005	RON		79.34
AB014	VEGF		97.81
DVD048	RON	VEGF	100
DVD047	VEGF	RON	100

AB014	VEGF		97.81
AB016	NRP1		93.54
DVD049	VEGF	NRP1	97.74
DVD050	NRP1	VEGF	98.59
AB015	DLL-4		97.52
AB047	PIGF		99.47
DVD257	DLL4	PIGF	83.8
DVD258	PIGF	DLL4	100
AB014	VEGF		97.81
AB047	PIGF		99.47
DVD259	VEGF	PIGF	90.61
DVD260	PIGF	VEGF	98.57
AB062	ErbB3		100
AB033	EGFR		99.75
DVD299	ErbB3	EGFR	98.8
DVD300	EGFR	ErbB3	100
AB063	ErbB3		96
AB033	EGFR		99.75
DVD305	ErbB3	EGFR	83.8
DVD306	EGFR	ErbB3	100

Las DVD-Igs mostraron un perfil SEC excelente con la mayoría de las DVD-Ig mostrando >90% de monómero. Este perfil de DVD-Ig es similar al observado para anticuerpos base.

SDS-PAGE

Los anticuerpos son analizados mediante electroforesis de gel de dodecil sulfato de sodio - poliacrilamida (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras y no reductoras. Se usa el lote de Adalimumab AFP04C como un control. Para condiciones reductoras, las muestras son mezcladas 1:1 con amortiguador de muestra de tris glicina SDS-PAGE 2X (Invitrogen, cat# LC2676, lot# 1323208) con DTT 100 mM, y calentadas a 60°C por 30 minutos. Para condiciones no reductoras, las muestras son mezcladas 1:1 con amortiguador de muestra y calentadas a 100°C por 5 minutos. Las muestras reducidas (10 mg por pista) son cargadas en un gel al 12% de tris-glicina pre-fundido (Invitrogen, cat# EC6005box, lot# 6111021), y las muestras no reducidas (10 mg por pista) son cargadas en un gel al 8%-16% de tris-glicina pre-fundido (Invitrogen, cat# EC6045box, lot# 6111021). Se usa SeeBlue Plus

2 (Invitrogen, cat#LC5925, lot# 1351542) como un marcador de peso molecular. Los geles son corridos en una caja de gel de mini celda XCell SureLock (Invitrogen, cat# EI0001) y las proteínas son separadas primero aplicando un voltaje de 75 para apilar las muestras en el gel, seguido por un voltaje constante de 125 hasta que el frente de colorante alcance el fondo del gel. El amortiguador de corrida usado es amortiguador de tris glicina SDS 1X, preparado a partir de un amortiguador de tris glicina SDS 10X (ABC, MPS-79-080106)). Los geles son teñidos durante la noche con tinción de azul coloidal (Invitrogen cat# 46-7015, 46-7016) y desteñidos con agua Milli-Q hasta que el fondo es claro. Los geles teñidos son entonces escaneados usando un escáner de Expressión Epson (modelo 1680, S/N DASX003641).

Análisis de Velocidad de Sedimentación

Los anticuerpos son cargados en la cámara de muestra de cada una de las tres piezas centrales estándar de carbón epon de dos sectores. Estas piezas centrales tienen una largoitud de ruta óptica de 1.2 cm y están construidas con ventanas de zafiro. Se usa PBS para un amortiguador de referencia y cada cámara contenía 140 µL. Todas las muestras son examinadas simultáneamente usando un rotor de 4 huecos (AN-60Ti) en una ultracentrífuga analítica Beckman ProteomeLab XL-I (serial # PL106C01).

Las condiciones de corrida son programadas y se realiza el control centrífugo usando ProteomeLab (v5.6). Se deja que las muestras y el rotor se equilibren térmicamente por una hora antes del análisis (20.0 ± 0.1 °C). La confirmación de la carga de celda apropiada se realiza a 3000 rpm y se registra un solo barrido para cada celda. Las condiciones de velocidad de sedimentación son las siguientes:

Volumen de Celda de Muestra: 420 mL
Volumen de Celda de Referencia: 420 mL
Temperatura: 20°C
Velocidad del Rotor: 35,000 rpm
Tiempo: 8:00 horas
Largoitud de onda UV: 280 nm
Tamaño de Paso Radial: 0.003 cm

Recolección de datos: Un punto de datos por paso sin promediar la señal.

Número Total de Barridos: 100

Medida de peso molecular por LC-MS de los anticuerpos intactos

Se analiza el peso molecular de los anticuerpos intactos mediante LC-MS. Cada anticuerpo es diluido hasta aproximadamente 1 mg/mL con agua. Se usa un sistema de HPLC 1100 (Agilent) con una microtrampa de proteína (Michrom Bioresources, Inc, cat# 004/25109/03) para desalinizar e introducir 5 mg de la muestra en un espectrómero de masas API Qstar pulsar i (Applied Biosystems). Se usa un gradiente corto para eluir las muestras. El gradiente es corrido con fase móvil A (0.08% de FA, 0.02% de TFA en agua de HPLC) y fase móvil B (0.08% de FA y 0.02% de TFA en acetonitrilo) a una velocidad de flujo de 50 mL/minuto. El espectrómetro de masas es operado a voltaje de pulverización de 4.5 kvolts con un rango de barrido de 2000 a 3500 de relación de masa a carga.

Medida del peso molecular mediante LC-MS de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo

La medida del peso molecular de la cadena ligera (LC), cadena pesada (HC) y HC desglicosilada del anticuerpo son analizadas mediante LC-MS. Se diluye el anticuerpo hasta 1 mg/mL con agua y la muestra es reducida hasta LC y HC con una concentración final de DTT 10 mM por 30 minutos a 37°C. Para desglicosilar el anticuerpo, 100 mg del anticuerpo son incubados con 2 mL de PNGasa F, 5 mL de N-octilglucosida al 10% en un volumen total de 100 mL durante la noche a 37 °C. Después de la desglicosilación la muestra es reducida con una concentración final de DTT 10 mM por 30 minutos a 37°C. Se usa un sistema de HPLC Agilent 1100 con una columna C4 (Vydac, cat# 214TP5115, S/N 060206537204069) para desalinizar e introducir la muestra (5 mg) en un espectrómetro de masas API Qstar pulsar i (Applied Biosystems). Se usa un gradiente corto para eluir la muestra. El gradiente es corrido con fase móvil A (0.08% de FA, 0.02% de TFA en agua de HPLC) y fase móvil B (0.08% de FA y 0.02% de TFA en acetonitrilo) a una velocidad de flujo de 50 mL/minuto. El espectrómetro de masas es operado a voltaje de pulverización

de 4.5 kvolts con un rango de barrido de 800 a 3500 de relación de masa a carga.

Mapeo de Péptido

El anticuerpo es desnaturalizado por 15 minutos a temperatura ambiente con una concentración final de clorhidrato de guanidina 6 M en bicarbonato de amonio 75 mM. Las muestras desnaturalizadas son reducidas con una concentración final de DTT 10 mM a 37°C por 60 minutos, seguidas por alquilación con ácido yodoacético 50 mM (IAA) en la oscuridad a 37°C for 30 minutos. Después de la alquilación, la muestra es dializada durante la noche contra cuatro litros de bicarbonato de amonio 10 mM a 4°C. La muestra dializada es diluida hasta 1 mg/mL con bicarbonato de amonio 10 mM, pH 7.8 y 100 mg de anticuerpo son digeridos con tripsina (Promega, cat# V5111) o Lys-C (Roche, cat# 11 047 825 001) a una relación 1:20 (p/p) de tripsina/Lys-C:anticuerpo a 37°C por 4 hrs. Las digestiones son extinguidas con 1 mL de HCl 1 N. Para el mapeo de peptide con detección con espectrómetro de masas, 40 mL de las digestiones son separados mediante cromatografía líquida de alto desempeño de fase reversa (RPHPLC) en una columna C18 (Vydac, cat# 218TP51, S/N NE9606 10.3.5) con un sistema de HPLC Agilent 1100. La separación de péptido es corrida con un gradiente usando fase móvil A (0.02% de TFA y 0.08% de FA en agua grado HPLC) y fase móvil B (0.02% de TFA y 0.08% de FA en acetonitrilo) a una velocidad de flujo de 50 mL/minutos. El espectrómetro de masas API QSTAR Pulsar i es operado en modo positivo a voltaje de pulverización de 4.5 kvolts y un rango de barrido de 800 a 2500 de relación masa a carga.

Mapeo de la unión de Disulfuro

Para desnaturalizar el anticuerpo, 100 mL del anticuerpo se mezclan con 300 mL de guanidine HCl 8M en bicarbonato de amonio 100 mM. El pH es verificado para asegurar que está entre 7 y 8, y las muestras son desnaturalizadas por 15 minutos a temperatura ambiente en una concentración final de guanidina HCl 6 M. Una porción de la muestra desnaturalizada (100 mL) es diluida hasta 600 mL con agua Milli-Q para dar una concentración final de guanidina-HCl 1 M. La muestra (220 mg) es digerida con tripsina (Promega, cat # V5111, lot# 22265901) o Lys-C (Roche, cat# 11047825001, lot#

12808000) a unas relaciones de 1:50 tripsina o 1:50 Lys-C: anticuerpo (p/p) (4.4 mg de enzima: 220 mg de muestra) a 37°C por aproximadamente 16 horas. Un adicional de 5 mg de tripsina o Lys-C son agregados a las muestras y se deja proceder la digestión por un adicional de 2 horas a 37°C. Las digestiones son detenidas agregando 1 mL de TFA a cada muestra. Las muestras digeridas son separadas mediante RPHPLC usando una columna C18 (Vydac, cat# 218TP51 S/N NE020630-4-1A) sobre un sistema de HPLC Agilent. La separación es corrida con el mismo gradiente usado para el mapeo de péptido usando fase móvil A (0.02% de TFA y 0.08% de FA en agua grado HPLC) y fase móvil B (0.02% de TFA y 0.08% de FA en acetonitrilo) a una velocidad de flujo de 50 mL/minuto. Las condiciones de operación de HPLC son las mismas que las usadas para el mapeo de péptido. El espectrómetro de masas API QSTAR Pulsar i es operado en modo positivo a voltaje de pulverización de 4.5 kvolts y un rango de barrido de 800 a 2500 de relación masa a carga. Los enlaces de dilsulfuro son asignados emparejando los PM de los péptidos observados con los PM predichos de los péptidos trípticos o Lys-C enlazados a los enlaces de disulfuro.

Determinación de sulfhidrilo libre

El método usado para cuantificar las cisteínas libres en un anticuerpo se basa en la reacción del reactivo de Ellman, 5,5¢- ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), con grupos sulfhidrilo (SH) que da lugar a un producto cromofórico característico, 5-tio-(ácido 2-nitrobenzóico) (TNB). La reacción se ilustra en la formula:

DTNB + RSH ® RS-TNB + TNB- + H+

La absorbancia de la TNB- se mide a 412 nm usando un espectrofotómetro Cary 50. Se grafica una curva de absorbancia usando diluciones de de 2 mercaptoetanol (b-ME) como el estándar de SH libre y se determinan las concentraciones de los grupos sulfhidrilo libre en la proteína a partir de la absorbancia a 412 nm de la muestra.

El patron estándar de b-ME se prepara mediante una dilusión serial de b-ME 14.2 M con agua grado HPLC hasta una concentración final de 0.142

mM. Luego se preparan los estándares en triplicado para cada concentración. El anticuerpo es concentrado hasta 10 mg/mL usando un filtro centrífuga amicon ultra 10,000 MWCO (Millipore, cat# UFC801096, lot# L3KN5251) y el amortiguador es cambiado al amortiguador de formulación usado para adalimumab (fosfato de sodio monobásico 5.57 mM, fosfato de sodio dibásico 8.69 mM, NaCl 106.69 mM, citrato de sodio 1.07 mM, ácido cítrico 6.45 mM, manitol 66.68 mM, pH 5.2, 0.1% (p/v) de Tween). Las muestras son mezcladas en un agitador a temperatura ambiente por 20 minutos. Luego se agregan 180 mL de amortiguador Tris 100 mM, pH 8.1 a cada muestra y estándar seguido por la adición de 300 mL de DTNB 2 mM en amortiguador de fosfato 10 mM, pH 8.1. Después de mezclado completo, las muestras y los estándares sonm medidos para absorción a 412 nm en un espectrofotómetro Cary 50. La curva estándar es obtenida graficando la cantidad de SH libre y OD_{412} nm de los estándares de b-ME. El contenido de SH libre de las muestras se calcula cn base en esta surva después de restar el blanco.

Cromatografía de Intercambio de Catión Débil

El anticuerpo es diluito hasta 1 mg/mL con fosfato de sodio 10 mM, pH 6.0. La heterogeneidad de carga es analizada usando un sistema de HPLC Shimadzu con una columna analítica WCX-10 ProPac (Dionex, cat# 054993, S/N 02722). Las muestras son cargadas en la columna en una fase móvil A al 80% (fosfato de sodio 10 mM, pH 6.0) y fase móvil B al 20% (fosfato de sodio 10 mM, NaCl 500 mM, pH 6.0) y eluídas a una velocidad de flujo de 1.0 mL/minuto.

Perfil de Oligosacárido

Los oligosacáridos liberados después del tratamiento con PNGasa F de anticuepro son derivatizados con reactivo de marcado de 2-aminobenzamida (2-AB). Los oligosacáridos marcados fluorescents son separados mediante cromatografía líquida de alto desempeño de fase normal (NPHPLC) y las diferentes formas de oligosacáridos son caracterizadas con base en la comparación de tiempo de retención con estándares conocidos.

El anticuerpo es primero digerido con PNGasaF para clivar oligosacáridos N-enlazados de la porción Fc de la cadena pesada. El anticuerpo (200 mg) es colocado en un tubo Eppendorf de 500 mL junto con 2 mL de PNGasa F y 3 mL de N-octilglucósido al 10%. Se agrega solución salina amortiguada con fosfato para llevar el volumen final hasta 60 mL. La muestra es incubada durante la noche a 37°C en un termomezclador Eppendorf ajustado a 700 RPM. El Adalimumab lote AFP04C también es digerido con PNGasa F como un control.

Después del tratamiento con PNGasa F, las muestras son incubadas a 95°C por 5 minutos en un termomezclador Eppendorf ajustado a 750 RPM para precipitar las proteínas, luego las muestras son colocadas en una centrífuga Eppendorf por 2 minutos a 10,000 RPM para centrifugar las proteínas precipitadas. El sobrenadante que contiene los oligosacáridos es transferido a un tubo Eppendorf de 500 mL y velocidad-vac a 65°C.

Los oligosacáridos son marcados con 2AB usando un kit de marcado de 2AB comprado en Prozyme (cat# GKK-404, lot# 132026). El reactivo de marcado es preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se agrega ácido acético (150 mL, suministrado en el kit) al vial de DMSO (suministrado en el kit) y se mezcla pipeteando la solución hacia arriba y abajo varias veces. La mezcla de ácido acético/DMSO (100 mL) es transferido a un vial de colorante 2-AB (justo antes de uso) y mezclada hasta que el colorante se disuelve totalmente. La solución de colorante es entonces agregada a un vial de reductor (suministrado en el kit) y mezclado bien (reactivo de marcado). El reactivo de marcado (5 mL) es agregado a cada vial de muestra de oligosacárido seca, y mezclado totalmente. Los viales de reacción son colocados en un termomezclador Eppendorf ajustado a 65°C y 700-800 RPM por 2 horas de reacción.

Después de la reacción de marcado, el exceso de colorante fluorescente es removido usando Cartuchos GlycoClean S de Prozyme (cat# GKI-4726). Antes de agregar las muestras, los cartuchos son lavados con 1 mL de agua milli-Q seguida de 5 ishes de 1 ml de solución de ácido acético al 30%. Justo

antes de agregar las muestras, se adiciona 1 mL de acetonitrilo (Burdick y Jackson, cat# AH015-4) a los cartuchos.

Después que todo el acetonitrilo pase a través del cartucho, la muestra es manchada en el centro de los discos recién lavados y se deja absorber en el disco por 10 minutos. El discto es lavado con 1 mL de acetonitrilo seguido por los cinco ishes de 1 mL de acetonitrilo al 96%. Los cartuchos son colocados en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y los oligosacáridos marcados con 2-AB son eluídos con 3 ishes (400 mL cada ish) de agua milli Q.

Los oligosacáridos son separados usando una columna de HPLC Glycosep N (cat# GKI-4728) conectada a un sistema de HPLC Shimadzu. El sistema de HPLC Shimadzu consistía de un controlador de sistema, desgasificador, bombas binarias, automuestreador con enfriador de muestra y un detector fluorescente.

Estabilidad a Temperaturas Elevadas

El amortiguador del anticuerpo es fosfato de sodio monobásico 5.57 mM, fosfato de sodio dibásico 8.69 mM, NaCl 106.69 mM, citrato de sodi 1.07 mM, ácido cítrico 6.45 mM, manitol 66.68 mM, 0.1% (p/v) de Tween, pH 5.2; o histidina 10 mM, metionina 10 mM, manitol al 4%, pH 5.9 usando filtros ultra centrífugos Amicon. La concentración final de los anticuerpos es ajustada hasta 2 mg/mL con los amortiguadores apropiados. Las soluciones de anticuerpo son entonces filtradas esterilizadas y se preparan alícuotas de 0.25 mL bajo condiciones estériles. Las alícuotas son dejadas a cualquiera de either -80°C, 5°C, 25°C, o 40°C por 1, 2 o 3 semanas. Al final del período de incubación, las muestras son analizadas mediante cormatografía de exclusión de tamaño y SDS-PAGE.

La estabilidad de las muestras es analizada mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras. El procedimiento usado es el mismo al aquí descrito. Los geles son teñidos durante la noche con tinión de azul coloidal (Invitrogen cat# 46-7015, 46-7016) y desteñidos con agua Milli-Q hasta que el fondo es claro. Los geles teñidos son entonces escaneados usando un

escáner de Expresión Epson (modelo 1680, S/N DASX003641). Para obtener mayor sensibilidad, los mismos geles son teñidos con plata usando el kit de tinción con plata (Owl Scientific) y se usan los procedimientos recomendados dados por el fabricante.

Ejemplo 1.2.2.3.C: Eficacia De un Anticuerpo Monoclonal Humanizado por Sí Mismo o en Combinación con Quimioterapia en el Crecimiento de Xenoinjertos de Carcinoma Humano

Células de cáncer humanas son cultivadas in vitro hasta 99% de viabilidad, 85% de confluencia en frascos de cultivo de tejido. Ratones SCID hembras o machos (Charles Rivers Labs) de 19-25 gramos, son marcados en la oreja y rasurados. Los ratones son entonces inoculados subcutáneamente en el costado derecho con 0.2 ml de 2 x 10^6 células de tumor humanas (1:1 matrigel) en el día 0 del estudio. La administración (IP, Q3D/ semana) de vehículo (PBS), anticuerpo humanizado, y/o quimioterapia se inicia después que los ratones son emparejados por tamaño en jaulas separadas de ratones con volúmenes de tumor medio de aproximadamente 150 a 200 mm^3. Los tumores son medidos mediante un par de capilares dos veces a la semana, partiendo aproximadamente el día 10 después de la inoculación, y los volúmenes de tumor son calculados de acuerdo con la formula $V = L \times W^2/2$ (V: volumen, mm^3; L: largoitud, mm; W: ancho, mm). La reducción del volumen de tumor se ve en animales tratados con mAb solo o en combinación con quimioterapia, con relación a tumores en animales que solamente recibieron vehículo o un mAb de control isotipo.

Ejemplo 1.2.2.3.D: Ensayo de Citotoxicidad Redirigida con base en FACS (rCTL)

Células T CD3+ humanas fueron aisladas de células mononucleares de sangre periférica aisladas previamente congeladas (PBMC) mediante una columna de enriquecimiento de selección negativa (R&D Systems, Minneapolis, MN; Cat.#HTCC-525). Las células T fueron estimuladas por 4 días en frascos (vent cap, Corning, Acton, MA) recubiertos con 10µg/mL de anti-CD3 (OKT-3, eBioscience, Inc., San Diego, CA) y 2µg/mL de anti-CD28 (CD28.2, eBioscience, Inc., San Diego, CA) en D-PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA) y

cultivadas en 30U/mL de IL-2 (Roche) en medio RPMI 1640 completo (Invitrogen, Carlsbad, CA) con L-glutamina, β-ME 55mM, Pen/Strep, FBS al 10%). Las células T se dejaron entonces reposar durante la noche en 30U/mL de IL-2 antes de usarse en el ensayo. Células objetivo DoHH2 o Raji fueron marcadas con PKH26 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó medio RPMI 1640 (sin fenol, Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene L-glutamina y FBS al 10% (Hyclone, Logan, UT) a lo largo del ensayo rCTL. (Ver Dreier et al. (2002) Int J Cancer 100:690).

Células T efectoras (E) y objetivos (T) fueron colocadas en placa a una concentración final de 10^5 y 10^4 células/pozo en placas de 96 pozos (Costar #3799, Acton, MA), respectivamente a una relación dada E:T de 10:1. Las moléculas de DVD-Ig fueron ensconces diluidas para obtener curvas de titulación dependientes de concentración. Después de incubación durante la noche, las células son peletizadas y lavadas con D-PBS una vez antes de resuspenderlas en amortiguador FACS que contiene BSA al 0.1% (Invitrogen, Carlsbad, CA), azida de sodio al 0.1% y 0.5µg/mL de yoduro de propidio (BD) en D-PBS. Los datos de FACS fueron recolectados en una máquina FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA) y analizados en Flowjo (Treestar). Se calculo el porcentaje de objetivos vivos en las muestras tratadas con DVD-Ig dividido por el porcentaje de objetivos totales (control, sin tratamiento) para determinar el porcentaje de lísis específica. Se calcularon los IC50s en Prism (Graphpad).

