SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-161641- -00000-0000
Fecha: 2011-11-24 17:31:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 486

**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

# SOLICITUD
# PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE No. _____

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

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C12P 21/08**

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)

# PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-161641- -00000-0000
Fecha: 2011-11-24 17:31:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 486

## 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**<br>Dirección: 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, Estados Unidos de América.<br>Nacionalidad o Domicilio: Abbott Park, Estado de Illinois, Estados Unidos de América.<br>Lugar de Constitución: Estado de Illinois, Estados Unidos de América.<br>Teléfono: 3264270 Fax: 6069701<br>E-mail: jllcco@lloredacamacho.com | **IDENTIFICACION**<br>C.C. ☐ NIT ☐<br>C.E. ☐ Otro ☐<br>Cual _____<br>Número _____ |
| **③ REPRESENTANTE O APODERADO** | Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**<br>Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia<br>Teléfono: 3264270 Fax: 6069701<br>E-mail: jllcco@lloredacamacho.com | C.C. ☒ NIT ☐<br>C.E. ☐ Otro ☐<br>Cual _____<br>Número 39.690.713 TP 53.215 |
| **④ INVENTOR(ES) (72)** | Nombre: GHAYUR, Tariq; LIU, Junjian; KINGSBURY, Gillian, A.; REILLY, Edward, B. y MORGAN-LAPPE, Susan, E.<br>Dirección: 1014 Washington Street, Holliston, Massachusetts 01746; 14 Crimson Drive, Shrewsbury, Massachusetts 01545; 46 Aqueduct Road, Wayland, Massachusetts 01778; 1136 Winners Circle, Libertyville, Illinois 60048 y 5419 North Canfield Avenue, Chicago, Illinois 60656.<br>Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América. | |

**⑤ PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/033231 Fecha: 30/04/10

Publicación Internacional No. WO 2010/127284 A3 Fecha: 04/11/10

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

**⑦ Clasificación Internacional (51)** C12P 21/08

**⑧ Prioridad** SI ☒ NO ☐

| (33) País de Origen | (32) Fecha | (31) Número de Solicitud |
|---|---|---|
| US | 01/05/09 | 61/174,711 |

**⑨ Comprobante de Pago No.** 11-111110 **Fecha:** 15 de Noviembre de 2011

1

(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 T.P. 53.215

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**
**NIT : 800.176.089-2**
**- / -**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

## RECIBO DE CAJA

**No. 11 - 111110**

Bogotá D.C., Noviembre 15 de 2011 - 14:33:08

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

| TIPO PAGO | BANCO | CUENTA | No. PAGO | FECHA PAGO | VR.PAGO |
|---|---|---|---|---|---|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 415004634 | 15/11/2011 | 20.124.000.00 |

*** Conceptos Pagados ***

| CANT. | RENTISTICO | CONCEPTO | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION | 571.000.00 | 571.000.00 |
| | | | | $571.000.00 |

**SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*****

Responsable: _____
*****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
**No. 11-161641- -00000-0000**
Fecha: 2011-11-24 17:31:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 486



2

## 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

3

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

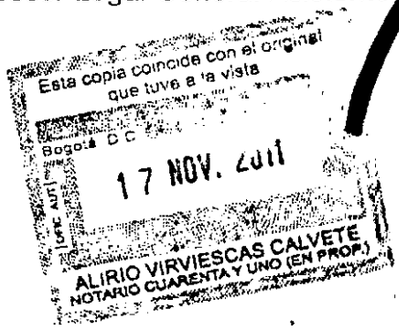
Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
17 NOV. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

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






5

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.

(firma: ilegible)
Notario Público

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D C
17 NOV. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)



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.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
17 NOV. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177 / 89 MINJUSTICIA
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



7

# 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
Bogota D C
17 NOV. 2004
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

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



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, Secretaría 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).

Esta copia coincide con el que tuve a la vista
Bogotá D.C.
17 NOV. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

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

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

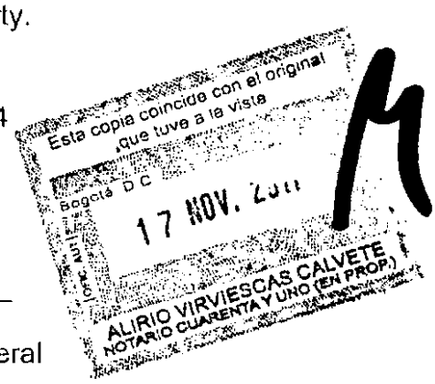
domiciled at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA

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

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: | (51) Int Cl: C12P 21/08 |
| (22) Fecha de solicitud: 24-11-11 | (71) Solicitante(s): **ABBOTT LABORATORIES** |
| (30) Prioridad (31) ***No. Prioridad*** 61/174,711 (32) ***Fecha*** 01-05-09 (33) ***País*** US | (72) Inventor(es): GHAYUR, Tariq; LIU, Junjian; KINGSBURY, Gillian, A.; REILLY, Edward, B. y MORGAN-LAPPE, Susan, E. |
| | (74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE** |
| (85) Fecha límite inicio fase nacional: 01-12-11<br>(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT<br>Fecha de presentación de la solicitud: 30-04-10<br>No. de solicitud: ***PCT/US2010/033231*** | (87) Publicación internacional<br>Fecha: ***04-11-10***<br>N° publicación: ***WO 2010/127284 A3*** |

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

Resumen - Reivindicación(es):


**Resumen:**

La presente invención se relaciona con las proteínas de unión polivalentes y multiespecíficas diseñadas, métodos de fabricación, y específicamente a sus usos en la prevención, diagnóstico, y/o tratamiento de la enfermedad.

**Sector:** Proteínas de unión, preparación de péptidos o proteínas, particularmente anticuerpos monoclonales y preparaciones medicinales que contienen dichos antígenos o anticuerpos.

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: 24-11-11
(51) Clasificación Internacional: C12P 21/08

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

(72) Inventor(es): GHAYUR, Tariq; LIU, Junjian; KINGSBURY, Gillian, A.; REILLY, Edward, B. y MORGAN-LAPPE, Susan, E.

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

| (30) Prioridad | (31) *No. Prioridad* | (32) *Fecha* | (33) *País* |
|---|---|---|---|
| | 61/174,711 | 01-05-09 | US |

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 01-12-11
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 30-04-10
No. de solicitud: ***PCT/US2010/033231***

(87) Publicación internacional
Fecha: ***04-11-10***
N° publicación: ***WO 2010/127284 A3***

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

13

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: 24-11-11
(51) Clasificación Internacional: C12P 21/08

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

(72) Inventor(es): GHAYUR, Tariq; LIU, Junjian; KINGSBURY, Gillian, A.; REILLY, Edward, B. y MORGAN-LAPPE, Susan, E.

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

(30) Prioridad (31) ***No. Prioridad*** (32) ***Fecha*** (33) ***País***
61/174,711 01-05-09 US

**FIGURA CARACTERISTICA**
**6 x 6 cm**

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 01-12-11
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 30-04-10
No. de solicitud: ***PCT/US2010/033231***

(87) Publicación internacional:
Fecha: ***04-11-10***
No. Publicación : ***WO 2010/127284 A3***

(54) Titulo:

**INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS**

(57) Resumen - Reivindicación(es):


**Resumen:**

La presente invención se relaciona con las proteínas de unión polivalentes y multiespecíficas diseñadas, métodos de fabricación, y específicamente a sus usos en la prevención, diagnóstico, y/o tratamiento de la enfermedad.

**Sector:** Proteínas de unión, preparación de péptidos o proteínas, particularmente anticuerpos monoclonales y preparaciones medicinales que contienen dichos antígenos o anticuerpos.


14

PATENT COOPERATION TREATY

# PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

| Applicant's or agent's file reference 9770WO01 | FOR FURTHER ACTION | see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below. |
|---|---|---|
| International application No. PCT/US 10/33231 | International filing date *(day/month/year)* 30 April 2010 (30.04.2010) | (Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 01 May 2009 (01.05.2009) |
| 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 5 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.*6bis*(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 10/33231

**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:

GenCore 6.3: SEQ ID NOs: 27, 29-30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/33231

**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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I+: claims 1-24, drawn to a binding protein comprising a polypeptide chain that comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n. The first invention is restricted to a binding protein comprising a polypeptide chain VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n , wherein VD1 and VD2 comprise an amino acid sequence SEQ ID NOs: 27 and 29, respectively. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional SEQ ID NO(s) to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected SEQ ID NO(s).
[NOTE: Claims 4-24 were excluded from the search, because they are drawn to a non-elected subject matter.]