La DVD-Ig CD3 / CD 19 (AB secuencias IDs, AB002 + AB006; Ejemplo 2.7) se evaluó en el ensayo de citotoxicidad redirigida para eliminación de célula de tumor. Esta DVD-Ig mostra eliminación de tumor in vitro con un IC50 = 5.0 pM También se evaluó una DVD-Ig CD3 / CD20 para toxicidad redirigida y mostró eliminación de tumor in vitro con un IC50 = 325pM. La secuencia de esta DVD-Ig CD3 / CD20 fue revelada en la Solicitud de Patente US Serial No. 20070071675.

Ejemplo 1.4: <u>Generación de una DVD-Ig</u>

Las moléculas de DVD-Ig capaces de unirse a dos antígenos son construidas usando dos anticuerpos monoclonales base, uno contra antígeno A

humano, y el otro contra antígeno B humano, seleccionados como se describe aquí.

Ejemplo 1.4.1: Generación de una DVD-Ig que Tiene dos Largoitudes de Enlazante

Se usó una region constante que contiene Fc μ1 con mutaciones en 234, y 235 para eliminar las funciones efectoras de ADCC/CDC. Se generan cuatro constructos de DVD-Ig anti-A/B diferentes: 2 con enlazante corto y 2 con enlazante largo, cada uno en dos orientaciones de dominio diferentes: V_A-V_B-C y V_B-V_A-C (ver Tabla 30). Las secuencias enlazantes, derivadas de la secuencia N-terminal de Cl/Ck humana o dominio CH1, son las siguientes:

Para constructos de DVDAB:

Cadena ligera (si anti-A tiene λ): enlazante corto: QPKAAP; enlazante largo: QPKAAPSVTLFPP

Cadena ligera (si anti-A tiene κ): enlazante corto: TVAAP; enlazante largo: TVAAPSVFIFPP

Cadena pesada (γ1): enlazante corto: ASTKGP; enlazante largo: ASTKGPSVFPLAP

Para constructos de DVDBA:

Cadena ligera (si anti-B tiene λ): enlazante corto: QPKAAP; enlazante largo: QPKAAPSVTLFPP

Cadena ligera (si anti-B tiene κ): enlazante corto: TVAAP; enlazante largo: TVAAPSVFIFPP

Cadena pesada (γ1): enlazante corto: ASTKGP; enlazante largo: ASTKGPSVFPLAP

Los constructos de cadena pesada y ligera son subclonados en el vector de expresión pBOS, y expresados en células COS, seguido por purificación mediante cromatografía de Proteína A. Los materiales purificados son sometidos a SDS-PAGE y análisis de SEC.

La Tabla 30 describe los constructos de cadena pesada y ligera usados para expresar cada proteína DVD-Ig anti-A/B.

Tabla 30: Constructos de DVD-Ig Anti-A/B

Proteína de DVD-Ig	Constructo de cadena pesada	Constructo de cadena ligera
DVDABSL	DVDABHC-SL	DVDABLC-SL
DVDABLL	DVDABHC-LL	DVDABLC-LL
DVDBASL	DVDBAHC-SL	DVDBALC-SL
DVDBALL	DVDBAHC-LL	DVDBALC-LL

Ejemplo 1.4.2: Clonación Molecular de constructos de ADN para DVDABSL y DVDABLL:

Para generar los constructos de cadena pesada DVDABHC-LL y DVDABHC-SL, el dominio VH de un Anticuerpo A es amplificado por PCR usando cebadores específicos (cebadores 3' contienen secuencia de revestimiento corta/larga para los constructos SL/LL, respectivamente); mientras tanto, el dominio VH del ancituerpo B es amplificado usando cebadores específicos (cebadores 5' que contienen secuencia de revestimiento corta/larfa para los constructos SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones de PCR son realizadas de acuerdo con técnicas y procedimientos de PCR estándar. Los dos productos de PCR son purificados con gel, y usados juntos como plantilla de superposición para la reacción de PCR de superposición posterior. Los productos de PCR de superposición son subclonados en vector de expresión no mamífero pBOS-hCγ1,z doble digerido Srf I y Sal I (Abbott) usando el enfoque de recombinación homóloga estándar.

Para generar los constructos de cadena ligera DVDABLC-LL y DVDABLC-SL, el dominio VL de un anticuerpo A es aplificado por PCR usando cebadores específicos (cebadores 3' contienen secuencia de revestimiento corta/larga para los constructos SL/LL, respectivamente); mientras tanto, el dominio VL del anticuerpo B es amplificado usando cebadores específicos (cebadores 5' contienen secuencia de revestimiento corta/larga para los

constructos SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones de PCR son realizadas de acuerdo con técnicas y procedimientos de PCR estándar. Los dos productos de PCR son purificados con gel, y usados juntos como plantilla de superposición para la reacción de PCR de superposición posterios usando condiciones de PCR estándar. Los productos de PCR de superposición son subclonados en vector de expresión mamífero pBOS-hCk doble digerido Srf I y Not I (Abbott) usando enfoque de recombinación homóloga estándar. Se ha usado un enfoque similar para generar DVDBASL y DVDBALL descrito a continuación:

Ejemplo 1.4.3: <u>Clonación Molecular de constructos de ADN para DVDBASL y DVDBALL</u>

Para generar los constructos de cadena pesada DVDBAHC-LL y DVDBAHC-SL, el dominio VH del anticuerpo B es amplificado por PCR usando cebadores específicos (cebadores 3' contienen secuencia de revestimiento corta/larga para constructos SL/LL, respectivamente); mientras tanto el monidio VH del anticuerpo A es amplificado usando cebadores específicos (cebadores 5' contienen secuencia de revestimiento corta/larga para constructos SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones de PCR son realizadas de acuerdo con técnicas y procedimientos de PCR estándar. Los dos productos de PCR son purificados con gel, y usados juntos como plantilla de superposición para la reacción de PCR de superposición posterior usando condiciones de PCR estándar. Los productos de PCR de superposición son subclonados en vector de expresión no mamífero pBOS-hCγ1,z doble digerido Srf I y Sal I (Abbott) usando el enfoque de recombinación homóloga estándar.

Para generar los constructos de cadena ligera DVDBALC-LL y DVDBALC-SL, el dominio VL del anticuerpo B es amplificado por PCR usando cebadores específicos (cebadores 3' contienen secuencia de revestimiento corta/larga para constructos SL/LL, respectivamente); mientras tanto, el dominio VL del anticuerpo A es amplificado usando cebadores específicos (cebadores 5' contienen secuencia de revestimiento corta/larga para constructos SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones de PCR se realizan de acuerdo con técnicas y procedimientos de PCR estándar. Los dos productos de PCR son purificados con gel, y usados juntos como plantilla de

superposición para la reacción de PCR de superposición posterior, usando condiciones de PCR estándar. Los productos de PCR de superposición son subclonados en vector de expresión mamífero pBOS-hCk (Abbott) soble digerido Srf I y Not I usando enfoque de recombinación homóloga.

Ejemplo 1.4.4: Construcción y Expresión de DVD-Ig Adicionales

Ejemplo 1.4.4.1: Preparación de constructos de vector de DVD-Ig

Las secuencias de amino ácido del antibody base para anticuerpos específicos, que reconocen antígenos específicos o epítopos de los mismos, para incorporación en una DVD-Ig pueden ser obtenidas mediante preparación de hibridomas como se describió anteriormente, o pueden ser obtenidos secuenciando proteínas o ácidos nucleicos de anticuerpo conocidas. Adicionalmente, las secuencias conocidas pueden ser obtenidas de la literatura. Las secuencias se pueden usar para sintetizar ácidos nucleicos usando síntesis de ADN estándar o tecnologías de amplificación y ensamblando los fragmentos de anticuerpo deseados en vectors de expresión, usando tecnología de ADN recombinante estándar, para expresión en células.

Por ejemplo, se determinaron codondes de ácido nucleico a partir de secuencias de amino ácidos y el ADN de oligonucleótido fue sintetizado por Blue Heron Biotechnology, Inc. (www.blueheronbio.com) Bothell, WA USA. Los oligonucleótidos fueron ensamblados en fragmentos de ADN dicatenarios de 300-2,000 pares base, clonados en un vector plásmido y se verificó su secuencia. Los fragmentos clonados fueron ensamblados usando un porceso enzimático para producir el gen completo y subclonados en un vector de expresión. (Ver 7,306,914; 7,297,541; 7,279,159; 7,150,969; 20080115243; 20080102475; 20080081379; 20080075690; 20080063780; 20080050506; 20080038777; 20080022422; 20070289033; 20070287170; 20070254338; 20070243194; 20070225227; 20070207171; 20070150976; 20070135620; 20070128190; 20070104722; 20070092484; 20070037196; 20070028321; 20060172404; 20060162026; 20060153791; 20030215458; 20030157643).

Se usó un grupo de vectores pHybE (Solicitud de Patente US Serial No. 61/021,282) para clonación del anticuerpo base y DVD-Ig. V1, derivado de

pJP183; pHybE-hCg1,z,non-a V2, se usó para clonación de las cadenas pesadas de anticuerpo y DVD con una región constante de tipo salvaje. V2, derivado de pJP191; pHybE-hCk V2, se usó para clonación de las cadenas ligeras de anticuerpo y DVD con una región constante kappa. V3, derivado de pJP192; pHybE-hCl V2, se usó para clonación de cadenas ligeras de anticuerpo y DVDs con una región constante lambda. V4, construído con un peptide de señal lambda y una region constante kappa, se usó para la clonación de las cadenas ligeras de DVD con un dominio V híbrido lambda-kappa. V5, construído con un peptide de señal kappa y una region constante lambda, se usó para clonación de las cadenas ligeras de DVD con un dominio V híbrido kappa-lambda. V7, derivado de pJP183; pHybE-hCg1,z,non-a V2, se usó para clonación de las cadenas pesadas de anticuerpo y DVD con una región constante mutante (234,235 AA).

Con referencia a la Tabla 31, se usó un número de vectores en la clonación de las cadenas VH y VL de los anticuerpos base y DVD-Ig.

Tabla 31: Vectores Usados para Clonar los Anticuerpos Base y DVD-Igs

ID	Vector de cadena pesada vector	Vector de cadena ligera vector
AB001	V1	V2
AB002	V1	V2
AB003	V1	V2
AB004	V1	V2
AB005	V1	V2
AB006	V1	V2
AB007	V1	V3
AB008	V1	V2
AB009	V1	V2
AB010	V1	V3
AB011	V1	V2
AB012	V1	V2
AB013	V1	V2
AB014	V1	V2

AB015	V1	V2
AB016	V1	V2
AB033	V1	V2
AB034	V1	V2
AB035	V1	V2
AB039	V1	V2
AB047	V1	V2
AB062	V1	V2
AB063	V1	V2
AB067	V7	V3
AB069	V1	V2
AB070	V1	V2
AB071	V7	V2
AB072	V1	V2
AB073	V1	V3
AB074	V1	V2
AB075	V1	V3
AB077	V1	V2
AB079	V1	V2
AB080	V1	V2
DVD001	V1	V2
DVD002	V1	V2
DVD003	V1	V2
DVD004	V1	V2
DVD005	V1	V5
DVD006	V1	V4
DVD007	V1	V2
DVD008	V1	V2
DVD009	V1	V2
DVD010	V1	V2
DVD011	V1	V2
DVD012	V1	V2
DVD013	V1	V2
DVD014	V1	V2
DVD015	V1	V2

DVD016	V1	V2
DVD017	V1	V2
DVD018	V1	V2
DVD019	V1	V5
DVD020	V1	V4
DVD021	V1	V2
DVD022	V1	V2
DVD023	V1	V2
DVD024	V1	V2
DVD025	V1	V2
DVD026	V1	V2
DVD027	V1	V2
DVD028	V1	V2
DVD029	V1	V5
DVD030	V1	V4
DVD031	V1	V2
DVD032	V1	V2
DVD033	V1	V2
DVD034	V1	V2
DVD035	V1	V2
DVD036	V1	V2
DVD037	V1	V2
DVD038	V1	V2
DVD039	V1	V2
DVD040	V1	V2
DVD041	V1	V5
DVD042	V1	V4
DVD043	V1	V2
DVD044	V1	V2
DVD045	V1	V2
DVD046	V1	V2
DVD047	V1	V2
DVD048	V1	V2
DVD049	V1	V2
DVD050	V1	V2

DVD073	V1	V2
DVD074	V1	V2
DVD075	V1	V2
DVD076	V1	V2
DVD077	V1	V2
DVD078	V1	V2
DVD079	V1	V2
DVD080	V1	V2
DVD081	V1	V2
DVD082	V1	V2
DVD083	V1	V2
DVD084	V1	V2
DVD085	V1	V2
DVD086	V1	V2
DVD087	V1	V2
DVD088	V1	V2
DVD089	V1	V2
DVD090	V1	V2
DVD091	V1	V2
DVD092	V1	V2
DVD093	V1	V2
DVD094	V1	V2
DVD107	V1	V2
DVD108	V1	V2
DVD131	V1	V2
DVD132	V1	V2
DVD135	V1	V2
DVD136	V1	V2
DVD137	V1	V2
DVD138	V1	V2
DVD139	V1	V2
DVD140	V1	V2
DVD141	V1	V2
DVD142	V1	V2
DVD143	V1	V2

DVD144	V1	V2
DVD257	V1	V2
DVD258	V1	V2
DVD259	V1	V2
DVD260	V1	V2
DVD299	V1	V2
DVD300	V1	V2
DVD301	V1	V2
DVD302	V1	V2
DVD303	V1	V2
DVD304	V1	V2
DVD305	V1	V2
DVD306	V1	V2
DVD307	V1	V2
DVD308	V1	V2
DVD309	V1	V2
DVD310	V1	V2
DVD385	V1	V2
DVD386	V1	V2
DVD387	V7	V2
DVD388	V1	V2
DVD389	V1	V2
DVD390	V1	V2
DVD391	V7	V2
DVD392	V1	V2
DVD393	V1	V2
DVD394	V1	V2
DVD395	V1	V2
DVD396	V1	V2
DVD397	V1	V2
DVD398	V1	V2
DVD399	V1	V2
DVD400	V1	V2
DVD401	V1	V2
DVD402	V1	V2

DVD403	V1	V2
DVD404	V1	V2
DVD405	V1	V2
DVD406	V1	V2
DVD407	V1	V2
DVD408	V1	V2
DVD409	V1	V4
DVD410	V1	V5
DVD411	V1	V4
DVD412	V1	V5
DVD413	V1	V4
DVD414	V7	V5
DVD415	V1	V4
DVD416	V1	V5
DVD417	V1	V4
DVD418	V7	V5
DVD419	V1	V4
DVD420	V1	V5
DVD421	V1	V4
DVD422	V1	V5
DVD423	V1	V4
DVD424	V1	V5
DVD441	V1	V2
DVD442	V1	V2
DVD443	V1	V2
DVD444	V1	V2
DVD445	V1	V2
DVD446	V1	V2
DVD447	V1	V2
DVD448	V1	V2
DVD449	V1	V2
DVD450	V1	V2
DVD451	V7	V2
DVD452	V7	V2
DVD453	V1	V2

DVD454	V1	V2
DVD455	V1	V2
DVD456	V1	V2
DVD457	V7	V2
DVD458	V7	V2
DVD459	V1	V2
DVD460	V1	V2
DVD461	V1	V2
DVD462	V1	V2
DVD463	V1	V2
DVD464	V1	V2
DVD465	V1	V2
DVD466	V1	V2
DVD467	V1	V2
DVD468	V1	V2
DVD469	V1	V2
DVD470	V1	V2
DVD471	V7	V2
DVD472	V1	V2
DVD473	V1	V2
DVD474	V1	V2
DVD475	V1	V2
DVD476	V1	V2
DVD477	V7	V2
DVD478	V1	V2
DVD479	V1	V2
DVD480	V1	V2
DVD481	V1	V2
DVD482	V1	V2
DVD483	V1	V2
DVD484	V1	V2
DVD485	V1	V2
DVD486	V1	V2
DVD487	V1	V2
DVD488	V1	V2

DVD489	V7	V2
DVD490	V1	V2
DVD491	V1	V2
DVD492	V1	V2
DVD493	V1	V2
DVD494	V1	V2
DVD495	V1	V2
DVD496	V1	V2
DVD497	V1	V2
DVD498	V1	V2
DVD499	V1	V2
DVD500	V1	V2
DVD501	V1	V2
DVD502	V1	V2
DVD503	V1	V2
DVD504	V1	V2
DVD505	V1	V2
DVD506	V1	V2
DVD507	V7	V2
DVD508	V1	V2
DVD509	V1	V2
DVD510	V1	V2
DVD511	V1	V4
DVD512	V7	V5
DVD513	V1	V4
DVD514	V1	V5
DVD515	V1	V4
DVD516	V1	V5
DVD517	V1	V4
DVD518	V1	V5
DVD519	V1	V4
DVD520	V1	V5
DVD521	V7	V4
DVD522	V7	V5
DVD523	V1	V4

DVD524	V1	V5
DVD525	V1	V4
DVD526	V1	V5
DVD527	V1	V4
DVD528	V1	V5
DVD529	V1	V4
DVD530	V7	V5
DVD531	V1	V4
DVD532	V1	V5
DVD533	V7	V4
DVD534	V7	V5
DVD535	V1	V2
DVD536	V1	V2
DVD537	V1	V2
DVD538	V1	V2
DVD539	V1	V2
DVD540	V1	V2
DVD541	V1	V2
DVD542	V1	V2
DVD543	V1	V2
DVD544	V1	V2
DVD545	V1	V2
DVD546	V1	V2
DVD547	V1	V2
DVD548	V1	V2
DVD549	V1	V2
DVD550	V1	V2
DVD551	V1	V2
DVD552	V1	V2
DVD553	V1	V2
DVD554	V1	V2
DVD555	V1	V2
DVD556	V1	V2
DVD557	V1	V2
DVD558	V1	V2

DVD559	V1	V2
DVD560	V1	V2
DVD561	V1	V2
DVD562	V1	V2
DVD563	V1	V2
DVD564	V1	V2
DVD565	V1	V2
DVD566	V1	V2
DVD567	V1	V2
DVD568	V1	V2
DVD569	V1	V2
DVD570	V1	V2
DVD571	V1	V2
DVD572	V1	V2
DVD573	V1	V2
DVD574	V1	V2
DVD575	V1	V2
DVD576	V1	V2
DVD577	V1	V2
DVD578	V1	V2
DVD579	V1	V2
DVD580	V1	V2
DVD581	V1	V2
DVD582	V1	V2
DVD583	V1	V2
DVD584	V1	V2
DVD585	V1	V2
DVD586	V1	V2
DVD587	V1	V2
DVD588	V1	V2
DVD589	V1	V2
DVD590	V1	V2
DVD591	V1	V2
DVD592	V1	V2
DVD593	V1	V2

DVD594	V1	V2
DVD595	V1	V2
DVD596	V1	V2
DVD597	V1	V2
DVD598	V1	V2
DVD599	V1	V2
DVD600	V1	V2
DVD601	V1	V2
DVD602	V1	V2
DVD603	V1	V4
DVD604	V1	V5
DVD605	V1	V4
DVD606	V1	V5
DVD607	V1	V4
DVD608	V1	V5
DVD609	V1	V4
DVD610	V1	V5
DVD611	V1	V2
DVD612	V1	V2
DVD613	V1	V2
DVD614	V1	V2
DVD615	V1	V2
DVD616	V1	V2
DVD625	V1	V2
DVD626	V1	V2
DVD627	V1	V2
DVD628	V1	V2
DVD629	V1	V2
DVD630	V1	V2
DVD631	V1	V2
DVD632	V1	V2
DVD641	V1	V2
DVD642	V1	V2
DVD643	V1	V2
DVD644	V1	V2

DVD645	V1	V2
DVD646	V1	V2
DVD647	V1	V2
DVD648	V1	V2
DVD649	V1	V2
DVD650	V1	V2
DVD651	V1	V2
DVD652	V1	V2
DVD653	V1	V2
DVD654	V1	V2
DVD655	V1	V2
DVD656	V1	V2
DVD657	V1	V2
DVD658	V1	V2
DVD659	V1	V2
DVD660	V1	V2
DVD661	V1	V2
DVD662	V1	V2
DVD663	V1	V2
DVD664	V1	V2
DVD665	V1	V2
DVD666	V1	V2
DVD667	V1	V2
DVD668	V1	V2
DVD669	V1	V2
DVD670	V1	V2
DVD671	V1	V2
DVD672	V1	V2
DVD673	V1	V2
DVD674	V1	V2
DVD675	V1	V2
DVD676	V1	V2
DVD677	V1	V2
DVD678	V1	V2
DVD679	V1	V2

DVD680	V1	V2
DVD681	V1	V2
DVD682	V1	V2
DVD683	V1	V2
DVD684	V1	V2
DVD685	V1	V2
DVD686	V1	V2
DVD687	V1	V2
DVD688	V1	V2
DVD689	V1	V2
DVD690	V1	V2
DVD691	V1	V2
DVD692	V1	V2
DVD693	V1	V2
DVD694	V1	V2
DVD709	V1	V2
DVD710	V1	V2
DVD711	V1	V2
DVD712	V1	V2

Ejemplo 1.4.4.2: Transfección y Expresión en Células 293

Los constructos del vector de DVD-Ig son transfectados en células 293 para producción de la proteína DVD-Ig. El procedimiento de transfección transitoria de 293 usado es una modificación de los métodos publicados en Durocher et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30(2):E9 y Pham et al. (2005) Biotech. Bioengineering 90(3):332-44. Los reactivos que se usaron e la transfección incluyeron:

- Células HEK 293-6E (línea celulas de riñón embriónico humano que expresan establemente EBNA1; obtenidas de National Research Council Canada) cultivadas en frascos de Erlenmeyer desechables en un incubador humidificado ajustado a 130 rpm, 37°C y 5% de CO_2.

- Medio de Cultivo: Medio de Expresión FreeStyle 293 (Invitrogen 12338-018) más 25 µg/mL de Geneticina (G418) (Invitrogen 10131-027) y 0.1% de Plurónico F-68 (Invitrogen 24040-032).
- Medio de Transfección: Medio de Expresión FreeStyle 293 más HEPES 10 mM (Invitrogen 15630-080).
- Patrón de Polietilenimina (PEI): 1 mg/mL de solución patron estéril, pH 7.0, preparada con PEI lineal de 25 kDa (Polysciences) y almacenado a menos de -15°C.
- Medio de Alimentación de Triptona: 5% p/v de patrón estéril de Triptona N1 (Organotechnie, 19554) en Medio de Expresión FreeStyle 293.

Preparación Celular para trasnfección: Aproximadamente 2 - 4 horas antes de la transfección, las células HEK 293-6E son recolectadas mediante centrifugación y resuspendidas en medio de cultivo a una densidad celular de aproximadamente 1 millón de células viables por mL. Para cada transfección se trasnfieren 40 mL de la suspensión celular en un frasco Erlenmeyer de 250-mL desechable, y se incuban por 2 - 4 horas.

Transfección: El medio de transfección y el patrón de PEI son precalentados hasta temperatura ambiente (TA). Para cada transfección, se combinan 25µg de ADN plásmido y 50µg de polietilenimina (PEI) en 5 mL de medio de transfección y se incuban por 15 – 20 minutos a TA para permitir que se formen los complejos ADN:PEI. Para las transfecciones de BR3-Ig, se usan 25µg de plásmido de BR3-Ig por transfección. Cada 5-mL de mezcla de complejo ADN:PEI se agregan a un cultivo de 40-mL previamente preparado y se devuelven al incubador humidificado ajustado a 130 rpm, 37°C y 5% de CO_2. Después de 20-28 horas, se agregan 5 mL de Medio de Alimentación de Triptona a cada transfección y los cultivos se continuan por seis días.

La Tabla 32 contiene los datos de producción para constructos de anticuerpos base o DVD-Ig expresados como miligramos por litro en células 293.

Tabla 32: Expresión transitoria en Producción de Constructos de Anticuerpos Base y DVD-Ig en Células 293

Anticuerpo Base o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-terminal (VD)	Dominio Variable C-terminal (VD)	Producción de Expresión (mg/L)
AB006	CD-19		9.4
AB001	CD-20		90.2
DVD001	CD-20	CD-19	5.8
DVD002	CD-19	CD-20	2.4
AB001	CD-20		90.2
AB002	CD-3		67.2
DVD003	CD-20	CD-3	4.2
DVD004	CD-3	CD-20	7.4
AB007	CD-80		9.6
AB001	CD-20		90.2
DVD005	CD-20	CD-80	35.4
DVD006	CD-80	CD-20	43.4
AB008	CD-22		50
AB001	CD-20		90.2
DVD007	CD-20	CD-22	0.8
DVD008	CD-22	CD-20	0.22
AB009	CD-40		36.6
AB001	CD-20		90.2
DVD009	CD-20	CD-40	2.6
DVD010	CD-40	CD-20	8
AB002	CD-3		67.2
AB004	HER-2		108.2
DVD011	CD-3	HER-2	30.6
DVD012	HER-2	CD-3	74
AB002	CD-3		67.2
AB006	CD-19		9.4
DVD013	CD-3	CD-19	12.4
DVD014	CD-19	CD-3	7.2
AB033	EGFR		44.4
AB004	HER-2		108.2
DVD015	EGFR	HER-2	42.2
DVD016	HER-2	EGFR	17
AB002	CD-3		67.2
AB033	EGFR		44.4

DVD017	EGFR	CD-3	9.6
DVD018	CD-3	EGFR	4
AB033	EGFR		44.4
AB011	IGF1R		28.5
DVD021	EGFR	IGF1R	10.4
DVD022	IGF1R	EGFR	17.8
AB005	RON		67.4
AB033	EGFR		44.4
DVD024	RON	EGFR	19.2
DVD023	EGFR	RON	17.8
AB033	EGFR		44.4
AB012	HGF		22.8
DVD025	EGFR	HGF	5.8
DVD026	HGF	EGFR	2.2
AB004	HER-2		108.2
AB010	IGF1,2		38.6
DVD029	HER-2	IGF1,2	74.4
DVD030	IGF1,2	HER-2	26.8
AB004	HER-2		108.2
AB011	IGF1R		28.5
DVD031	HER-2	IGF1R	95
DVD032	IGF1R	HER-2	41.4
AB005	RON		67.4
AB012	HGF		22.8
DVD033	RON	HGF	29.4
DVD034	HGF	RON	7.8
AB014	VEGF		52.4
AB033	EGFR		44.4
DVD035	VEGF	EGFR	6.4
DVD036	EGFR	VEGF	5.4
AB014	VEGF		52.4
AB004	HER-2		108.2
DVD037	VEGF	HER-2	43.4
DVD038	HER-2	VEGF	41.2
AB001	CD-20		57
AB014	VEGF		52.4
DVD039	VEGF	CD-20	0.22
DVD040	CD-20	VEGF	0.48
AB014	VEGF		52.4

AB010	IGF1,2		38.6
DVD041	VEGF	IGF1,2	39.4
DVD042	IGF1,2	VEGF	8.8
AB015	DLL-4		57.6
AB014	VEGF		52.4
DVD044	DLL4	VEGF	5.4
DVD043	VEGF	DLL4	17.4
AB014	VEGF		52.4
AB012	HGF		22.8
DVD045	VEGF	HGF	4
DVD046	HGF	VEGF	1.4
AB005	RON		67.4
AB014	VEGF		52.4
DVD048	RON	VEGF	14
DVD047	VEGF	RON	18
AB014	VEGF		52.4
AB016	NRP1		114.6
DVD049	VEGF	NRP1	13
DVD050	NRP1	VEGF	27.2
AB015	DLL-4		57.6
AB047	PIGF		23.6
DVD257	DLL4	PIGF	31.2
DVD258	PIGF	DLL4	21
AB014	VEGF		52.4
AB047	PIGF		23.6
DVD259	VEGF	PIGF	2.2
DVD260	PIGF	VEGF	7.8
AB062	ErbB3		24.6
AB033	EGFR		44.4
DVD299	ErbB3	EGFR	4.2
DVD300	EGFR	ErbB3	1.6
AB063	ErbB3		37.8
AB033	EGFR		44.4
DVD305	ErbB3	EGFR	5.6
DVD306	EGFR	ErbB3	11.2

Todos los DVDs se expresaron bien en células 293. Los DVDs podrían ser fácilmente purificados sobre una columna de proteína A. En la mayoría de

los casos se puedieron obtener >5 mg/L de DVD-Ig purificada fácilmente de los sobrenadantes de células 293.

Ejemplo 1.4.5: Caracterización y selección de avance de DVD-Igs A/B

Las afinidades de unión de las DVD-Igs anti-A/B son analizadas en Biacore contra proteína A A y proteína B. La propiedad tetravalente de las DVD-Ig es examinada mediante estudios de unión múltiple en Biacore. Mientras tanto, se evalua la potencia de neutralización de las DVD-Igs para proteína A y proteína B mediante bioensayos, respectivamente, como se describe aquí. Las moléculas de DVD-Ig que major retienen la afinidad y potencia de los mAbs base originales son seleccionadas para caracterizaciones fisicoquímicas y bio-analíticas a profundidad (rat PK) como se describe aquí para cada mAb. Con base en la recolécción de análisis, la DVD-Ig de avance final a desarrollo de línea celular estable de CHO, y el material derivado de CHO es empleado en estudios de estabilidad, farmacocinética y eficacia en monos cynomolgus, y actividades de preformulación.

Ejemplo 2: Generación y Caracterización de Inmunoglobulinas de Dominio Variable Dual (DVD-Ig)

Se generaron inmunoglobulinas de dominio variable dual (DVD-Ig) que usan anticuerpos base con secuencias de amino ácido conocidas mediante la síntesis de fragmentos de polinucleótido que codifican las secuencias de cadena pesada variable de DVD-Ig y ligera variable de DVD-Ig y clonación de los fragmentos en un vector pHybC-D2 de acuerdo con el Ejemplo 1.4.4.1. Los constructos de DVD-Ig fueron clonados y expresados en células 293 como se describe en el Ejemplo 1.4.4.2. La proteína de DVD-Ig fue purificada de acuerdo con métodos estándar. Se determinaron las características funcionales de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1.1.1 y 1.1.2 como se indicó. Las cadenas VH y VL de DVD-Ig par alas DVD-Igs de la invención se proveen a continuación.

Ejemplo 2.1: Generación de DVD-IGs CD-20 y CD-19

Tabla 33

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
99	DVD001H	AB001VH	AB006VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMH WVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATL TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGD WYFNVWGAGTTVTVSA**ASTKGP**QVQLQQSGAELVR PGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWI GQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQL SSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGT SVTVSS
100	DVD001L	AB001VL	AB006VL	QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASSSVSYIHWF QQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSY SLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEI KR**TVAAP**DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQS VDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIP PRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTED PWTFGGGTKLEIKR
101	DVD002H	AB006VH	AB001VH	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMN WVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATL TADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVG RYYYAMDYWGQGTSVTVSS**ASTKGP**QVQLQQPGAE LVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGL EWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGT TVTVSA
102	DVD002L	AB006VL	AB001VL	DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDS YLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSG SGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGG TKLEIKR**TVAAP**QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTC RASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVP VRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSN PPTFGGGTKLEIKR

Example 2.2: Generación de DVD-Igs de CD-20 y CD-3 (seq. 1)

Tabla 34

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
103	DVD003H	AB001VH	AB002VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMH WVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATL TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGD WYFNVWGAGTTVTVSA**ASTKGP**QVQLQQSGAELAR PGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWI GYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVS S
104	DVD003L	AB001VL	AB002VL	QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASSSVSYIHWF QQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSY SLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEI KR**TVAAP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSS VSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSG SGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFG SGTKLEINR
105	DVD004H	AB002VH	AB001VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**QVQLQQPGAELVKPG ASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGA IYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS A
106	DVD004L	AB002VL	AB001VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSY SLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEI NR**TVAAP**QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASSS VSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSG SGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFG GGTKLEIKR

Ejemplo 2.3: Generación de DVD-Igs de CD-20 y CD-80

Tabla 35

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
107	DVD005H	AB001VH	AB007VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMH WVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATL TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGD WYFNVWGAGTTVTVSA**ASTKGP**QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCAVSGGSISGGYGWGWIRQPPGKGLEW IGSFYSSSGNTYYNPSLKSQVTISTDTSKNQFSLK LNSMTAADTAVYYCVRDRLFSVVGMVYNNWFDVWG PGVLVTVSS
108	DVD005L	AB001VL	AB007VL	QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASSSVSYIHWF QQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSY SLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEI KR**TVAAP**ESALTQPPSVSGAPGQKVTISCTGSTSN IGGYDLHWYQQLPGTAPKLLIYDINKRPSGISDRF SGSKSGTAASLAITGLQTEDEADYYCQSYDSSLNA QVFGGGTRLTVLG
109	DVD006H	AB007VH	AB001VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGGSISGGYGW GWIRQPPGKGLEWIGSFYSSSGNTYYNPSLKSQVT ISTDTSKNQFSLKLNSMTAADTAVYYCVRDRLFSV VGMVYNNWFDVWGPGVLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQP GAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG RGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWG AGTTVTVSA
110	DVD006L	AB007VL	AB001VL	ESALTQPPSVSGAPGQKVTISCTGSTSNIGGYDLH WYQQLPGTAPKLLIYDINKRPSGISDRFSGSKSGT AASLAITGLQTEDEADYYCQSYDSSLNAQVFGGGT RLTVLG**QPKAAP**QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTC RASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVP VRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSN PPTFGGGTKLEIKR

Ejemplo 2.4: Generación de DVD-Igs de CD-20 y CD-22

Tabla 36

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
111	DVD007H	AB001VH	AB008VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMH WVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATL TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGD WYFNVWGAGTTVTVSA**ASTKGP**QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCKASGYTFTSYWLHWVRQAPGQGLEWI GYINPRNDYTEYNQNFKDKATITADESTNTAYMEL SSLRSEDTAFYFCARRDITTFYWGQGTTVTVSS
112	DVD007L	AB001VL	AB008VL	QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASSSVSYIHWF QQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSY SLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEI KR**TVAAP**DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMSCKSSQS VLYSANHKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCHQYL SSWTFGGGTKLEIKR
113	DVD008H	AB008VH	AB001VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWLH WVRQAPGQGLEWIGYINPRNDYTEYNQNFKDKATI TADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFCARRDITTFY WGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLQQPGAELVKPGASV KMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYP GNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTS EDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA
114	DVD008L	AB008VL	AB001VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMSCKSSQSVLYSANH KNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSG SGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCHQYLSSWTFGG GTKLEIKR**TVAAP**QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMT CRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGV PVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTS NPPTFGGGTKLEIKR

Ejemplo 2.5: Generación de DVD-Igs de CD-20 y CD-40

Tabla 37

SEQ ID No.	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
115	DVD009H	AB001VH	AB009VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMH WVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATL TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGD WYFNVWGAGTTVTVSA**ASTKGP**QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYEESNRYHADSVKGRFTISRDNSKITLYLQM NSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTV SS
116	DVD009L	AB001VL	AB009VL	QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASSSVSYIHWF QQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSY SLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEI KRTVAAPDIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQS LLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQ TPFTFGPGTKVDIRR
117	DVD010H	AB009VH	AB001VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRFTI SRDNSKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAP GPDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQPGAELVKP GASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIG AIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTV SA
118	DVD010L	AB009VL	AB001VL	DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGY NYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGP GTKVDIRR**TVAAP**QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMT CRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGV PVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTS NPPTFGGGTKLEIKR

Ejemplo 2.6: Generación de DVD-Igs de CD-3 (seq. 1) y HER-2 (seq. 1)

Tabla 38

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
119	DVD011H	AB002VH	AB004VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
120	DVD011L	AB002VL	AB004VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSY SLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEI NR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQD VNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF GQGTKVEIKR
121	DVD012H	AB004VH	AB002VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELARP GASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIG YINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
122	DVD012L	AB004VL	AB002VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASS SVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFS GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTF GSGTKLEINR

Ejemplo 2.7: Generación de DVD-Igs de CD-3 (seq. 1) y CD-19

Tabla 39

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
123	DVD013H	AB002VH	AB006VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELVRPG SSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQ IWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSS LASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSV TVSS
124	DVD013L	AB002VL	AB006VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSY SLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEI NR**TVAAP**DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQS VDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIP PRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTED PWTFGGGTKLEIKR
125	DVD014H	AB006VH	AB002VH	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMN WVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATL TADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVG RYYYAMDYWGQGTSVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAE LARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGL EWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTL TVSS
126	DVD014L	AB006VL	AB002VL	DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDS YLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSG SGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGG TKLEIKR**TVAAP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC RASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVP YRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSN PLTFGSGTKLEINR

Ejemplo 2.8: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y HER-2 (seq. 1)

Tabla 40

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
127	DVD015H	AB033VH	AB004VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
128	DVD015L	AB033VL	AB004VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT FGQGTKVEIKR
129	DVD016H	AB004VH	AB033VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQP SQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNS LQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
130	DVD016L	AB004VL	AB033VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKR

Ejemplo 2.9: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y CD-3 (seq. 1)

Tabla 41

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
131	DVD017H	AB033VH	AB002VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLQQSGAELARPG ASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGY INPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
132	DVD017L	VD033VL	AB002VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASS SVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFS GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTF GSGTKLEINR
133	DVD018H	AB002VH	AB033VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPS QSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGV IWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSL QSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
134	DVD018L	AB002VL	AB033VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSY SLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEI NR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQS IGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFS GSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTF GAGTKLELKR

Ejemplo 2.10: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) e IGF1,2

Tabla 42

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
135	DVD019H	AB033VH	AB010VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGW MNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSS LRSEDTAVYYCARDPYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
136	DVD019L	AB033VL	AB010VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSS NIENNHVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDR FSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCETWDTSLS AGRVFGGGTKLTVLG
137	DVD020H	AB010VH	AB033VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDIN WVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTM TRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPYYYYY GMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQP SQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNS LQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
138	DVD020L	AB010VL	AB033VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIENNHVS WYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTGDEADYYCETWDTSLSAGRVFGGG TKLTVLG**QPKAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFS CRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISG IPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNN NWPTTFGAGTKLELKR

Ejemplo 2.11: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) con Conjunto de Enlazante 1

Tabla 43

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
139	DVD021H	AB033VH	AB011VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDNSRTTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMDVWGQGTT VTVSS
140	DVD021L	AB033VL	AB011VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCS FGQGTKLEIKR
141	DVD022H	AB011VH	AB033VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTI SRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGP GLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKG LEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVF FKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTL VTVSA
142	DVD022L	AB011VL	AB033VL	DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFGQGTKLE IKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKR

Ejemplo 2.12: Generación de DVD-Igs EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 44

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
143	DVD611H	AB011VH	AB033VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTI SRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QV QLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWV RQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFA YWGQGTLVTVSA
144	DVD611L	AB011VL	AB033VL	DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFGQGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKR
145	DVD612H	AB033VH	AB011VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLESG GGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDNSRTT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMD VWGQGTTVTVSS
146	DVD612L	AB033VL	AB011VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQFPSSLSASVGDRVT ITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLH RGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQ HNSYPCSFGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.13: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 45

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
147	DVD613H	AB011VH	AB033VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTI SRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QV QLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWV RQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFA YWGQGTLVTVSA
148	DVD613L	AB011VL	AB033VL	DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFGQGTKLE IKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKR
149	DVD614H	AB033VH	AB011VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLESG GGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDNSRTT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMD VWGQGTTVTVSS
150	DVD614L	AB033VL	AB011VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCS FGQGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.14: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 1) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 46

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
151	DVD615H	AB011VH	AB033VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTI SRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGP GLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKG LEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVF FKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTL VTVSA
152	DVD615L	AB011VL	AB033VL	DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFGQGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKR
153	DVD616H	AB033VH	AB011VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDNSRTTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMDVWGQGTT VTVSS
154	DVD616L	AB033VL	AB011VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQFPSSLSASVGDRVT ITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLH RGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQ HNSYPCSFGQGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.15: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 47

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
155	DVD603H	AB075VH	AB033VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAPLRFLE WSTQDHYYYYYMDVWGKGTTVTVSS**ASTKGP**QVQL KQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQ SPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNS KSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYW GQGTLVTVSA
156	DVD603L	AB075VL	AB033VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYATWY QQKPGQAPILVIYGENKRPSGIPDRFSGSSSGNTA SLTITGAQAEDEADYYCKSRDGSGQHLVFGGGTKL TVLG**QPKAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRA SQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPS RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWP TTFGAGTKLELKR
157	DVD604H	AB033VH	AB075VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARAPLRFLEWSTQDHYYYYYMDVW GKGTTVTVSS
158	DVD604L	AB033VL	AB075VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSL RSYYATWYQQKPGQAPILVIYGENKRPSGIPDRFS GSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDGSGQHL VFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.16: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 48

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
159	DVD605H	AB075VH	AB033VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAPLRFLE WSTQDHYYYYYMDVWGKGTTVTVSS**ASTKGP**SVFP LAPQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNY GVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRL SINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYY DYEFAYWGQGTLVTVSA
160	DVD605L	AB075VL	AB033VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYATWY QQKPGQAPILVIYGENKRPSGIPDRFSGSSSGNTA SLTITGAQAEDEADYYCKSRDGSGQHLVFGGGTKL TVLG**QPKAAPSVTLFPP**DILLTQSPVILSVSPGER VSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASE SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QQNNNWPTTFGAGTKLELKR
161	DVD606H	AB033VH	AB075VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVQSG AEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARAPLRFLEWSTQDHYY YYYMDVWGKGTTVTVSS
162	DVD606L	AB033VL	AB075VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**SSELTQDPAVSVALGQTVRI TCQGDSLRSYYATWYQQKPGQAPILVIYGENKRPS GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSR DGSGQHLVFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.17: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 49

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
163	DVD607H	AB075VH	AB033VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAPLRFLE WSTQDHYYYYYMDVWGKGTTVTVSS**ASTKGPSVFP LAP**QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNY GVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRL SINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYY DYEFAYWGQGTLVTVSA
164	DVD607L	AB075VL	AB033VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYATWY QQKPGQAPILVIYGENKRPSGIPDRFSGSSSGNTA SLTITGAQAEDEADYYCKSRDGSGQHLVFGGGTKL TVLG**QPKAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRA SQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPS RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWP TTFGAGTKLELKR
165	DVD608H	AB033VH	AB075VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVQSG AEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARAPLRFLEWSTQDHYY YYYMDVWGKGTTVTVSS
166	DVD608L	AB033VL	AB075VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSL RSYYATWYQQKPGQAPILVIYGENKRPSGIPDRFS GSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDGSGQHL VFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.18: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 50

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
167	DVD609H	AB075VH	AB033VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAPLRFLE WSTQDHYYYYYMDVWGKGTTVTVSS**ASTKGP**QVQL KQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQ SPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNS KSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYW GQGTLVTVSA
168	DVD609L	AB075VL	AB033VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYATWY QQKPGQAPILVIYGENKRPSGIPDRFSGSSSGNTA SLTITGAQAEDEADYYCKSRDGSGQHLVFGGGTKL TVLG**QPKAAPSVTLFPP**DILLTQSPVILSVSPGER VSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASE SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QQNNNWPTTFGAGTKLELKR
169	DVD610H	AB033VH	AB075VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARAPLRFLEWSTQDHYYYYYMDVW GKGTTVTVSS
170	DVD610L	AB033VL	AB075VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**SSELTQDPAVSVALGQTVRI TCQGDSLRSYYATWYQQKPGQAPILVIYGENKRPS GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSR DGSGQHLVFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.19: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 51

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
171	DVD625H	AB077VH	AB033VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMH WVRQAPGKGLEWISVIDTRGATYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGNFYYGM DVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPSQ SLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI WSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQ SNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
172	DVD625L	AB077VL	AB033VL	EIVLTQSPGTLSVSPGERATLSCRASQSIGSSLHW YQQKPGQAPRLLIKYASQSLSGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCHQSSRLPHTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKR
173	DVD626H	AB033VH	AB077VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLVQSGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSSFAMHWVRQAPGKGLEWISV IDTRGATYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARLGNFYYGMDVWGQGTTVTVSS
174	DVD626L	AB033VL	AB077VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**EIVLTQSPGTLSVSPGERATLSCRASQ SIGSSLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSLSGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQSSRLPHT FGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.20: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 52

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
175	DVD627H	AB077VH	AB033VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMH WVRQAPGKGLEWISVIDTRGATYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGNFYYGM DVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQSGP GLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKG LEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVF FKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTL VTVSA
176	DVD627L	AB077VL	AB033VL	EIVLTQSPGTLSVSPGERATLSCRASQSIGSSLHW YQQKPGQAPRLLIKYASQSLSGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCHQSSRLPHTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKR
177	DVD628H	AB033VH	AB077VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVQSG GGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMHWVRQAPGK GLEWISVIDTRGATYYADSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARLGNFYYGMDVWGQGTT VTVSS
178	DVD628L	AB033VL	AB077VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**EIVLTQSPGTLSVSPGERAT LSCRASQSIGSSLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSL SGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQ SSRLPHTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.21: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 53

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
179	DVD629H	AB077VH	AB033VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMH WVRQAPGKGLEWISVIDTRGATYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGNFYYGM DVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQSGP GLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKG LEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVF FKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTL VTVSA
180	DVD629L	AB077VL	AB033VL	EIVLTQSPGTLSVSPGERATLSCRASQSIGSSLHW YQQKPGQAPRLLIKYASQSLSGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCHQSSRLPHTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKR
181	DVD630H	AB033VH	AB077VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVQSG GGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMHWVRQAPGK GLEWISVIDTRGATYYADSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARLGNFYYGMDVWGQGTT VTVSS
182	DVD630L	AB033VL	AB077VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**EIVLTQSPGTLSVSPGERATLSCRASQ SIGSSLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSLSGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQSSRLPHT FGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.22: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) e IGF1R (seq. 3) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 54

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
183	DVD631H	AB077VH	AB033VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMH WVRQAPGKGLEWISVIDTRGATYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGNFYYGM DVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPSQ SLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI WSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQ SNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
184	DVD631L	AB077VL	AB033VL	EIVLTQSPGTLSVSPGERATLSCRASQSIGSSLHW YQQKPGQAPRLLIKYASQSLSGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCHQSSRLPHTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKR
185	DVD632H	AB033VH	AB077VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLVQSGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSSFAMHWVRQAPGKGLEWISV IDTRGATYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARLGNFYYGMDVWGQGTTVTVSS
186	DVD632L	AB033VL	AB077VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**EIVLTQSPGTLSVSPGERAT LSCRASQSIGSSLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQSL SGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQ SSRLPHTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.23: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 55

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
187	DVD023H	AB033VH	AB005VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLVQSGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAV ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGMDVWGQGTTV TVSS
188	DVD023L	AB033VL	AB005VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQ SLLHSNGFNYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL QTPPWTFGQGTKVEIRR
189	DVD024H	AB005VH	AB033VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNN YYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPG LVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGL EWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFF KMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLV TVSA
190	DVD024L	AB005VL	AB033VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKVEIRR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSF SCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESIS GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQN NNWPTTFGAGTKLELKR

Ejemplo 2.24: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 56

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
191	DVD535H	AB005VH	AB033VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNN YYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQ LKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDN SKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAY WGQGTLVTVSA
192	DVD535L	AB005VL	AB033VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKVEIRR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVS PGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIA DYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR
193	DVD536H	AB033VH	AB005VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVQSG GGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGMDV WGQGTTVTVSS
194	DVD536L	AB033VL	AB005VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPAS ISCRSSQSLLHSNGFNYVDWYLQKPGQSPHLLIYF GSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQALQTPPWTFGQGTKVEIRR

Ejemplo 2.25: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y RON (seq. 1) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 57

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
195	DVD537H	AB005VH	AB033VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNN YYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQ LKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDN SKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAY WGQGTLVTVSA
196	DVD537L	AB005VL	AB033VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKVEIRR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSF SCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESIS GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQN NNWPTTFGAGTKLELKR
197	DVD538H	AB033VH	AB005VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVS**AASTKGPSVFPLAP**EVQLVQSG GGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGMDV WGQGTTVTVSS
198	DVD538L	AB033VL	AB005VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQ SLLHSNGFNYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL QTPPWTFGQGTKVEIRR

Ejemplo 2.26: Generación de EGFR DVD-Igs de (seq. 2) y RON (seq. 1) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 58

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
199	DVD539H	AB005VH	AB033VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNN YYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPG LVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGL EWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFF KMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLV TVSA
200	DVD539L	AB005VL	AB033VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKVEIRR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVS PGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIA DYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR
201	DVD540H	AB033VH	AB005VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLVQSGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAV ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGMDVWGQGTTV TVSS
202	DVD540L	AB033VL	AB005VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPAS ISCRSSQSLLHSNGFNYVDWYLQKPGQSPHLLIYF GSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQALQTPPWTFGQGTKVEIRR

Ejemplo 2.27: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y HGF (seq. 1)

Tabla 59

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
203	DVD025H	AB033VH	AB012VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLVESGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSY ISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGTLVTV SS
204	DVD025L	AB033VL	AB012VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRF GGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWT FGQGTKVEIKR
205	DVD026H	AB012VH	AB033VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLV QPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEW LGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKM NSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTV SA
206	DVD026L	AB012VL	AB033VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKR

Ejemplo 2.28: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y c-MET

Tabla 60

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
207	DVD027H	AB033VH	AB013VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLQQSGPELVRPG ASVKWSCPASGYTFTSYWLHWVKKQRPGQGLEWIG MIDPSNSDTRFNPPNFKDKATLNVDRSSNTAYNLL SSLTSADSAVYYCATYGSYVSPLDYWGQGTSVYVS S
208	DVD027L	AB033VL	AB013VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIMMSQSPSSLTVSVGEKVTVSCKSSQ SLLVTSSQKNYLAWYQQKPQQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTITSVKADDLAVYYCQQY YAYPWTFGDGTKLEIKR
209	DVD028H	AB013VH	AB033VH	QVQLQQSGPELVRPGASVKWSCPASGYTFTSYWLH WVKKQRPGQGLEWIGMIDPSNSDTRFNPPNFKDKA TLNVDRSSNTAYNLLSSLTSADSAVYYCATYGSYV SPLDYWGQGTSVYVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQ PSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWL GVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMN SLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVS A
210	DVD028L	AB013VL	AB033VL	DIMMSQSPSSLTVSVGEKVTVSCKSSQSLLVTSSQ KNYLAWYQQKPQQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTITSVKADDLAVYYCQQYYAYPWTFG DGTKLEIKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSF SCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESIS GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQN NNWPTTFGAGTKLELKR

Ejemplo 2.29: Generación de DVD-Igs de HER-2 (seq. 1) e IGF1,2

Tabla 61

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
211	DVD029H	AB004VH	AB010VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMG WMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELS SLRSEDTAVYYCARDPYYYYYGMDVWGQGTTVTVS S
212	DVD029L	AB004VL	AB010VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSS NIENNHVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDR FSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCETWDTSLS AGRVFGGGTKLTVLG
213	DVD030H	AB010VH	AB004VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDIN WVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTM TRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPYYYYY GMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS S
214	DVD030L	AB010VL	AB004VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIENNHVS WYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTGDEADYYCETWDTSLSAGRVFGGG TKLTVLG**QPKAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.30: Generación de DVD-Igs de HER-2 (seq. 1) e IGF1R

Tabla 62

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
215	DVD031H	AB004VH	AB011VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDNSRTTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMDVWGQGT TVTVSS
216	DVD031L	AB004VL	AB011VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCS FGQGTKLEIKR
217	DVD032H	AB011VH	AB004VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTI SRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG LEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSS
218	DVD032L	AB011VL	AB004VL	DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFGQGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT FGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.31: Generación de DVD-Igs de RON (seq. 1) y HGF(seq. 1)

Tabla 63

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
219	DVD033H	AB005VH	AB012VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNN YYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGG LVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGL EWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQG TLVTVSS
220	DVD033L	AB005VL	AB012VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKVEIRR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTI TCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQS GVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQA NGFPWTFGQGTKVEIKR
221	DVD034H	AB012VH	AB005VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGGGLV KPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEW VAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGMDVWGQG TTVTVSS
222	DVD034L	AB012VL	AB005VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQ SLLHSNGFNYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL QTPPWTFGQGTKVEIRR

Ejemplo 2.32: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y EGFR (seq. 2)

Tabla 64

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 123456789012345678901234567890123 45
223	DVD035H	AB014VH	AB033VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGL VQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFK MNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVT VSA
224	DVD035L	AB014VL	AB033VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKR
225	DVD036H	AB033VH	AB014VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGW INTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNS LRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVT VSS
226	DVD036L	AB033VL	AB014VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.33: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y HER-2 (seq. 1)

Tabla 65

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
227	DVD037H	AB014VH	AB004VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLV TVSS
228	DVD037L	AB014VL	AB004VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT FGQGTKVEIKR
229	DVD038H	AB004VH	AB014VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVG WINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLV TVSS
230	DVD038L	AB004VL	AB014VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.34: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y CD-20

Tabla 66

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
231	DVD039H	AB014VH	AB001VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQPGAEL VKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSA
232	DVD039L	AB014VL	AB001VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASS SVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFS GSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTF GGGTKLEIKR
233	DVD040H	AB001VH	AB014VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMH WVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATL TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGD WYFNVWGAGTTVTVSA**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWV GWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTL VTVSS
234	DVD040L	AB001VL	AB014VL	QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASSSVSYIHWF QQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSY SLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEI KR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQD ISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTF GQGTKVEIKR

Ejemplo 2.35: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) e IGF1,2

Tabla 67

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
235	DVD041H	AB014VH	AB010VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLE WMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARDPYYYYYGMDVWGQGTTV TVSS
236	DVD041L	AB014VL	AB010VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSS NIENNHVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDR FSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCETWDTSLS AGRVFGGGTKLTVLG
237	DVD042H	AB010VH	AB014VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDIN WVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTM TRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPYYYYY GMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVG WINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLV TVSS
238	DVD042L	AB010VL	AB014VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIENNHVS WYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTGDEADYYCETWDTSLSAGRVFGGG TKLTVLG**QPKAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYS TVPWTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.36: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 1)

Tabla 68

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
239	DVD043H	AB014VH	AB015VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLE WVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLVTV SS
240	DVD043L	AB014VL	AB015VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTV TFGQGTKVEIKR
241	DVD044H	AB015VH	AB014VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWI NTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSL RAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTV SS
242	DVD044L	AB015VL	AB014VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS QDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPW TFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.37: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 69

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
243	DVD045H	AB014VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLE WVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGT LVTVSS
244	DVD045L	AB014VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRF GGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWT FGQGTKVEIKR
245	DVD046H	AB012VH	AB014VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEW VGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGT LVTVSS
246	DVD046L	AB012VL	AB014VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.38: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 70

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
247	DVD641H	AB012VH	AB014VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQA PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTS KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYF DVWGQGTLVTVSS
248	DVD641L	AB012VL	AB014VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR
249	DVD642H	AB014VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQL VESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQ APGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLF DYWGQGTLVTVSS
250	DVD642L	AB014VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQ SGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANGFPWTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.39: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 71

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
251	DVD647H	AB012VH	AB014VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQA PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTS KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYF DVWGQGTLVTVSS
252	DVD647L	AB012VL	AB014VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
253	DVD648H	AB014VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQL VESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQ APGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLF DYWGQGTLVTVSS
254	DVD648L	AB014VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRF GGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWT FGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.40: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y HGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 72

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
255	DVD653H	AB012VH	AB014VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEW VGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGT LVTVSS
256	DVD653L	AB012VL	AB014VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR
257	DVD654H	AB014VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLE WVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGT LVTVSS
258	DVD654L	AB014VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQ SGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANGFPWTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.41: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y RON (seq. 1)

Tabla 73

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
259	DVD047H	AB014VL	AB005VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLE WVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
260	DVD047L	AB014VH	AB005VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQ SLLHSNGFNYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL QTPPWTFGQGTKVEIRR
261	DVD048H	AB005VH	AB014VL	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNN YYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQ GTLVTVSS
262	DVD048L	AB005VL	AB014VH	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKVEIRR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQY STVPWTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.42: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y NRP1 (seq. 1)

Tabla 74

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
263	DVD049H	AB014VH	AB016VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPISWVRQAPGKGLE WVSSITGKNGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARWGKKVYGMDVWGQGTLVT VSS
264	DVD049L	AB014VL	AB016VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ SISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYMSVPIT FGQGTKVEIKR
265	DVD050H	AB016VH	AB014VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPIS WVRQAPGKGLEWVSSITGKNGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGKKVYG MDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGW INTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNS LRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVT VSS
266	DVD050L	AB016VL	AB014VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLAW YQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYMSVPITFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.43: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 1) y RON (seq. 2)

Tabla 75

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
267	DVD073H	AB034VH	AB012VH	QVQLQESGPGLVKPSEILSLTCTVSGGSISSHYWS WVRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARIPNYYDRS GYYPGYWYFDLWGRGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVES GGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPG KGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYW GQGTLVTVSS
268	DVD073L	AB034VL	AB012VL	QAVLTQPSSLSAPPGASASLTCTLRSGFNVDSYRI SWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVPSRFSG SKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSSAWV FGGGTKLTVLR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRV TITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSL QSGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QANGFPWTFGQGTKVEIKR
269	DVD074H	AB012VH	AB034VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLV KPSEILSLTCTVSGGSISSHYWSWVRQPPGKGLEW IGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLNL SSVTAADTAVYYCARIPNYYDRSGYYPGYWYFDLW GRGTLVTVSS
270	DVD074L	AB012VL	AB034VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QAVLTQPSSLSAPPGASASLTCTLRSG FNVDSYRISWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGS GVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCM IWHSSAWVFGGGTKLTVLR

Ejemplo 2.44: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y RON (seq. 2)

Tabla 76

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
271	DVD075H	AB034VH	AB033VH	QVQLQESGPGLVKPSEILSLTCTVSGGSISSHYWS WVRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARIPNYYDRS GYYPGYWYFDLWGRGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQS GPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPG KGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQ VFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQG TLVTVSA
272	DVD075L	AB034VL	AB033VL	QAVLTQPSSLSAPPGASASLTCTLRSGFNVDSYRI SWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVPSRFSG SKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSSAWV FGGGTKLTVLR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERV SFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASES ISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQ QNNNWPTTFGAGTKLELKR
273	DVD076H	AB033VH	AB034VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPS EILSLTCTVSGGSISSHYWSWVRQPPGKGLEWIGY IYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLNLSSV TAADTAVYYCARIPNYYDRSGYYPGYWYFDLWGRG TLVTVSS
274	DVD076L	AB033VL	AB034VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**QAVLTQPSSLSAPPGASASLTCTLRSG FNVDSYRISWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGS GVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCM IWHSSAWVFGGGTKLTVLR

Ejemplo 2.45: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y RON (seq. 2)

Tabla 77

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
275	DVD077H	AB034VH	AB014VH	QVQLQESGPGLVKPSEILSLTCTVSGGSISSHYWS WVRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARIPNYYDRS GYYPGYWYFDLWGRGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPG KGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKS TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDV WGQGTLVTVSS
276	DVD077L	AB034VL	AB014VL	QAVLTQPSSLSAPPGASASLTCTLRSGFNVDSYRI SWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVPSRFSG SKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSSAWV FGGGTKLTVLR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QYSTVPWTFGQGTKVEIKR
277	DVD078H	AB014VH	AB034VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGL VKPSEILSLTCTVSGGSISSHYWSWVRQPPGKGLE WIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLN LSSVTAADTAVYYCARIPNYYDRSGYYPGYWYFDL WGRGTLVTVSS
278	DVD078L	AB014VL	AB034VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QAVLTQPSSLSAPPGASASLTCTLRSG FNVDSYRISWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGS GVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCM IWHSSAWVFGGGTKLTVLR

Ejemplo 2.46: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 1) y HER-2 (seq. 1)

Tabla 78

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
279	DVD079H	AB003VH	AB004VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYY WTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLT ISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKG**PEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
280	DVD079L	AB003VL	AB004VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT FGQGTKVEIKR
281	DVD080H	AB004VH	AB003VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKP SETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEW IGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKL SSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVSS
282	DVD080L	AB004VL	AB003VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLA FGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.47: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 1) y CD3 (seq. 1)

Tabla 79

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
283	DVD081H	AB003VH	AB002VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYY WTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLT ISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELARPG ASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGY INPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
284	DVD081L	AB003VL	AB002VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVE IKR**TVAAP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASS SVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFS GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTF GSGTKLEINR
285	DVD082H	AB002VH	AB003VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWI GHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLS SVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVSS
286	DVD082L	AB002VL	AB003VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSY SLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEI NR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQD ISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAF GGGTKVEIKR

Ejemplo 2.48: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 1) e IGF1R

Tabla 80

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
287	DVD083H	AB003VH	AB011VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYY WTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLT ISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDNSRTTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMDVWGQGTT VTVSS
288	DVD083L	AB003VL	AB011VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCS FGQGTKLEIKR
289	DVD084H	AB011VH	AB003VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTI SRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGP GLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPG KGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQ FSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTM VTVSS
290	DVD084L	AB011VL	AB003VL	DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFGQGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLA FGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.49: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 1) y RON (seq. 1)

Tabla 81

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
291	DVD085H	AB003VH	AB005VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYY WTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLT ISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAV ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGMDVWGQGTTV TVSS
292	DVD085L	AB003VL	AB005VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVE IKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQ SLLHSNGFNYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL QTPPWTFGQGTKVEIRR
293	DVD086H	AB005VH	AB003VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNN YYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPG LVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGK GLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQF SLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMV TVSS
294	DVD086L	AB005VL	AB003VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKVEIRR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLET GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHF DHLPLAFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.50: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 1) y RON (seq. 2)

Tabla 82

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
295	DVD087H	AB003VH	AB034VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYY WTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLT ISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPS EILSLTCTVSGGSISSHYWSWVRQPPGKGLEWIGY IYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLNLSSV TAADTAVYYCARIPNYYDRSGYYPGYWYFDLWGRG TLVTVSS
296	DVD087L	AB003VL	AB034VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVE IKR**TVAAP**QAVLTQPSSLSAPPGASASLTCTLRSG FNVDSYRISWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGS GVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCM IWHSSAWVFGGGTKLTVLR
297	DVD088H	AB034VH	AB003VH	QVQLQESGPGLVKPSEILSLTCTVSGGSISSHYWS WVRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARIPNYYDRS GYYPGYWYFDLWGRGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQES GPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQS PGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSK TQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQG TMVTVSS
298	DVD088L	AB034VL	AB003VL	QAVLTQPSSLSAPPGASASLTCTLRSGFNVDSYRI SWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVPSRFSG SKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSSAWV FGGGTKLTVLR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQ HFDHLPLAFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.51: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 1) y HGF (seq. 1)

Tabla 83

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 123456789012345678901234567890123 45
299	DVD089H	AB003VH	AB012VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYY WTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLT ISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSY ISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGTLVTV SS
300	DVD089L	AB003VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRF GGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWT FGQGTKVEIKR
301	DVD090H	AB012VH	AB003VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGL EWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSL KLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTV SS
302	DVD090L	AB012VL	AB003VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLA FGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.52: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 1) y c-MET

Tabla 84

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
303	DVD091H	AB003VH	AB013VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYY WTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLT ISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGPELVRPG ASVKWSCPASGYTFTSYWLHWVKKQRPGQGLEWIG MIDPSNSDTRFNPPNFKDKATLNVDRSSNTAYNLL SSLTSADSAVYYCATYGSYVSPLDYWGQGTSVYVS S
304	DVD091L	AB003VL	AB013VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVE IKR**TVAAP**DIMMSQSPSSLTVSVGEKVTVSCKSSQ SLLVTSSQKNYLAWYQQKPQQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTITSVKADDLAVYYCQQY YAYPWTFGDGTKLEIKR
305	DVD092H	AB013VH	AB003VH	QVQLQQSGPELVRPGASVKWSCPASGYTFTSYWLH WVKKQRPGQGLEWIGMIDPSNSDTRFNPPNFKDKA TLNVDRSSNTAYNLLSSLTSADSAVYYCATYGSYV SPLDYWGQGTSVYVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLE WIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLK LSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVS S
306	DVD092L	AB013VL	AB003VL	DIMMSQSPSSLTVSVGEKVTVSCKSSQSLLVTSSQ KNYLAWYQQKPQQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTITSVKADDLAVYYCQQYYAYPWTFG DGTKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLET GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHF DHLPLAFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.53: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 1) y VEGF (seq. 1)

Tabla 85

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
307	DVD093H	AB003VH	AB014VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYY WTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLT ISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGW INTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNS LRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVT VSS
308	DVD093L	AB003VL	AB014VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
309	DVD094H	AB014VH	AB003VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGL VKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKG LEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFS LKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVT VSS
310	DVD094L	AB014VL	AB003VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLA FGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.54: Generación de DVD-Igs de NRP1 (seq. 2) y VEGF (seq. 1)

Tabla 86

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
311	DVD107H	AB035VH	AB014VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSQISPAGGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARELPYYRM SKVMDVQGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEW VGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGT LVTVSS
312	DVD107L	AB035VL	AB014VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYFSSYLAW YQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYLGSPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
313	DVD108H	AB014VH	AB035VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSQISPAGGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARELPYYRMSKVMDVQGQGT LVTVSS
314	DVD108L	AB014VL	AB035VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ YFSSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLGSPPT FGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.55: Generación de DVD-Igs de CD3 (seq. 2) y CD-20

Tabla 87

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
315	DVD131H	AB039VH	AB001VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**QVQLQQPGAELVKPG ASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGA IYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS A
316	DVD131L	AB039VL	AB001VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSY SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEI NR**TVAAP**QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASSS VSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSG SGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFG GGTKLEIKR
317	DVD132H	AB001VH	AB039VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMH WVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATL TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGD WYFNVWGAGTTVTVSA**ASTKGP**QVQLQQSGAELAR PGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWI GYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVS S
318	DVD132L	AB001VL	AB039VL	QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASSSVSYIHWF QQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSY SLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEI KR**TVAAP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSS VSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRG SGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFG SGTKLEINR

Ejemplo 2.56: Generación de DVD-Igs de CD-3 (seq. 2) y HER-2 (seq. 1)

Tabla 88

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
319	DVD135H	AB039VH	AB004VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
320	DVD135L	AB039VL	AB004VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSY SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEI NR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQD VNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF GQGTKVEIKR
321	DVD136H	AB004VH	AB039VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELARP GASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIG YINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
322	DVD136L	AB004VL	AB039VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASS SVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFR GSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTF GSGTKLEINR

Ejemplo 2.57: Generación de DVD-Igs de CD-3 (seq. 2) y CD-19

Tabla 89

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
323	DVD137H	AB039VH	AB006VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELVRPG SSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQ IWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSS LASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSV TVSS
324	DVD137L	AB039VL	AB006VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSY SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEI NR**TVAAP**DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQS VDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIP PRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTED PWTFGGGTKLEIKR
325	DVD138H	AB006VH	AB039VH	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMN WVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATL TADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVG RYYYAMDYWGQGTSVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAE LARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGL EWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTL TVSS
326	DVD138L	AB006VL	AB039VL	DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDS YLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSG SGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGG TKLEIKR**TVAAP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC SASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVP AHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSN PFTFGSGTKLEINR

Ejemplo 2.58: Generación de DVD-Igs de CD-3 (seq. 2) y EGFR (seq. 2)

Tabla 90

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
327	DVD139H	AB039VH	AB033VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPS QSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGV IWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSL QSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
328	DVD139L	AB039VL	AB033VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSY SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEI NR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQS IGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFS GSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTF GAGTKLELKR
329	DVD140H	AB033VH	AB039VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLQQSGAELARPG ASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGY INPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
330	DVD140L	AB033VL	AB039VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASS SVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFR GSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTF GSGTKLEINR

Ejemplo 2.59: Generación de DVD-Igs de CD-3 (seq. 2) y EGFR (seq. 1)

Tabla 91

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
331	DVD141H	AB039VH	AB003VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWI GHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLS SVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVSS
332	DVD141L	AB039VL	AB003VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSY SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEI NR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQD ISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAF GGGTKVEIKR
333	DVD142H	AB003VH	AB039VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYY WTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLT ISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELARPG ASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGY INPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
334	DVD142L	AB003VL	AB039VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVE IKR**TVAAP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASS SVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFR GSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTF GSGTKLEINR

Ejemplo 2.60: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 1) e IGF1,2

Tabla 92

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
335	DVD143H	AB003VH	AB010VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYY WTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLT ISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGW MNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSS LRSEDTAVYYCARDPYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
336	DVD143L	AB003VL	AB010VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVE IKR**TVAAP**QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSS NIENNHVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDR FSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCETWDTSLS AGRVFGGGTKLTVLG
337	DVD144H	AB010VH	AB003VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDIN WVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTM TRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPYYYYY GMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKP SETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEW IGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKL SSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVSS
338	DVD144L	AB010VL	AB003VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIENNHVS WYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTGDEADYYCETWDTSLSAGRVFGGG TKLTVLG**QPKAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFD HLPLAFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.61: Generación de DVD-Igs de DLL-4 (seq. 1) y PLGF (seq. 1)

Tabla 93

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
339	VD257H	AB015VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELVKPGA SVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLEWIGWI YPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLSSL TSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
340	VD257L	AB015VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSS QSLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRE SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQ SYHLFTFGSGTKLEIKR
341	VD258H	AB047VH	AB015VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGYISP NSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLVTVSS
342	VD258L	AB047VL	AB015VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQQS YTGTVTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.62: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 94

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
343	VD259H	AB014VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAEL VKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLE WIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYM QLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
344	VD259L	AB014VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQ SLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQS YHLFTFGSGTKLEIKR
345	VD260H	AB047VH	AB014VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINT YTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRA EDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSS
346	VD260L	AB047VL	AB014VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYS TVPWTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.63: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 95

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
347	DVD579H	AB047VH	AB014VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLE WVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQG TLVTVSS
348	DVD579L	AB047VL	AB014VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYF TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR
349	DVD580H	AB014VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQL QQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKL APGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDT SSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQG TLLTVSS
350	DVD580L	AB014VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVT MNCKSSQSLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA VYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR

Ejemplo 2.64: Generación de DVD-Igs VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 96

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
351	DVD587VH	AB047VH	AB014VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLE WVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQG TLVTVSS
352	DVD587VL	AB047VL	AB014VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYS TVPWTFGQGTKVEIKR
353	DVD588VH	AB014VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQL QQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKL APGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDT SSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQG TLLTVSS
354	DVD588VL	AB014VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQ SLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQS YHLFTFGSGTKLEIKR

Ejemplo 2.65: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 97

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
355	DVD595VH	AB047VH	AB014VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINT YTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRA EDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSS
356	DVD595VL	AB047VL	AB014VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYF TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR
357	DVD596VH	AB014VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAEL VKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLE WIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYM QLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
358	DVD596VL	AB014VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVT MNCKSSQSLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA VYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.66: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 98

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
359	VD299H	AB062VH	AB033VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPSQS LSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIW SGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQS NDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
360	VD299L	AB062VL	AB033VL	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSF SCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESIS GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQN NNWPTTFGAGTKLELKR
361	VD300H	AB033VH	AB062VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLQQWGAGLLKPS ETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGE INHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS
362	VD300L	AB033VL	AB062VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQ SVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPRTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.67: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 99

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
363	DVD385H	AB062	AB033	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQSGPG LVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGL EWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFF KMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLV TVSA
364	DVD385L	AB062	AB033	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVS PGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIA DYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR
365	DVD386H	AB033	AB062	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQWG AGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLV TVSS
366	DVD386L	AB033	AB062	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIEMTQSPDSLAVSLGERAT INCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.68: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 100

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
367	DVD389H	AB062	AB033	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQSGPG LVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGL EWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFF KMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLV TVSA
368	DVD389L	AB062	AB033	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSF SCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESIS GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQN NNWPTTFGAGTKLELKR
369	DVD390H	AB033	AB062	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQWG AGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLV TVSS
370	DVD390L	AB033	AB062	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKRTVAAPDIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQ SVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPRTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.69: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 101

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
371	DVD393H	AB062	AB033	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPSQS LSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIW SGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQS NDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
372	DVD393L	AB062	AB033	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVS PGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIA DYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR
373	DVD394H	AB033	AB062	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLQQWGAGLLKPS ETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGE INHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS
374	DVD394L	AB033	AB062	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIEMTQSPDSLAVSLGERAT INCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.70: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1)

Tabla 102

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
375	DVD301H	AB062VH	AB003VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPSET LSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGH IYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSSV TAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVSS
376	DVD301L	AB062VL	AB003VL	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLET GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHF DHLPLAFGGGTKVEIKR
377	DVD302H	AB003VH	AB062VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYY WTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLT ISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLQQWGAGLLKPS ETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGE INHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS
378	DVD302L	AB003VL	AB062VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVE IKR**TVAAP**DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQ SVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPRTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.71: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1)

Tabla 103

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
379	DVD303H	AB062VH	AB012VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGLVKPGGS LRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYIS SSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGTLVTVSS
380	DVD303L	AB062VL	AB012VL	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTI TCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQS GVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQA NGFPWTFGQGTKVEIKR
381	DVD304H	AB012VH	AB062VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQWGAGLL KPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS
382	DVD304L	AB012VL	AB062VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQ SVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPRTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.72: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 104

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
383	DVD305H	AB063VH	AB033VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPS QSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGV IWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSL QSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
384	DVD305L	AB063VL	AB033VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE IKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKR
385	DVD306H	AB033VH	AB063VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSY ISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMVTVSS
386	DVD306L	AB033VL	AB063VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPIT FGQGTRLEIKR

5

Ejemplo 2.73: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 105

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
387	DVD397H	AB063	AB033	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQSG PGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK GLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQV FFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGT LVTVSA
388	DVD397L	AB063	AB033	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKR
389	DVD398H	AB033	AB063	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGK GLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGT MVTVSS
390	DVD398L	AB033	AB063	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE TGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQ CENFPITFGQGTRLEIKR

Ejemplo 2.74: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 106

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
391	DVD401H	AB063	AB033	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQSG PGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK GLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQV FFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGT LVTVSA
392	DVD401L	AB063	AB033	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE IKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKR
393	DVD402H	AB033	AB063	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGK GLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGT MVTVSS
394	DVD402L	AB033	AB063	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPIT FGQGTRLEIKR

Ejemplo 2.75: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 107

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
395	DVD405H	AB063	AB033	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPS QSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGV IWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSL QSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
396	DVD405L	AB063	AB033	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKR
397	DVD406H	AB033	AB063	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSY ISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMVTVSS
398	DVD406L	AB033	AB063	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE TGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQ CENFPITFGQGTRLEIKR

Ejemplo 2.76: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2)

Tabla 108

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
399	DVD307H	AB063VH	AB003VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWI GHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLS SVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVSS
400	DVD307L	AB063VL	AB003VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLA FGGGTKVEIKR
401	DVD308H	AB003VH	AB063VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYY WTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLT ISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSY ISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMVTVSS
402	DVD308L	AB003VL	AB063VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPIT FGQGTRLEIKR

5

Ejemplo 2.77: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2)

Tabla 109

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
403	DVD309H	AB063VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSY ISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGTLVTV SS
404	DVD309L	AB063VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRF GGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWT FGQGTKVEIKR
405	DVD310H	AB012VH	AB063VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEW VSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMVTV SS
406	DVD310L	AB012VL	AB063VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPIT FGQGTRLEIKR

Ejemplo 2.78: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 110

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
407	DVD441H	AB069	AB014	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIH WVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVG MDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGW INTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNS LRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVT VSS
408	DVD441L	AB069	AB014	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGIS FMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGG TKVEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC SASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYST VPWTFGQGTKVEIKR
409	DVD442H	AB014	AB069	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVQSGAEV KKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLE WIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYM ELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVT VSS
410	DVD442L	AB014	AB069	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASE SVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKE VPWTFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.79: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 111

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
411	DVD447H	AB069	AB014	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIH WVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVG MDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGK GLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKST AYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVW GQGTLVTVSS
412	DVD447L	AB069	AB014	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGIS FMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGG TKVEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFT SSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR
413	DVD448H	AB014	AB069	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQL VQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQ APGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYW GQGTLVTVSS
414	DVD448L	AB014	AB069	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVMTQSPDSLAVSLGERAT ISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAA SNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.80: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 112

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
415	DVD453H	AB069	AB014	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIH WVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVG MDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGK GLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKST AYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVW GQGTLVTVSS
416	DVD453L	AB069	AB014	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGIS FMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGG TKVEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC SASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYST VPWTFGQGTKVEIKR
417	DVD454H	AB014	AB069	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQL VQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQ APGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYW GQGTLVTVSS
418	DVD454L	AB014	AB069	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASE SVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKE VPWTFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.81: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 113

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
419	DVD459H	AB069	AB014	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIH WVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVG MDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGW INTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNS LRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVT VSS
420	DVD459L	AB069	AB014	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGIS FMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGG TKVEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFT SSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR
421	DVD460H	AB014	AB069	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVQSGAEV KKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLE WIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYM ELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVT VSS
422	DVD460L	AB014	AB069	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVMTQSPDSLAVSLGERAT ISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAA SNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.82: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 114

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
423	DVD443H	AB069	AB070	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIH WVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVG MDYWGQGTLVTVSS**ASTKG**PEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAG ITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSS
424	DVD443L	AB069	AB070	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGIS FMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGG TKVEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYT TPPTFGQGTKVEIKR
425	DVD444H	AB070	AB069	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVQSGAEVKKP GASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIG YISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS
426	DVD444L	AB070	AB069	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASE SVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKE VPWTFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.83: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 115

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
427	DVD449H	AB069	AB070	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIH WVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVG MDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGK GLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQG TLVTVSS
428	DVD449L	AB069	AB070	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGIS FMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGG TKVEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSA SFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR
429	DVD450H	AB070	AB069	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLVQS GAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPG QGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQG TLVTVSS
430	DVD450L	AB070	AB069	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVMTQSPDSLAVSLGERAT ISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAA SNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.84: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 116

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
431	DVD455H	AB069	AB070	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIH WVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVG MDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGK GLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQG TLVTVSS
432	DVD455L	AB069	AB070	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGIS FMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGG TKVEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYT TPPTFGQGTKVEIKR
433	DVD456H	AB070	AB069	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLVQS GAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPG QGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQG TLVTVSS
434	DVD456L	AB070	AB069	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASE SVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKE VPWTFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.85: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 117

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
435	DVD461H	AB069	AB070	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIH WVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVG MDYWGQGTLVTVSS**ASTKG**PEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAG ITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSS
436	DVD461L	AB069	AB070	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGIS FMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGG TKVEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSA SFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR
437	DVD462H	AB070	AB069	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVQSGAEVKKP GASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIG YISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVSS
438	DVD462L	AB070	AB069	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVMTQSPDSLAVSLGERAT ISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAA SNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.86: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 118

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
439	DVD445H	AB069	AB071	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIH WVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVG MDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGA IYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVS S
440	DVD445L	AB069	AB071	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGIS FMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGG TKVEIKR**TVAAPD**IQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNT SPLTFGQGTKVEIKR
441	DVD446H	AB071	AB069	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVQSGAEVKK PGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWI GYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVS S
442	DVD446L	AB071	AB069	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASE SVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKE VPWTFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.87: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 119

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
443	DVD451H	AB069	AB071	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIH WVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVG MDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGK GLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQ GTLVTVSS
444	DVD451L	AB069	AB071	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGIS FMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGG TKVEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAA SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSNTSPLTFGQGTKVEIKR
445	DVD452H	AB071	AB069	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLVQ SGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP GQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQ GTLVTVSS
446	DVD452L	AB071	AB069	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVMTQSPDSLAVSLGERAT ISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAA SNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.88: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 120

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
447	DVD457H	AB069	AB071	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIH WVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVG MDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGK GLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQ GTLVTVSS
448	DVD457L	AB069	AB071	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGIS FMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGG TKVEIKR**TVAAPD**IQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNT SPLTFGQGTKVEIKR
449	DVD458H	AB071	AB069	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLVQ SGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAP GQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQ GTLVTVSS
450	DVD458L	AB071	AB069	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASE SVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKE VPWTFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.89: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 121

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
451	DVD463H	AB069	AB071	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIH WVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVG MDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGA IYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVS S
452	DVD463L	AB069	AB071	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGIS FMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGG TKVEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAA SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSNTSPLTFGQGTKVEIKR
453	DVD464H	AB071	AB069	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVQSGAEVKK PGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWI GYISSYNGATNYNQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLVTVS S
454	DVD464L	AB071	AB069	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVMTQSPDSLAVSLGERAT ISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAA SNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.90: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 122

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
455	DVD465H	AB015	AB070	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGI TPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSS
456	DVD465L	AB015	AB070	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPP TFGQGTKVEIKR
457	DVD466H	AB070	AB015	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVG YISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLVTVSS
458	DVD466L	AB070	AB015	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTV TFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.91: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 123

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
459	DVD471H	AB015	AB070	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKG LEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGT LVTVSS
460	DVD471L	AB015	AB070	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYTTPPTFGQGTKVEIKR
461	DVD472H	AB070	AB015	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSSA**STKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPG KGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGT LVTVSS
462	DVD472L	AB070	AB015	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQ QSYTGTVTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.92: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 125

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
463	DVD477H	AB015	AB070	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKG LEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGT LVTVSS
464	DVD477L	AB015	AB070	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPP TFGQGTKVEIKR
465	DVD478H	AB070	AB015	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSSA**STKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPG KGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGT LVTVSS
466	DVD478L	AB070	AB015	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTV TFGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.93: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 126

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
467	DVD483H	AB015	AB070	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGI TPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSS
468	DVD483L	AB015	AB070	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYTTPPTFGQGTKVEIKR
469	DVD484H	AB070	AB015	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVG YISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLVTVSS
470	DVD484L	AB070	AB015	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQ QSYTGTVTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.94: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 127

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
471	DVD467H	AB015	AB071	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAI YPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVSS
472	DVD467L	AB015	AB071	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPL TFGQGTKVEIKR
473	DVD468H	AB071	AB015	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWV GYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLVTVSS
474	DVD468L	AB071	AB015	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTV TFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.95: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 128

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
475	DVD473H	AB015	AB071	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKG LEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQG TLVTVSS
476	DVD473L	AB015	AB071	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSNTSPLTFGQGTKVEIKR
477	DVD474H	AB071	AB015	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAP GKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQG TLVTVSS
478	DVD474L	AB071	AB015	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQ QSYTGTVTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.96: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 129

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
479	DVD479H	AB015	AB071	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKG LEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQG TLVTVSS
480	DVD479L	AB015	AB071	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPL TFGQGTKVEIKR
481	DVD480H	AB071	AB015	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAP GKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQG TLVTVSS
482	DVD480L	AB071	AB015	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTV TFGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.97: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 130

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
483	DVD485H	AB015	AB071	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAI YPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVSS
484	DVD485L	AB015	AB071	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSNTSPLTFGQGTKVEIKR
485	DVD486H	AB071	AB015	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWV GYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLVTVSS
486	DVD486L	AB071	AB015	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQ QSYTGTVTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.98: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 131

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
487	DVD469H	AB015	AB014	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKG LEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA YLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWG QGTLVTVSS
488	DVD469L	AB015	AB014	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QYSTVPWTFGQGTKVEIKR
489	DVD470H	AB014	AB015	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQ APGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWG QGTLVTVSS
490	DVD470L	AB014	AB015	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQ QSYTGTVTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.99: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 132

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
491	DVD475H	AB015	AB014	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKG LEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA YLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWG QGTLVTVSS
492	DVD475L	AB015	AB014	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS QDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPW TFGQGTKVEIKR
493	DVD476H	AB014	AB015	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQ APGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWG QGTLVTVSS
494	DVD476L	AB014	AB015	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTV TFGQGTKVEIKR

5.

Ejemplo 2.100: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 133

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
495	DVD481H	AB015	AB014	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWI NTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSL RAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTV SS
496	DVD481L	AB015	AB014	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QYSTVPWTFGQGTKVEIKR
497	DVD482H	AB014	AB015	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLE WVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLVTV SS
498	DVD482L	AB014	AB015	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQ QSYTGTVTFGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.101: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 134

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
499	DVD487H	AB072	AB014	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIN WVKQKPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATL TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRY YFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVG WINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLV TVSS
500	DVD487L	AB072	AB014	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAW YQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
501	DVD488H	AB014	AB072	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLQQSGPEL VKPGASVKMSCKASGYTFTSYVINWVKQKPGQGLE WIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATLTSDKSSSTAYM ELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRYYFDYWGQGTTL TVSS
502	DBD488L	AB014	AB072	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASD HINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLT FGAGTKLELKR

5

Ejemplo 2.102: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 135

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
503	DVD493H	AB072	AB014	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIN WVKQKPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATL TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRY YFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPG KGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKS TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDV WGQGTLVTVSS
504	DVD493L	AB072	AB014	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAW YQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFP**PDIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR
505	DVD494H	AB014	AB072	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQL QQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVINWVKQ KPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATLTSDK SSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRYYFDY WGQGTTLTVSS
506	DVD494L	AB014	AB072	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSSSYLSVSLGGRVT ITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLE TGVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSIPLTFGAGTKLELKR

5

Ejemplo 2.103: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 136

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
507	DVD499H	AB072	AB014	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIN WVKQKPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATL TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRY YFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPG KGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKS TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDV WGQGTLVTVSS
508	DVD499L	AB072	AB014	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAW YQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
509	DVD500H	AB014	AB072	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQL QQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVINWVKQ KPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATLTSDK SSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRYYFDY WGQGTTLTVSS
510	DVD500L	AB014	AB072	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASD HINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLT FGAGTKLELKR

5

Ejemplo 2.104: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 137

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
511	DVD505H	AB072	AB014	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIN WVKQKPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATL TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRY YFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVG WINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLV TVSS
512	DVD505L	AB072	AB014	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAW YQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR
513	DVD506H	AB014	AB072	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLQQSGPEL VKPGASVKMSCKASGYTFTSYVINWVKQKPGQGLE WIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATLTSDKSSSTAYM ELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRYYFDYWGQGTTL TVSS
514	DVD506L	AB014	AB072	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSSSYLSVSLGGRVT ITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLE TGVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSIPLTFGAGTKLELKR

5

Ejemplo 2.105: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 138

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
515	DVD489H	AB072	AB070	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIN WVKQKPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATL TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRY YFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVA GITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVS S
516	DVD489L	AB072	AB070	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAW YQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
517	DVD490H	AB070	AB072	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLQQSGPELVKP GASVKMSCKASGYTFTSYVINWVKQKPGQGLEWIG LINPYNDGTKYNEKFKVKATLTSDKSSSTAYMELS SLTSEDSAVYYCASYYYGSRYYFDYWGQGTTLTVS S
518	DVD490L	AB070	AB072	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASD HINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLT FGAGTKLELKR

Ejemplo 2.106: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 139

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
519	DVD495H	AB072	AB070	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIN WVKQKPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATL TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRY YFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPG KGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQ GTLVTVSS
520	DVD495L	AB072	AB070	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAW YQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYTTPPTFGQGTKVEIKR
521	DVD496H	AB070	AB072	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLQQS GPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVINWVKQKPG QGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATLTSDKSSS TAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRYYFDYWGQ GTTLTVSS
522	DVD496L	AB070	AB072	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSSSYLSVSLGGRVT ITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLE TGVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSIPLTFGAGTKLELKR

Ejemplo 2.107: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 140

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
523	DVD501H	AB072	AB070	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIN WVKQKPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATL TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRY YFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPG KGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQ GTLVTVSS
524	DVD501L	AB072	AB070	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAW YQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
525	DVD502H	AB070	AB072	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLQQS GPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVINWVKQKPG QGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATLTSDKSSS TAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRYYFDYWGQ GTTLTVSS
526	DVD502L	AB070	AB072	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASD HINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLT FGAGTKLELKR

5

Ejemplo 2.108: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 141

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
527	DVD507H	AB072	AB070	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIN WVKQKPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATL TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRY YFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVA GITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVS S
528	DVD507L	AB072	AB070	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAW YQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYTTPPTFGQGTKVEIKR
529	DVD508H	AB070	AB072	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLQQSGPELVKP GASVKMSCKASGYTFTSYVINWVKQKPGQGLEWIG LINPYNDGTKYNEKFKVKATLTSDKSSSTAYMELS SLTSEDSAVYYCASYYYGSRYYFDYWGQGTTLTVS S
530	DVD508L	AB070	AB072	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSSSYLSVSLGGRVT ITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLE TGVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSIPLTFGAGTKLELKR

Ejemplo 2.109: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 142

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
531	DVD491H	AB072	AB071	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIN WVKQKPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATL TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRY YFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVG AIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTV SS
532	DVD491L	AB072	AB071	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAW YQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ VIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLT FGQGTKVEIKR
533	DVD492H	AB071	AB072	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLQQSGPELVK PGASVKMSCKASGYTFTSYVINWVKQKPGQGLEWI GLINPYNDGTKYNEKFKVKATLTSDKSSSTAYMEL SSLTSEDSAVYYCASYYYGSRYYFDYWGQGTTLTV SS
534	DVD492L	AB071	AB072	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASD HINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLT FGAGTKLELKR

5

Ejemplo 2.110: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 143

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
535	DVD497H	AB072	AB071	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIN WVKQKPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATL TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRY YFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPG KGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWG QGTLVTVSS
536	DVD497L	AB072	AB071	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAW YQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKVEIKR
537	DVD498H	AB071	AB072	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLQQ SGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVINWVKQKP GQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATLTSDKSS STAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRYYFDYWG QGTTLTVSS
538	DVD498L	AB071	AB072	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSSSYLSVSLGGRVT ITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLE TGVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSIPLTFGAGTKLELKR

Ejemplo 2.111: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 144

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
539	DVD503H	AB072	AB071	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIN WVKQKPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATL TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRY YFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPG KGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWG QGTLVTVSS
540	DVD503L	AB072	AB071	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAW YQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ VIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLT FGQGTKVEIKR
541	DVD504H	AB071	AB072	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLQQ SGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVINWVKQKP GQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATLTSDKSS STAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRYYFDYWG QGTTLTVSS
542	DVD504L	AB071	AB072	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASD HINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLT FGAGTKLELKR

Ejemplo 2.112: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 145

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
543	DVD509H	AB072	AB071	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIN WVKQKPGQGLEWIGLINPYNDGTKYNEKFKVKATL TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASYYYGSRY YFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVG AIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTV SS
544	DVD509L	AB072	AB071	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAW YQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSIPLTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKVEIKR
545	DVD510H	AB071	AB072	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLQQSGPELVK PGASVKMSCKASGYTFTSYVINWVKQKPGQGLEWI GLINPYNDGTKYNEKFKVKATLTSDKSSSTAYMEL SSLTSEDSAVYYCASYYYGSRYYFDYWGQGTTLTV SS
546	DVD510L	AB071	AB072	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSSSYLSVSLGGRVT ITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLE TGVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSIPLTFGAGTKLELKR

5

Ejemplo 2.113: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 4) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 146

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
547	DVD511H	AB073	AB014	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMN WVKQSNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGG CFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVG WINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLV TVSS
548	DVD511L	AB073	AB014	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTK LTVLG**QPKAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTV PWTFGQGTKVEIKR
549	DVD512H	AB014	AB073	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLQQSGPEL EKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNGKSLE WIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM QLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGGCFDYWGQGTTL TVSS
550	DVD512L	AB014	AB073	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTG AVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPA RFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNH WVFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.114: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 4) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 147

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
551	DVD517H	AB073	AB014	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMN WVKQSNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGG CFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPG KGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKS TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDV WGQGTLVTVSS
552	DVD517L	AB073	AB014	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTK LTVLG**QPKAAPSVTLFPP**DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTS SLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR
553	DVD518H	AB014	AB073	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQL QQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQ SNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATLTVDK SSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGGCFDY WGQGTTLTVSS
554	DVD518L	AB014	AB073	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**QAVVTQESALTTSPGETVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNN RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.115: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 4) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 148

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
555	DVD523H	AB073	AB014	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMN WVKQSNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGG CFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPG KGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKS TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDV WGQGTLVTVSS
556	DVD523L	AB073	AB014	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTK LTVLG**QPKAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTV PWTFGQGTKVEIKR
557	DVD524H	AB014	AB073	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQL QQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQ SNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATLTVDK SSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGGCFDY WGQGTTLTVSS
558	DVD524L	AB014	AB073	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTG AVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPA RFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNH WVFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.116: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y DLL4 (seq. 4) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 149

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
559	DVD529H	AB073	AB014	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMN WVKQSNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGG CFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVG WINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLV TVSS
560	DVD529L	AB073	AB014	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTK LTVLG**QPKAAPSVTLFPP**DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTS SLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR
561	DVD530H	AB014	AB073	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLQQSGPEL EKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNGKSLE WIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM QLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGGCFDYWGQGTTL TVSS
562	DVD530L	AB014	AB073	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**QAVVTQESALTTSPGETVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNN RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.117: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 4) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 150

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
563	DVD513H	AB073	AB070	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMN WVKQSNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGG CFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVA GITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVS S
564	DVD513L	AB073	AB070	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTK LTVLG**QPKAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTT PPTFGQGTKVEIKR
565	DVD514H	AB070	AB073	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLQQSGPELEKP GASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNGKSLEWIG NIDPYFGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLK SLTSEDSAVYYCARNYDYDGGCFDYWGQGTTLTVS S
566	DVD514L	AB070	AB073	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTG AVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPA RFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNH WVFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.118: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 4) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 151

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
567	DVD519H	AB073	AB070	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMN WVKQSNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGG CFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPG KGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQ GTLVTVSS
568	DVD519L	AB073	AB070	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTK LTVLG**QPKAAPSVTLFPP**DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR
569	DVD520H	AB070	AB073	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLQQS GPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNG KSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSS TAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGGCFDYWGQ GTTLTVSS
570	DVD520L	AB070	AB073	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**QAVVTQESALTTSPGETVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNN RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.119: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 4) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 152

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
571	DVD525H	AB073	AB070	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMN WVKQSNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGG CFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPG KGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQ GTLVTVSS
572	DVD525L	AB073	AB070	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTK LTVLG**QPKAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTT PPTFGQGTKVEIKR
573	DVD526H	AB070	AB073	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLQQS GPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNG KSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSS TAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGGCFDYWGQ GTTLTVSS
574	DVD526L	AB070	AB073	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTG AVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPA RFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNH WVFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.120: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y DLL4 (seq. 4) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 153

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
575	DVD531H	AB073	AB070	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMN WVKQSNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGG CFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVA GITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVS S
576	DVD531L	AB073	AB070	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTK LTVLG**QPKAAPSVTLFPP**DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR
577	DVD532H	AB070	AB073	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLQQSGPELEKP GASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNGKSLEWIG NIDPYFGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLK SLTSEDSAVYYCARNYDYDGGCFDYWGQGTTLTVS S
578	DVD532L	AB070	AB073	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**QAVVTQESALTTSPGETVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNN RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.121: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 4) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 154

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
579	DVD515H	AB073	AB071	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMN WVKQSNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGG CFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVG AIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTV SS
580	DVD515L	AB073	AB071	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTK LTVLG**QPKAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTS PLTFGQGTKVEIKR
581	DVD516H	AB071	AB073	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLQQSGPELEK PGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNGKSLEWI GNIDPYFGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQL KSLTSEDSAVYYCARNYDYDGGCFDYWGQGTTLTV SS
582	DVD516L	AB071	AB073	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTG AVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPA RFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNH WVFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.122: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 4) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 155

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
583	DVD521H	AB073	AB071	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMN WVKQSNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGG CFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPG KGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWG QGTLVTVSS
584	DVD521L	AB073	AB071	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTK LTVLG**QPKAAPSVTLFPP**DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS NLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSNTSPLTFGQGTKVEIKR
585	DVD522H	AB071	AB073	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLQQ SGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSN GKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATLTVDKSS STAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGGCFDYWG QGTTLTVSS
586	DVD522L	AB071	AB073	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**QAVVTQESALTTSPGETVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNN RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

5

Ejemplo 2.123: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 4) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 156

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
587	DVD527H	AB073	AB071	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMN WVKQSNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGG CFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPG KGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWG QGTLVTVSS
588	DVD527L	AB073	AB071	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTK LTVLG**QPKAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTS PLTFGQGTKVEIKR
589	DVD528H	AB071	AB073	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLQQ SGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSN GKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATLTVDKSS STAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGGCFDYWG QGTTLTVSS
590	DVD528L	AB071	AB073	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTG AVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPA RFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNH WVFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.124: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y DLL4 (seq. 4) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 157

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
591	DVD533H	AB073	AB071	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMN WVKQSNGKSLEWIGNIDPYFGGTNYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARNYDYDGG CFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVG AIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTV SS
592	DVD533L	AB073	AB071	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTK LTVLG**QPKAAPSVTLFPP**DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS NLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSNTSPLTFGQGTKVEIKR
593	DVD534H	AB071	AB073	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLQQSGPELEK PGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNGKSLEWI GNIDPYFGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQL KSLTSEDSAVYYCARNYDYDGGCFDYWGQGTTLTV SS
594	DVD534L	AB071	AB073	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**QAVVTQESALTTSPGETVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNN RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

Ejemplo 2.125: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 158

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
595	DVD387H	AB062	AB004	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTL VTVSS
596	DVD387L	AB062	AB004	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR
597	DVD388H	AB004	AB062	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQW GAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTL VTVSS
598	DVD388L	AB004	AB062	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIEMTQSPDSLAVSLGERAT INCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.126: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 159

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
599	DVD391H	AB062	AB004	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTL VTVSS
600	DVD391L	AB062	AB004	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTTPPTFGQGTKVEIKR
601	DVD392H	AB004	AB062	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQW GAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTL VTVSS
602	DVD392L	AB004	AB062	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQ SVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPRTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.127: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 160

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
603	DVD395H	AB062	AB004	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
604	DVD395L	AB062	AB004	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR
605	DVD396H	AB004	AB062	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQWGAGLLKP SETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS
606	DVD396L	AB004	AB062	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIEMTQSPDSLAVSLGERAT INCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.128: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 1) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 161

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
607	DVD683H	AB062	AB004	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
608	DVD683L	AB062	AB004	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTTPPTFGQGTKVEIKR
609	DVD684H	AB004	AB062	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQWGAGLLKP SETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG EINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS
610	DVD684L	AB004	AB062	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQ SVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPRTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.129: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 162

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
611	DVD399H	AB063	AB004	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSS
612	DVD399L	AB063	AB004	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ HYTTPPTFGQGTKVEIKR
613	DVD400H	AB004	AB063	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPG KGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQG TMVTVSS
614	DVD400L	AB004	AB063	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE TGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQ CENFPITFGQGTRLEIKR

5

Ejemplo 2.130: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 163

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
615	DVD403H	AB063	AB004	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSS
616	DVD403L	AB063	AB004	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT FGQGTKVEIKR
617	DVD404H	AB004	AB063	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPG KGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQG TMVTVSS
618	DVD404L	AB004	AB063	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPIT FGQGTRLEIKR

Ejemplo 2.131: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 164

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
619	DVD407H	AB063	AB004	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
620	DVD407L	AB063	AB004	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ HYTTPPTFGQGTKVEIKR
621	DVD408H	AB004	AB063	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVS YISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMVTVSS
622	DVD408L	AB004	AB063	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE TGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQ CENFPITFGQGTRLEIKR

5

Ejemplo 2.132: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 165

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
623	DVD685H	AB063	AB004	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
624	DVD685L	AB063	AB004	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT FGQGTKVEIKR
625	DVD686H	AB004	AB063	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVS YISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMVTVSS
626	DVD686L	AB004	AB063	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPIT FGQGTRLEIKR

Ejemplo 2.133: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 166

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
627	DVD409H	AB067	AB033	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPS QSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGV IWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSL QSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
628	DVD409L	AB067	AB033	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVV SWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG TKVTVLG**QPKAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFS CRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISG IPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNN NWPTTFGAGTKLELKR
629	DVD410H	AB033	AB067	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVSS ISSSGGWTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTLVTVSS
630	DVD410L	AB033	AB067	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS DVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSN RFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSS IFVIFGGGTKVTVLG

Ejemplo 2.134: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 167

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
631	DVD413H	AB067	AB033	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQSG PGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK GLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQV FFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGT LVTVSA
632	DVD413L	AB067	AB033	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVV SWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG TKVTVLG**QPKAAPSVTLFPP**DILLTQSPVILSVSP GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKY ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIAD YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR
633	DVD414H	AB033	AB067	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGK GLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGT LVTVSS
634	DVD414L	AB033	AB067	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQ RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYC CSYAGSSIFVIFGGGTKVTVLG

Ejemplo 2.135: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 168

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
635	DVD417H	AB067	AB033	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQSG PGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK GLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQV FFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGT LVTVSA
636	DVD417L	AB067	AB033	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVV SWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG TKVTVLG**QPKAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFS CRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISG IPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNN NWPTTFGAGTKLELKR
637	DVD418H	AB033	AB067	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGK GLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGT LVTVSS
638	DVD418L	AB033	AB067	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS DVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSN RFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSS IFVIFGGGTKVTVLG

Ejemplo 2.136: Generación de DVD-Igs de EGFR (seq. 2) y ErbB3 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 169

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
639	DVD421H	AB067	AB033	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPS QSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGV IWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSL QSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
640	DVD421L	AB067	AB033	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVV SWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG TKVTVLG**QPKAAPSVTLFPP**DILLTQSPVILSVSP GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKY ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIAD YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR
641	DVD422H	AB033	AB067	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVSS ISSSGGWTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTLVTVSS
642	DVD422L	AB033	AB067	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQ RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYC CSYAGSSIFVIFGGGTKVTVLG

Ejemplo 2.137: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 170

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
643	DVD411H	AB067	AB004	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
644	DVD411L	AB067	AB004	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVV SWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG TKVTVLG**QPKAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIKR
645	DVD412H	AB004	AB067	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVS SISSSGGWTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTLVTVSS
646	DVD412L	AB004	AB067	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS DVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSN RFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSS IFVIFGGGTKVTVLG

Ejemplo 2.138: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 171

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
647	DVD415H	AB067	AB004	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSS
648	DVD415L	AB067	AB004	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVV SWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG TKVTVLG**QPKAAPSVTLFPP**DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR
649	DVD416H	AB004	AB067	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPG KGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQG TLVTVSS
650	DVD416L	AB004	AB067	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQ RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYC CSYAGSSIFVIFGGGTKVTVLG

5

Ejemplo 2.139: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 172

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
651	DVD419H	AB067	AB004	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSS
652	DVD419L	AB067	AB004	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVV SWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG TKVTVLG**QPKAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIKR
653	DVD420H	AB004	AB067	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPG KGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQG TLVTVSS
654	DVD420L	AB004	AB067	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS DVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSN RFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSS IFVIFGGGTKVTVLG

5

Ejemplo 2.140: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y ErbB3 (seq. 3) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 173

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
655	DVD423H	AB067	AB004	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
656	DVD423L	AB067	AB004	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVV SWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG TKVTVLG**QPKAAPSVTLFPP**DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR
657	DVD424H	AB004	AB067	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVS SISSSGGWTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTLVTVSS
658	DVD424L	AB004	AB067	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQ RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYC CSYAGSSIFVIFGGGTKVTVLG

Ejemplo 2.141: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 174

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
659	DVD541H	AB074VH	AB014VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINT YTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRA EDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSS
660	DVD541L	AB074VL	AB014VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
661	DVD542H	AB014VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGL VQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSPGKGLE WLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKSQVFFK MNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTSVTVSS
662	DVD542L	AB014VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASE DIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRF SGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWT FGGGTKLEIKR

Ejemplo 2.142: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 175

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
663	DVD549H	AB074VH	AB014VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLE WVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQG TLVTVSS
664	DVD549L	AB074VL	AB014VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR
665	DVD550H	AB014VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQL KQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQ SPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNS KSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQG TSVTVSS
666	DVD550L	AB014VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVT ITCKASEDIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLE AGVPSRFSGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSTPWTFGGGTKLEIKR

Ejemplo 2.143: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 176

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
667	DVD557H	AB074VH	AB014VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLE WVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQG TLVTVSS
668	DVD557L	AB074VL	AB014VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
669	DVD558H	AB014VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQL KQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQ SPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNS KSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQG TSVTVSS
670	DVD558L	AB014VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASE DIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRF SGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWT FGGGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.144: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 1) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 177

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
671	DVD565H	AB074VH	AB014VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINT YTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRA EDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSS
672	DVD565L	AB074VL	AB014VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR
673	DVD566H	AB014VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGL VQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSPGKGLE WLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKSQVFFK MNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTSVTVSS
674	DVD566L	AB014VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVT ITCKASEDIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLE AGVPSRFSGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSTPWTFGGGTKLEIKR

Ejemplo 2.145: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 178

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
675	DVD543H	AB074VH	AB070VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITP AGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSS
676	DVD543L	AB074VL	AB070VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
677	DVD544H	AB070VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQP SQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSPGKGLEWLG VMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKSQVFFKMNS LQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTSVTVSS
678	DVD544L	AB070VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASE DIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRF SGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWT FGGGTKLEIKR

Ejemplo 2.146: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 179

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
679	DVD551H	AB074VH	AB070VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLE WVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLV TVSS
680	DVD551L	AB074VL	AB070VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYTTPPTFGQGTKVEIKR
681	DVD552H	AB070VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQS GPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSPG KGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKSQ VFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTSV TVSS
682	DVD552L	AB070VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVT ITCKASEDIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLE AGVPSRFSGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSTPWTFGGGTKLEIKR

Ejemplo 2.147: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 180

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
683	DVD559H	AB074VH	AB070VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLE WVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLV TVSS
684	DVD559L	AB074VL	AB070VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
685	DVD560H	AB070VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQS GPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSPG KGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKSQ VFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTSV TVSS
686	DVD560L	AB070VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASE DIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRF SGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWT FGGGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.148: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 2) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 181

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
687	DVD567H	AB074VH	AB070VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITP AGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSS
688	DVD567L	AB074VL	AB070VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYTTPPTFGQGTKVEIKR
689	DVD568VH	AB070VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQP SQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSPGKGLEWLG VMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKSQVFFKMNS LQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTSVTVSS
690	DVD568VL	AB070VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVT ITCKASEDIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLE AGVPSRFSGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSTPWTFGGGTKLEIKR

Ejemplo 2.149: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 182

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
691	DVD545H	AB074VH	AB071VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAIYP YSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVSS
692	DVD545L	AB074VL	AB071VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ VIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLT FGQGTKVEIKR
693	DVD546H	AB071VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQ PSQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSPGKGLEWL GVMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKSQVFFKMN SLQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTSVTVSS
694	DVD546L	AB071VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASE DIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRF SGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWT FGGGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.150: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 183

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
695	DVD553H	AB074VH	AB071VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLE WVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTL VTVSS
696	DVD553L	AB074VL	AB071VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKVEIKR
697	DVD554H	AB071VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSSA**STKGPSVFPLAP**QVQLKQ SGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSP GKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKS QVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTS VTVSS
698	DVD554L	AB071VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVT ITCKASEDIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLE AGVPSRFSGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSTPWTFGGGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.151: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 184

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
699	DVD561H	AB074VH	AB071VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLE WVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTL VTVSS
700	DVD561L	AB074VL	AB071VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ VIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLT FGQGTKVEIKR
701	DVD562H	AB071VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQ SGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSP GKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKS QVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTS VTVSS
702	DVD562L	AB071VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASE DIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRF SGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWT FGGGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.152: Generación de DVD-Igs de VEGF (seq. 3) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 185

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
703	DVD569H	AB074VH	AB071VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAIYP YSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVSS
704	DVD569L	AB074VL	AB071VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKVEIKR
705	DVD570H	AB071VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQ PSQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSPGKGLEWL GVMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKSQVFFKMN SLQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTSVTVSS
706	DVD570L	AB071VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVT ITCKASEDIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLE AGVPSRFSGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSTPWTFGGGTKLEIKR

Ejemplo 2.153: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 186

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
707	DVD547H	AB074VH	AB004VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
708	DVD547L	AB074VL	AB004VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT FGQGTKVEIKR
709	DVD548H	AB004VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQP SQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSPGKGLEWLG VMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKSQVFFKMNS LQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTSVTVSS
710	DVD548L	AB004VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASE DIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRF SGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWT FGGGTKLEIKR

Ejemplo 2.154: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 187

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
711	DVD555H	AB074VH	AB004VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLV TVSS
712	DVD555L	AB074VL	AB004VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ HYTTPPTFGQGTKVEIKR
713	DVD556H	AB004VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQS GPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSPG KGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKSQ VFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTSV TVSS
714	DVD556L	AB004VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVT ITCKASEDIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLE AGVPSRFSGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSTPWTFGGGTKLEIKR

Ejemplo 2.155: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 188

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
715	DVD563H	AB074VH	AB004VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLV TVSS
716	DVD563L	AB074VL	AB004VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT FGQGTKVEIKR
717	DVD564H	AB004VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQS GPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSPG KGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKSQ VFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTSV TVSS
718	DVD564L	AB004VL	AB074VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASE DIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRF SGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWT FGGGTKLEIKR

Ejemplo 2.156: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y PLGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 189

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
719	DVD571H	AB074VH	AB004VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGIH WVRQSPGKGLEWLGVMWSGGDTDYDAAFISRLSIS KDNSKSQVFFKMNSLQANDTGIYYCARYRFYGMDY WGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
720	DVD571L	AB074VL	AB004VL	AIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRFAW YQQKPGNAPRLLISGAASLEAGVPSRFSGSGSGQD YTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ HYTTPPTFGQGTKVEIKR
721	DVD572H	AB004VH	AB074VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQP SQSLSITCTVSGFSLTTYGIHWVRQSPGKGLEWLG VMWSGGDTDYDAAFISRLSISKDNSKSQVFFKMNS LQANDTGIYYCARYRFYGMDYWGQGTSVTVSS
722	DVD572L	AB004VL	AB004VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**AIQMTQSSSSFSVSLGDRVT ITCKASEDIYNRFAWYQQKPGNAPRLLISGAASLE AGVPSRFSGSGSGQDYTLSITSLQTEDVATYYCQQ YWSTPWTFGGGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.157: Generación de DVD-Igs de PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 191

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
723	DVD573H	AB047VH	AB070VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWV KLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDT SSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTL LTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADS VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFV FFLPYAMDYWGQGTLVTVSS
724	DVD573L	AB047VL	AB070VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMRKS FLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSG TDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGSGTKLEI KR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVS TAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKV EIKR
725	DVD574H	AB070VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWV RQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWG QGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELVKPGASVKISC KASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTK YNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFC VRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
726	DVD574L	AB070VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR**TVA AP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSG SGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGSGTKL EIKR

Ejemplo 2.158: Generación de DVD-Igs de PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 192

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
727	DVD581H	AB047VH	AB070VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLE WVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLV TVSS
728	DVD581L	AB047VL	AB070VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR
729	DVD582H	AB070VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQS GAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPG QGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSS TAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLL TVSS
730	DVD582L	AB070VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVT MNCKSSQSLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA VYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR

Ejemplo 2.159: Generación de DVD-Igs de PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 193

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
731	DVD589VH	AB047VH	AB070VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLE WVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLV TVSS
732	DVD589VL	AB047VL	AB070VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY TTPPTFGQGTKVEIKR
733	DVD590VH	AB070VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQS GAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPG QGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSS TAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLL TVSS
734	DVD590VL	AB070VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQ SLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQS YHLFTFGSGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.160: Generación de DVD-Igs de PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 194

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
735	DVD597VH	AB047VH	AB070VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITP AGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSS
736	DVD597VL	AB047VL	AB070VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR
737	DVD598VH	AB070VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELVKP GASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLEWIG WIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLS SLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
738	DVD598VL	AB070VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVT MNCKSSQSLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA VYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.161: Generación de DVD-Igs de PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 195

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
739	DVD575H	AB047VH	AB071VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAIYP YSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVSS
740	DVD575L	AB047VL	AB071VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSN TSPLTFGQGTKVEIKR
741	DVD576H	AB071VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELVK PGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLEWI GWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQL SSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
742	DVD576L	AB071VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQ SLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQS YHLFTFGSGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.162: Generación de DVD-Igs de PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 196

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
743	DVD583H	AB047VH	AB071VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLE WVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTL VTVSS
744	DVD583L	AB047VL	AB071VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYA ASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSNTSPLTFGQGTKVEIKR
745	DVD584H	AB071VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQ SGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAP GQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSS STAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTL LTVSS
746	DVD584L	AB071VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVT MNCKSSQSLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA VYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.163: Generación de DVD-Igs de PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 197

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
747	DVD591VH	AB047VH	AB071VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLE WVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTL VTVSS
748	DVD591VL	AB047VL	AB071VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSN TSPLTFGQGTKVEIKR
749	DVD592VH	AB071VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQ SGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAP GQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSS STAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTL LTVSS
750	DVD592VL	AB071VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQ SLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQS YHLFTFGSGTKLEIKR

Ejemplo 2.164: Generación de DVD-Igs de PLGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 198

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
751	DVD599VH	AB047VH	AB071VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAIYP YSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVSS
752	DVD599VL	AB047VL	AB071VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYA ASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSNTSPLTFGQGTKVEIKR
753	DVD600VH	AB071VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELVK PGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLEWI GWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQL SSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
754	DVD600VL	AB071VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVT MNCKSSQSLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA VYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.165: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 199

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
755	DVD577H	AB047VH	AB004VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
756	DVD577L	AB047VL	AB004VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIKR
757	DVD578H	AB004VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELVKP GASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLEWIG WIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLS SLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
758	DVD578L	AB004VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQ SLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQS YHLFTFGSGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.166: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 200

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
759	DVD585H	AB047VH	AB004VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLV TVSS
760	DVD585L	AB047VL	AB004VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR
761	DVD586H	AB004VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQS GAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPG QGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSS TAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLL TVSS
762	DVD586L	AB004VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVT MNCKSSQSLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA VYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR

Ejemplo 2.167: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 201

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
763	DVD593VH	AB047VH	AB004VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLV TVSS
764	DVD593VL	AB047VL	AB004VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIKR
765	DVD594VH	AB004VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQS GAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPG QGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSS TAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLL TVSS
766	DVD594VL	AB004VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQ SLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQS YHLFTFGSGTKLEIKR

Ejemplo 2.168: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y PLGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 202

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
767	DVD601VH	AB047VH	AB004VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
768	DVD601VL	AB047VL	AB004VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR
769	DVD602VH	AB004VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELVKP GASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLEWIG WIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLS SLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
770	DVD602VL	AB004VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVT MNCKSSQSLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA VYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR

Ejemplo 2.169: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 203

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
771	DVD643H	AB012VH	AB070VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQA PGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYW GQGTLVTVSS
772	DVD643L	AB012VL	AB070VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYTTPPTFGQGTKVEIKR
773	DVD644H	AB070VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLVES GGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPG KGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYW GQGTLVTVSS
774	DVD644L	AB070VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQ SGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANGFPWTFGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.170: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 204

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
775	DVD649H	AB012VH	AB070VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQA PGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYW GQGTLVTVSS
776	DVD649L	AB012VL	AB070VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
777	DVD650H	AB070VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLVES GGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPG KGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYW GQGTLVTVSS
778	DVD650L	AB070VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRF GGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWT FGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.171: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 205

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
779	DVD655H	AB012VH	AB070VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEW VAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVT VSS
780	DVD655L	AB012VL	AB070VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYTTPPTFGQGTKVEIKR
781	DVD656H	AB070VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVS YISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGTLVT VSS
782	DVD656L	AB070VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQ SGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANGFPWTFGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.172: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 206

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
783	DVD709VH	AB012VH	AB070VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEW VAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVT VSS
784	DVD709VL	AB012VL	AB070VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
785	DVD710VH	AB070VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVS YISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGTLVT VSS
786	DVD710VL	AB070VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRF GGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWT FGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.173: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 207

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD .	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
787	DVD645H	AB012VH	AB071VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQA PGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDY WGQGTLVTVSS
788	DVD645L	AB012VL	AB071VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKVEIKR
789	DVD646H	AB071VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLVE SGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAP GKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDY WGQGTLVTVSS
790	DVD646L	AB071VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQ SGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANGFPWTFGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.174: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 208

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
791	DVD651H	AB012VH	AB071VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQA PGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDY WGQGTLVTVSS
792	DVD651L	AB012VL	AB071VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ VIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLT FGQGTKVEIKR
793	DVD652H	AB071VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLVE SGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAP GKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDY WGQGTLVTVSS
794	DVD652L	AB071VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRF GGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWT FGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.175: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 209

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
795	DVD657H	AB012VH	AB071VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEW VGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLV TVSS
796	DVD657L	AB012VL	AB071VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKVEIKR
797	DVD658H	AB071VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGLVK PGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGTLV TVSS
798	DVD658L	AB071VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQ SGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANGFPWTFGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.176: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 1) y VEGF (seq. 3) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 210

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
799	DVD711VH	AB012VH	AB071VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEW VGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLV TVSS
800	DVD711VL	AB012VL	AB071VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ VIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLT FGQGTKVEIKR
801	DVD712VH	AB071VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGLVK PGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGTLV TVSS
802	DVD712VL	AB071VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRF GGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWT FGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.177: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 211

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
803	DVD659H	AB079VH	AB014VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMH WVRQMPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTI SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWI NTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSL RAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTV SS
804	DVD659L	AB079VL	AB014VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSW YQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYTFGQGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
805	DVD660H	AB014VH	AB079VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMHWVRQMPGKGLE WMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIFDYWGQGTLVTV SS
806	DVD660L	AB014VL	AB079VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASE NVVSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYT FGQGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.178: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 212

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
807	DVD665H	AB079VH	AB014VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMH WVRQMPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTI SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKG LEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA YLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWG QGTLVTVSS
808	DVD665L	AB079VL	AB014VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSW YQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYTFGQGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR
809	DVD666H	AB014VH	AB079VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQL VQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMHWVRQ MPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIFDYWG QGTLVTVSS
810	DVD666L	AB014VL	AB079VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASENVVSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRN TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQ SYNYPYTFGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.179: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 213

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
811	DVD671VH	AB079VH	AB014VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMH WVRQMPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTI SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKG LEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA YLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWG QGTLVTVSS
812	DVD671VL	AB079VL	AB014VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSW YQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYTFGQGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
813	DVD672VH	AB014VH	AB079VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQL VQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMHWVRQ MPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIFDYWG QGTLVTVSS
814	DVD672VL	AB014VL	AB079VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASE NVVSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYT FGQGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.180: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 1) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 214

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
815	DVD677VH	AB079VH	AB014VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMH WVRQMPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTI SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWI NTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSL RAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTV SS
816	DVD677VL	AB079VL	AB014VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSW YQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYTFGQGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR
817	DVD678VH	AB014VH	AB079VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGAEV KKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMHWVRQMPGKGLE WMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIFDYWGQGTLVTV SS
818	DVD678VL	AB014VL	AB079VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASENVVSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRN TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQ SYNYPYTFGQGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.181: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 215

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
819	DVD661H	AB079VH	AB070VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMH WVRQMPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTI SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGI TPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSS
820	DVD661L	AB079VL	AB070VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSW YQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYTFGQGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
821	DVD662H	AB070VH	AB079VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGAEVKKP GESLKISCKGSGYSFTTYWMHWVRQMPGKGLEWMG EINPTNGHTNYNPSFQGQVTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYYCARNYVGSIFDYWGQGTLVTVSS
822	DVD662L	AB070VL	AB079VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASE NVVSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYT FGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.182: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 216

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
823	DVD667H	AB079VH	AB070VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMH WVRQMPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTI SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKG LEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGT LVTVSS
824	DVD667L	AB079VL	AB070VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSW YQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYTFGQGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYTTPPTFGQGTKVEIKR
825	DVD668H	AB070VH	AB079VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVQS GAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMHWVRQMPG KGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIFDYWGQGT LVTVSS
826	DVD668L	AB070VL	AB079VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASENVVSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRN TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQ SYNYPYTFGQGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.183: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 217

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
827	DVD673VH	AB079VH	AB070VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMH WVRQMPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTI SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKG LEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGT LVTVSS
828	DVD673VL	AB079VL	AB070VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSW YQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYTFGQGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
829	DVD674VH	AB070VH	AB079VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVQS GAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMHWVRQMPG KGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIFDYWGQGT LVTVSS
830	DVD674VL	AB070VL	AB079VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASE NVVSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYT FGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.184: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 218

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
831	DVD679VH	AB079VH	AB070VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMH WVRQMPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTI SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGI TPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSS
832	DVD679VL	AB079VL	AB070VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSW YQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYTFGQGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYTTPPTFGQGTKVEIKR
833	DVD680VH	AB070VH	AB079VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGAEVKKP GESLKISCKGSGYSFTTYWMHWVRQMPGKGLEWMG EINPTNGHTNYNPSFQGQVTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYYCARNYVGSIFDYWGQGTLVTVSS
834	DVD680VL	AB070VL	AB079VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASENVVSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRN TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQ SYNYPYTFGQGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.185: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 219

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
835	DVD663H	AB079VH	AB071VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMH WVRQMPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTI SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAI YPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVSS
836	DVD663L	AB079VL	AB071VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSW YQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYTFGQGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ VIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLT FGQGTKVEIKR
837	DVD664H	AB071VH	AB079VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGAEVKK PGESLKISCKGSGYSFTTYWMHWVRQMPGKGLEWM GEINPTNGHTNYNPSFQGQVTISADKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARNYVGSIFDYWGQGTLVTVSS
838	DVD664L	AB071VL	AB079VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASE NVVSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYT FGQGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.186: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 220

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
839	DVD669H	AB079VH	AB071VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMH WVRQMPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTI SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKG LEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQG TLVTVSS
840	DVD669L	AB079VL	AB071VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSW YQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYTFGQGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKVEIKR
841	DVD670H	AB071VH	AB079VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVQ SGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMHWVRQMP GKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIFDYWGQG TLVTVSS
842	DVD670L	AB071VL	AB079VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASENVVSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRN TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQ SYNYPYTFGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.187: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 221

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
843	DVD675VH	AB079VH	AB071VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMH WVRQMPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTI SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKG LEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQG TLVTVSS
844	DVD675VL	AB079VL	AB071VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSW YQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYTFGQGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ VIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLT FGQGTKVEIKR
845	DVD676VH	AB071VH	AB079VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVQ SGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMHWVRQMP GKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIFDYWGQG TLVTVSS
846	DVD676VL	AB071VL	AB079VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASE NVVSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYT FGQGTKLEIKR

5

Ejemplo 2.188: Generación de DVD-Igs de HGF (seq. 2) y VEGF (seq. 3) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 222

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
847	DVD681VH	AB079VH	AB071VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWMH WVRQMPGKGLEWMGEINPTNGHTNYNPSFQGQVTI SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARNYVGSIF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAI YPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVSS
848	DVD681VL	AB079VL	AB071VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSW YQQKPGKAPKLLIYGASNRNTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCGQSYNYPYTFGQGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKVEIKR
849	DVD682VH	AB071VH	AB079VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGAEVKK PGESLKISCKGSGYSFTTYWMHWVRQMPGKGLEWM GEINPTNGHTNYNPSFQGQVTISADKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARNYVGSIFDYWGQGTLVTVSS
850	DVD682VL	AB071VL	AB079VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASENVVSYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRN TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQ SYNYPYTFGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.189: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y HER2 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 1

Tabla 223

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
851	DVD687H	AB004VH	AB080VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVA DVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
852	DVD687L	AB004VL	AB080VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ DVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYT FGQGTKVEIKR
853	DVD688H	AB080VH	AB004VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMD WVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTL SVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFY FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
854	DVD688L	AB080VL	AB004VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAW YQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT FGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.190: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y HER2 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 2

Tabla 224

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
855	DVD689H	AB004VH	AB080VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPG KGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQG TLVTVSS
856	DVD689L	AB004VL	AB080VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YYIYPYTFGQGTKVEIKR
857	DVD690H	AB080VH	AB004VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMD WVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTL SVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFY FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSS
858	DVD690L	AB080VL	AB004VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAW YQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ HYTTPPTFGQGTKVEIKR

5

Ejemplo 2.191 Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y HER2 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 3

Tabla 225

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
859	DVD691H	AB004VH	AB080VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPG KGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQG TLVTVSS
860	DVD691L	AB004VL	AB080VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ DVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYT FGQGTKVEIKR
861	DVD692H	AB080VH	AB004VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMD WVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTL SVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFY FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSS
862	DVD692L	AB080VL	AB004VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAW YQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT FGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.192: Generación de DVD-Igs de HER2 (seq. 1) y HER2 (seq. 2) con conjunto de Enlazante 4

Tabla 226

SEQ ID NO	Nombre de Dominio Variable de DVD	Nombre de Dominio Variable Exterior	Nombre de Dominio Variable Interior	Secuencia 1234567890123456789012345678901234 5
863	DVD693H	AB004VH	AB080VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVA DVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
864	DVD693L	AB004VL	AB080VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YYIYPYTFGQGTKVEIKR
865	DVD694H	AB080VH	AB004VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMD WVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTL SVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFY FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
866	DVD694L	AB080VL	AB004VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAW YQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ HYTTPPTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.193: Secuencias de Vector de Clonación Usadas para Clonar las Secuencias de Anticuerpo Base y DVD-Ig

Tabla 226

Nombre del Vector	SEQ ID NO	Secuencias de Nucleótido 12345678901234567890123456789012345678901
V1	867	GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGC GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGG ATCCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAA TAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGG CAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCC

		CCGCCCCGGACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCG
		GGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGC
		CCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGA
		CTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTG
		GCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTG
		CCTTTATGTGTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACAT
		GTACCTCCCAGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATC
		AGAGGGGCCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCA
		ATAGTGTTTATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTC
		CCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGT
		TACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTA
		AGGAACAGCGATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATG
		GGGTCAGGATTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGG
		CTGAAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCT
		TCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAA
		GGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATA
		AAATTTGGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAA
		CCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCT
		GAATATCTTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACT
		GGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGT
		GCAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACA
		GGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGAC
		GCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAA
		CGGGGCTCCACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTT
		TTTTTGAAATTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTG
		CGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCC
		GCTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCC
		GGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGC
		TGCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAG
		GGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATG
		TTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC
		TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT
		ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCT
		GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA
		TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATG
		CTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGG
		TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATAT
		CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCT
		AATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA
		TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG
		GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT
		CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGA
		ATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAA
		TGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA
		TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA
		TCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG
		GAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGC
		GGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
		AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCT
		CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAAT
		GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGA
		CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTT
		GGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT
		AAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA
		CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA
		CAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAA
		TGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGC
		AACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG
		GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT
		GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG
		TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC
		CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA
		ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA
		ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCA
		TTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC
		CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA
		AAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG

60P

		CTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCA AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT ACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA CTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATA GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACA GCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCA CATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCC CGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTG GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTA GGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT TGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC CAAGCTCTAGCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAA GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCA TCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGAC TAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTAT TCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGC TTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATG GACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG GGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGG CAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGA TGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAG AACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTG CGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCG CTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGC TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGG TATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCG CACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACG GGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCC GTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGC GTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATG GAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCG GGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTC TTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGA ATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGT GGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAG ATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTTGGG CTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGC
V2	868	ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTTGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGA CCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTT GGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATT TGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGG ACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGC ATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCA CATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTG ACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATC CTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGT GTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCC

60R

		AGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCC
		TGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTT
		ATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGT
		AGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACG
		GGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGC
		GATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGA
		TTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATC
		AAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCC
		TTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGT
		GAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGA
		CGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAA
		ACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTT
		TAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCA
		TCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGA
		TACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCA
		TGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGC
		AGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCC
		ACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAA
		TTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGG
		ACTGTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCAC
		TGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATAC
		CTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTG
		GAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGG
		TCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGG
		GTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATA
		TCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCC
		TAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCAT
		AGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT
		GGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAA
		TAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATA
		CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGC
		ATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATAT
		CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCT
		AATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA
		TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCG
		GGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTG
		AAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGAT
		AATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG
		AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT
		GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT
		GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTG
		CCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA
		AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
		TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCAC
		TTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCA
		AGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA
		CTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT
		ATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCT
		GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGG
		GGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
		ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTT
		GCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATT
		AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC
		CCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG
		GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT
		CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG
		ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGA
		CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATT
		TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCC
		TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA
		AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC
		AAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACC
		AACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC
		TGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
		ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG
		TGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA
		TAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTT

		GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG GTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG AGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAG CGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTG GCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGG CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCA GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG ATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTA GCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCC TAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTT TTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGT AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAG ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTA GGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCG CACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAAC CGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTA CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGT AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGT AAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCC TTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC CGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGG AGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCG CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAA GTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTG GCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGT TTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTC GGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTC TCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGC CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGA AAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCG GCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTC CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTG GGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCT TTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG TTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGA CCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCACCATGGACATGCGCGTGCCCGCCC AGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGC
V3	869	CAACCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGA GTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGC AGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGC TGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACA GAATGTTCATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGACCT CGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGA ATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTGG TCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGGACG AACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGCATG TAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCACAT GTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACA TCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATCCTG GAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGTA ACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCCAGG GGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGT GTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATA AGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGT ATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGA AGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGCGAT ATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGATTC

		CACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG
		GAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCCTTC
		GTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG
		GTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGACGG
		GGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAAACC
		CCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTTTAA
		CAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCT
		CACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATAC
		TGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGT
		TGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGC
		GGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCCACG
		CCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAATTG
		TGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACT
		GTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCACTGC
		GGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTG
		CATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAG
		GACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGGTCC
		TCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTA
		GCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT
		GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA
		TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGG
		CTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGG
		TAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAG
		AGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTA
		CCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA
		TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG
		GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT
		TTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGC
		TATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGT
		AGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTGAAG
		ACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT
		AATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC
		CCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG
		ACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG
		TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCT
		TCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA
		TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAA
		GATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTT
		TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGA
		GCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC
		ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG
		CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGAC
		AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGA
		TCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
		AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG
		CAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT
		AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCT
		TCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTC
		TCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
		AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA
		GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCA
		AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAA
		AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA
		ACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG
		ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAA
		AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC
		TCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT
		TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC
		GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG
		CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA
		GGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGA
		GCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG
		CGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG
		GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA
		TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT
		GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGC
		CTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCC

		TGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGC TGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCC GATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAG TGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGC TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATA ACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCT AGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCA ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA CTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTA TTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATG GATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGT CTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC ATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGG TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTG GCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTG CGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGA GCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGC CCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCG CGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTC TCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTT TGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGC GAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCA AGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCC GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAG ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCG CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC GTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAG GCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGG GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT TTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGACCT CGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGACTTGGACCCCACTCCTCTTC CTCACCCTCCTCCTCCACTGCACAGGAAGCTTATCG
V4	870	ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTTGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGA CCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTT GGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATT TGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGG ACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGC ATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCA CATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTG ACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATC CTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGT GTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCC AGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCC TGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTT ATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGT AGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACG GGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGC GATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGA TTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATC AAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCC TTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGT GAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGA CGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAA ACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTT

		TAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCA TCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGA TACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCA TGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGC AGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCC ACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAA TTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGG ACTGTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCAC TGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATAC CTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTG GAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGG TCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGG GTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATA TCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCAT AGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT GGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAA TAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATA CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGC ATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATAT CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCT AATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCG GGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTG AAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGAT AATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTG CCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCAC TTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCA AGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA CTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT ATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCT GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGG GGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTT GCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATT AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC CCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGA CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATT TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCC TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC AAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACC AACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC TGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG TGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA TAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTT GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG GTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG AGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAG CGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTG GCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGG CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCA GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG

		ATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTA GCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCC TAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTT TTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGT AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAG ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTA GGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCG CACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAAC CGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTA CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGT AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGT AAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCC TTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC CGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGG AGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCG CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAA GTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTG GCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGT TTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTC GGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTC TCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGC CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGA AAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCG GCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTC CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTG GGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCT TTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG TTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGA CCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCACCATGACTTGGACCCCACTCCTCT TCCTCACCCTCCTCCTCCACTGCACAGGAAGCTTATCG
V5	871	CAACCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGA GTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGC AGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGC TGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACA GAATGTTCATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGACCT CGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGA ATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTGG TCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGGACG AACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGCATG TAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCACAT GTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACA TCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATCCTG GAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGTA ACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCCAGG GGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGT GTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATA AGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGT ATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGA AGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGCGAT ATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGATTC CACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG GAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCCTTC GTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG GTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGACGG GGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAAACC CCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTTTAA CAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCT CACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATAC TGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGT TGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGC GGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCCACG CCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAATTG

TGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACT
GTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCACTGC
GGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTG
CATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAG
GACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGGTCC
TCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTA
GCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT
GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA
TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGG
CTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGG
TAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAG
AGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTA
CCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA
TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG
GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT
TTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGC
TATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGT
AGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTGAAG
ACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT
AATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC
CCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG
ACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG
TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCT
TCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA
TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAA
GATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTT
TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGA
GCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC
ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG
CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGAC
AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGA
TCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG
CAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT
AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCT
TCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTC
TCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA
GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCA
AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAA
AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA
ACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG
ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAA
AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC
TCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT
TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC
GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG
CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA
GGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGA
GCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG
CGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG
GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA
TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT
GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGC
CTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCC
TGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGC
TGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA
GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCC
GATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAG
TGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGC
TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATA
ACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCT
AGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCA
ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA
CTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTA
TTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT
GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATG

		GATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGT CTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC ATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGG TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTG GCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTG CGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGA GCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGC CCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCG CGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTC TCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTT TGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGC GAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCA AGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCC GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAG ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCG CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC GTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAG GCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGG GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT TTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGACCT CGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGACATGCGCGTGCCCGCCCAG CTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGC
V7	872	GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCGGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGC GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGG ATCCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAA TAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGG CAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCC CCGCCCCGGACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCG GGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGC CCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGA CTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTG GCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTG CCTTTATGTGTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACAT GTACCTCCCAGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATC AGAGGGGCCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCA ATAGTGTTTATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTC CCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGT TACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTA AGGAACAGCGATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATG GGGTCAGGATTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGG CTGAAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCT TCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAA GGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATA AAATTTGGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAA

		CCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCT GAATATCTTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACT GGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGT GCAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACA GGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGAC GCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAA CGGGGCTCCACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTT TTTTTGAAATTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTG CGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCC GCTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCC GGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGC TGCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAG GGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATG TTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCT GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATG CTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGG TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATAT CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCT AATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGA ATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAA TGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA TCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG GAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGC GGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCT CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAAT GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGA CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTT GGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT AAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA CAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAA TGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGC AACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCA TTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA AAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG CTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCA AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT ACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA CTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATA GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACA GCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCA CATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCC CGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTG GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTA

		GGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT TGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC CAAGCTCTAGCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAA GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCA TCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGAC TAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTAT TCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGC TTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATG GACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG GGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGG CAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGA TGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAG AACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTG CGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCG CTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGC TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGG TATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCG CACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACG GGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCC GTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGC GTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATG GAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCG GGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTC TTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGA ATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGT GGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAG ATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTTGGG CTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGC

La presente invención incorpora mediante referencia en su totalidad técnicas bien conocidas en el campo de biología molecular y liberación de fármaco. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a las técnicas descritas en las siguientes publicaciones:

Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &Sons, NY (1993);

Ausubel, F.M. et al. eds., Corto Protocols In Molecular Biology (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X).

Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, New York (1984);

Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999);

Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984);

Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981;

Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);

Kabat et al., Secuencias of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991);

Kabat, E.A., *et al.* (1991) Secuencias of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health y Human Services, NIH Publication No. 91-3242;

Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

Kriegler, Gene Transfer y Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);

Lu y Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).

Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);

Old, R.W. & S.B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).

Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).

Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978

Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgaufts). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

Incorporación mediante Referencia

Los contenidos de todas las referencias citadas (incluyendo referencias de la literatura, patentes, solicitudes de patente, y sitios web) que pueden ser citados a lo largo de esta solicitud están aquí incorporados expresamente mediante referencia en su totalidad, como lo están las referencias allí citadas. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra forma, técnicas convencionales de inmunogología, biología molecular y biología celular, las cuales son bien conocidas en la técnica.

Equivalentes

La invención puede ser expresada en otras formas específicas sin apartarse del espíritu o características esenciales de la misma. Las realizaciones anteriores son, por lo tanto, consideradas en todos los aspectos como ilustrativas en lugar de limitantes de la invención aqupi descrita. El alcance de la invención es entonces indicado mediante las reivindicaciones anexas en lugar de la descripción anterior, y todos los cambios que vienen dentro del significado y rango de equivalencia de las reivindicaciones pretende, por consiguiente, estar aquí abarcado.

REIVINDICACIONES

Reivindicamos:

1. Una proteína de unión que comprende una cadena de polipéptido, en donde dicha cadena de polipéptido comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde;

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena pesada;

(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y

(X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente,

en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de CD-20 y CD-19; CD-20 y CD-80; CD-20 y CD-22; CD-20 y CD-40; CD-3 y HER-2; CD-3 y CD-19; EGFR y HER-2; EGFR y CD-3; EGFR e IGF1,2; EGFR e IGF1R; EGFR y RON; EGFR y HGF; EGFR y c-MET; HER-2 e IGF1,2; HER-2 e IGF1R; RON y HGF; VEGF y EGFR; VEGF y HER-2; VEGF y CD-20; VEGF e IGF1,2; VEGF y DLL4; VEGF y HGF; VEGF y RON; VEGF y NRP1; CD-20 y CD3; DLL-4 y PLGF; VEGF y PLGF, ErbB3 y EGFR, HER-2 y ErbB3, ErbB3 y HGF; HER-2 y PLGF, y HER-2 y HER-2.

2. La proteína de unión de la reivindicación 1, en donde VD1 y VD2 comprenden una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, y 93.

3. Una proteína de unión que comprende una cadena de polipéptido, en donde dicha cadena de polipéptido comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde;

VD1 es un dominio variable de cadena ligera pesada obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

VD2 es un dominio variable de cadena ligera pesada obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena ligera;

(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y

(X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente,

en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de CD-20 y CD-19; CD-20 y CD-80; CD-20 y CD-22; CD-20 y CD-40; CD-3 y HER-2; CD-3 y CD-19; EGFR y HER-2; EGFR y CD-3; EGFR e IGF1,2; EGFR e IGF1R; EGFR y RON; EGFR y HGF; EGFR y c-MET; HER-2 e IGF1,2; HER-2 e IGF1R; RON y HGF; VEGF y EGFR; VEGF y HER-2; VEGF y CD-20; VEGF e IGF1,2; VEGF y DLL4; VEGF y HGF; VEGF y RON; VEGF y NRP1; CD-20 y CD3; DLL-4 y PLGF; VEGF y PLGF, ErbB3 y EGFR, HER-2 y ErbB3, ErbB3 y HGF; HER-2 y PLGF, y HER-2 y HER-2.

4. La proteína de unión de la reivindicación 3, en donde los dominios variables de cadena ligera de VD1 y VD2 comprenden una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, y 94.

5. La proteína de unión de la reivindicación 1 o 3, en donde (X2)n está ausente.

6. Una proteína de unión que comprende primera y segunda cadenas de polipéptido, en donde,

dicha primera cadena de polipéptido comprende un primer VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena pesada;

(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y

(X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; y

en donde dicha secunda cadena de polipéptido comprende un segundo VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena ligera;

(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y

(X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de CD-20 y CD-19; CD-20 y CD-80; CD-20 y CD-22; CD-20 y CD-40; CD-3 y HER-2; CD-3 y CD-19; EGFR y HER-2; EGFR y CD-3; EGFR e IGF1,2; EGFR e IGF1R; EGFR y RON; EGFR y HGF; EGFR y c-MET; HER-2 e IGF1,2; HER-2 e IGF1R; RON y HGF; VEGF y EGFR; VEGF y HER-2; VEGF y CD-20; VEGF e IGF1,2; VEGF y DLL4;

VEGF y HGF; VEGF y RON; VEGF y NRP1; CD-20 y CD3; DLL-4 y PLGF; VEGF y PLGF, ErbB3 y EGFR, HER-2 y ErbB3, ErbB3 y HGF; HER-2 y PLGF, y HER-2 y HER-2.

7. La proteína de unión de la reivindicación 6, en donde los dominios variables de cadena pesada de VD1 y VD2 comprenden una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, y 93 y en donde los dominios variables de cadena ligera de VD1 y VD2 comprenden una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, y 94.

8. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, o 6, en donde (X2)n es una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs 1-26.

9. La proteína de unión de la reivindicación 6, en donde la proteína de unión comprende dos primeras cadenas de polipéptido y dos segundas cadenas de polipéptido.

10. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, o 6, en donde la región Fc es seleccionada del grupo que consiste de región Fc de secuencia nativa y una región Fc de secuencia variante.

11. La proteína de unión de la reivindicación 10, en donde la región Fc es seleccionada del grupo que consiste de una región Fc de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, e IgD.

12. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, o 6, en donde dicho VD1 de la primera cadena de polipéptido y dicho VD1 de la segunda cadena de

polipéptido se obtienen del mismo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo.

13. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, o 6, en donde dicho VD1 de la primera cadena de polipéptido y dicho VD1 de la segunda cadena de polipéptido se obtienen de diferentes anticuerpos base o porción de unión a antígeno de los mismos.

14. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, o 6, en donde dicho VD2 de la primera cadena de polipéptido y dicho VD2 de la segunda cadena de polipéptido se obtienen del mismo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo.

15. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, o 6, en donde dicho VD2 de la primera cadena de polipéptido y dicho VD2 de la segunda cadena de polipéptido se obtienen de diferentes anticuerpos base o porción de unión a antígeno de los mismos.

16. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, o 6, en donde dicho primer y segundo anticuerpos base se unen a diferentes epítopos sobre dicho antígeno.

17. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, o 6, en donde dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une a dicho primer antígeno con una potencia diferente de la potencia con la cual dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une a dicho segundo antígeno.

18. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, o 6, en donde dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une a dicho primer antígeno con una afinidad diferente a la afinidad con la cual dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une a dicho segundo antígeno.

19. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, o 6, en donde dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, y dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, son seleccionados del grupo que consiste de un anticuerpo humano, un anticuerpo de CDR injertada, y un anticuerpo humanizado.

20. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, o 6, en donde dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, y dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, son seleccionados del grupo que consiste de un fragmento Fab; un fragmento $F(ab')_2$; un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por medio de un puente de disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento de dAb; una región determinante de complementariedad (CDR) aislada; un anticuerpo de cadena sencilla; y un diacuerpo.

21. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, o 6, en donde dicha proteína de unión posee al menos una propiedad deseada exhibida por dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, o dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo.

22. La proteína de unión de la reivindicación 21, en donde dicha propiedad deseada se selecciona de uno o más parámetros de anticuerpo.

23. La proteína de unión de la reivindicación 21, en donde dichos parámetros de anticuerpo son seleccionados del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítopo, estabilidad, solubilidad, eficiencia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y unión a antígeno ortólogo.

24. Una DVD-Ig capaz de unirse a dos antígenos que comprende cuatro cadenas de polipéptido, en donde las cadenas de polipéptido primera y tercera comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena pesada;

(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y

(X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; y

en donde las cadenas de polipéptido segunda y cuarta comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena ligera;

(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y

(X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente, en donde los dominios variables de cadena pesada de VD1 y VD2 comprenden una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, y 93 y en donde los dominios variables de cadena ligera de VD1 y VD2 comprenden una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, y 94.

25. Una DVD-Ig capaz de unirse a dos antígenos, que comprende cuatro cadenas de polipéptido, en donde las cadenas de polipéptido primera y tercera comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena pesada;

(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y

(X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; y

en donde las cadenas de polipéptido segunda y cuarta comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena ligera;

(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y

(X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente, en donde la DVD-Ig se une a al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste de CD-20, CD-19, CD-80, CD-22, CD-40, CD-3, HER-2, EGFR, IGF1,2, IGF1R, RON, HGF, c-MET, VEGF, DLL4, NRP1, PLGF, y ErbB3.

26. Un método para generar una Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual capaz de unirse a dos antígenos, que comprende los pasos de

a) obtener un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse a un primer antígeno;

b) obtener un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse a un segundo antígeno;

c) construir las cadenas de polipéptido primera y tercera que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde
VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;
VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;
C es un dominio constante de cadena pesada;
(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y
(X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente;
d) construir las cadenas de polipéptido segunda y cuarta que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde
VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;
VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de dicho segundo anticuerpo base o unión a antígeno del mismo;
C es un dominio constante de cadena ligera;
(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y
(X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente;
e) expresar dichas cadenas de polipéptido primera, segunda, tercera y cuarta;

de forma que se genera una Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual capaz de unirse a dichos primer y segundo antígeno, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de CD-20 y CD-19; CD-20 y CD-80; CD-20 y CD-22; CD-20 y CD-40; CD-3 y HER-2; CD-3 y CD-19; EGFR y HER-2; EGFR y CD-3; EGFR e IGF1,2; EGFR e IGF1R; EGFR y RON; EGFR y HGF; EGFR y c-MET; HER-2 e IGF1,2; HER-2 e IGF1R; RON y HGF; VEGF y EGFR; VEGF y HER-2; VEGF y CD-20; VEGF e IGF1,2; VEGF y DLL4; VEGF y HGF; VEGF y RON; VEGF y NRP1;

CD-20 y CD3; DLL-4 y PLGF; VEGF y PLGF, ErbB3 y EGFR, HER-2 y ErbB3, ErbB3 y HGF; HER-2 y PLGF, y HER-2 y HER-2.

27. El método de la reivindicación 26, en donde los dominios variables de cadena pesada de VD1 y VD2 comprenden una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, y 93 y en donde los dominios variables de cadena ligera de VD1 y VD2 comprenden una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, y 94.

28. El método de la reivindicación 26, en donde dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, y dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, son seleccionados del grupo que consiste de un anticuerpo humano, un anticuerpo de CDR injertada, y un anticuerpo humanizado.

29. El método de la reivindicación 26, en donde dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, y dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, son seleccionados del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados mediante un puente de disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, un fragmento dAb, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, un anticuerpo de cadena sencilla, y diacuerpos.

30. El método de la reivindicación 26, en donde dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo posee al menos una propiedad deseada exhibida por la Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual.

31. El método de la reivindicación 26, en donde dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo posee al menos una propiedad exhibida por la Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual.

32. El método de la reivindicación 26, en donde la región Fc es seleccionada del grupo que consiste de una región Fc de secuencia nativa y una región fc de secuencia variante.

33. El método de la reivindicación 26, en donde la región Fc es seleccionada del grupo que consiste de una región Fc de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, e IgD.

34. El método de la reivindicación 30, en donde dicha propiedad deseada se selecciona de uno o más parámetros de anticuerpo.

35. El método de la reivindicación 31, en donde dicha propiedad deseada se selecciona de uno o más parámetros de anticuerpo.

36. El método de la reivindicación 34, en donde dichos parámetros de anticuerpo son seleccionados del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítopo, estabilidad, solubilidad, eficiencia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y unión a antígeno ortólogo.

37. El método de la reivindicación 35, en donde dichos parámetros de anticuerpo son seleccionados del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítopo, estabilidad, solubilidad, eficiencia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y unión a antígeno ortólogo.

38. El método de la reivindicación 26, en donde dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une a dicho primer antígeno con una afinidad diferente que la afinidad con la cual dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une a dicho segundo antígeno.

39. El método de la reivindicación 26, en donde dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une a dicho primer antígeno con una potencia diferente a la potencia con la cual dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, se une a dicho segundo antígeno.

40. Un método para generar una Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual capaz de unirse a dos antígenos con propiedades deseadas, que comprende los pasos de

a) obtener un primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse a un primer antígeno y poseer el menos una propiedad deseada exhibida por la Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual;

b) obtener un segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse a un segundo antígeno y poseer al menos una propiedad deseada exhibida por la Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual;

c) construir las cadenas de polipéptido primer y tercera que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde;

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena pesada;

(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y

(X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente;

d) construir las cadenas de polipéptido segunda y cuarta que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde;

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de dicho primer anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de dicho segundo anticuerpo base o porción de unión a antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena ligera;

(X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y

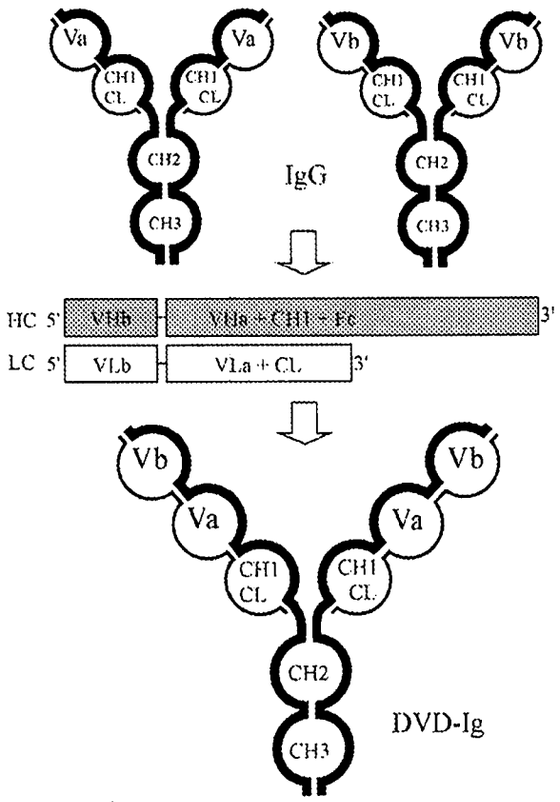
(X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente;

e) expresar dichas cadenas de polipéptido primera, segunda, tercera y cuarta;

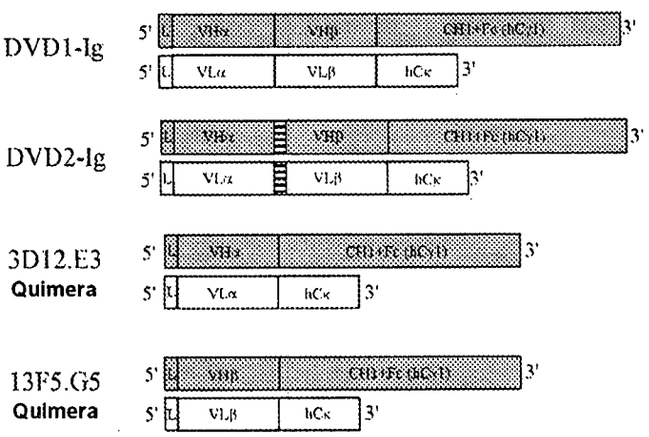
de forma que se genera una Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual capaz de unirse a dichos primer y segundo antígenos con las propiedades deseadas, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de CD-20 y CD-19; CD-20 y CD-80; CD-20 y CD-22; CD-20 y CD-40; CD-3 y HER-2; CD-3 y CD-19; EGFR y HER-2; EGFR y CD-3; EGFR e IGF1,2; EGFR e IGF1R; EGFR y RON; EGFR y HGF; EGFR y c-MET; HER-2 e IGF1,2; HER-2 e IGF1R; RON y HGF; VEGF y EGFR; VEGF y HER-2; VEGF y CD-20; VEGF e IGF1,2; VEGF y DLL4; VEGF y HGF; VEGF y RON; VEGF y NRP1; CD-20 y CD3; DLL-4 y PLGF; VEGF y PLGF, ErbB3 y EGFR, HER-2 y ErbB3, ErbB3 y HGF; HER-2 y PLGF, y HER-2 y HER-2.

Figura 1

A


Va
Va
Vb
Vb
CH1
CL
CH2
CH3
IgG
HC 5'
VHb
VHa + CH1 + Fc
3'
LC 5'
VLb
VLa + CL
3'
DVD-Ig

B


DVD1-Ig
DVD2-Ig
3D12.E3
Quimera
13F5.G5
Quimera
5'
3'
VLα
VLβ
hCκ

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-134183- -00000-0000

Fecha: 2010-10-28 16:57:41 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 628

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- 1 ☒ Indicación que se solicita una PCT
- 42 ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- 2 ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 93 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

BICENTENARIO 1819 2019

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
ABBOTT LABORATORIES

REFERENCIA	Radicación No.	10 134183
	Solicitud internacional	PCT/US2009/041945
	Fecha inicio fase nacional	29/11/2010
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	10 00599

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 14 ENE. 2011
adpa11

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
ABBOTT LABORATORIES

REFERENCIA	Radicación No.	10 134183
	Solicitud internacional	PCT/US2009/041945
	Fecha inicio fase nacional	29/11/2010
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del titulo primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 14 ENE. 2011
adpa11