---Continued on Extra Sheet---

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.:
Claims 1-3, limited to SEQ ID NOs 27 and 29, and claims 25-38

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.:

**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 10/33231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12P 21/08; A61K 39/00 (2010.01)
USPC - 530/387.3; 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- 530/387.3; 424/136.1;

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 530/388.1 530/391.3 530/391.7; 530/387.1; 424/178.1; 435/328; 536/23.53

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST, Google Scholar: dual variable domain, heavy chain, light chain, diabody, bivalent antibody, constant domain, constant region, affinity, potency, second antibody, same, different, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgGA, IgGM, IgGE, IgGD, parent antibody, fc, linker
GenCore 6.3: SEQ ID NOs: 27, 29, 30

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X<br>----<br>Y | US 2007/0071675 A1 (Wu et al.), 29 Mar. 2007 (29.03.2007) Claims 11, 14-15, 21-22, Table 1, Fig. 1B, para [0012], [0014]-[0016], [0053], [0067]-[0068], [0073], [0098], [0105], [0113], [0118], [0233], [0239], [0240]-[0245], [0252] | 38<br>----<br>1-3, 25-37 |
| Y | WO 2005/120557 A1 (Pereira et al.), 22 Dec. 2005 (22.12.2005) SEQ ID NO 7 | 1-3, 25-37 |
| Y | US 2003/0039645 A1 (Adair et al.)27 Feb. 2003 (27.02.2003) SEQ ID NO 30 | 1-3, 25-37 |

☐ 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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 13 Nov. 2010 (13.11.2010) | 22 NOV 2010 |

| Name and mailing address of the ISA/US | Authorized officer: |
|---|---|
| Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-3201 | Lee W. Young<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774 |

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

18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/33231

**********Supplemental Box **********

Continued from Box III

Group II, claims 25-38, drawn to a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin that can bind two antigens comprising the steps of:
(a) obtaining a first parent antibody, or antigen binding portion thereof, that can bind a first antigen;
(b) obtaining a second parent antibody, or antigen binding portion thereof, that can bind a second antigen;
(c) constructing first and third polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n.

The inventions listed as Groups I+ through II 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 of Group I+ do not include the inventive concept of a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin VDI -(XI)n-VD2-C-(X2)n that can bind two antigens, as required by Group II.

The inventions of Groups I+ and II share the technical feature of a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, US 2007/0071675 A1 to Wu et al. (hereinafter 'Wu'), discloses binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD 1-(X I)n -VD2-C-(X2 )n (para [0012], [0098]), wherein;
VDI is a first heavy chain variable domain obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);
VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);
C is a heavy chain constant domain (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);
(X I)n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X I)n is either present or absent (para [0012], [0016], [0098]. Fig. 1); and
(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (para [0012], [0016], [0098],
wherein VDI and VD2 comprise an amino acid sequence that is identical to the claimed SEQ ID NO 27 (Example 4; SEQ ID NO 100). As said binding protein comprising VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n was known at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific amino acid sequence recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because 1) no significant structural similarities can readily be ascertained among the amino acid sequences, and 2) Wu et al discloses the claimed SEQ ID NO:27 (Example 4; SEQ ID NO 100). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Claims 4-24 were excluded from the search, because they are drawn to a non-elected subject matter.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
4 November 2010 (04.11.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/127284 A3

(51) International Patent Classification:
*C12P 21/08* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/033231

(22) International Filing Date:
30 April 2010 (30.04.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/174,711 1 May 2009 (01.05.2009) US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **GHAYUR, Tariq** [US/US]; 1014 Washington Street, Holliston, Massachusetts 01746 (US). **LIU, Junjian** [CN/US]; 14 Crimson Drive, Shrewsbury, Massachusetts 01545 (US). **KINGSBURY, Gillian, A.** [GB/US]; 46 Aqueduct Road, Wayland, Massachusetts 01778 (US). **REILLY, Edward, B.** [US/US]; 1136 Winners Circle, Libertyville, Illinois 60048 (US). **MORGAN-LAPPE, Susan, E.** [US/US]; 5419 North Canfield Avenue, Chicago, Illinois 60656 (US).

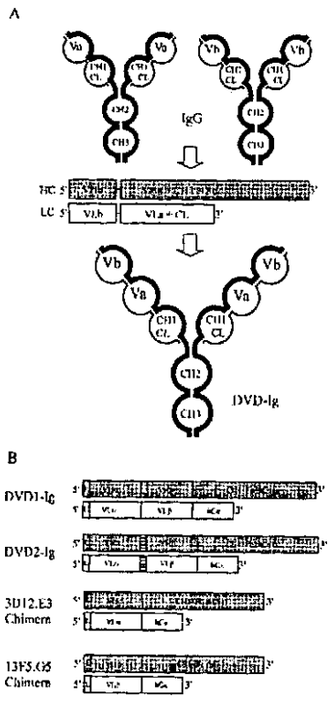
(74) Agents: **STEEL, Diana, M.** et al.; Abbott Bioresearch Center, 100 Research Drive, Worcester, Massachusetts 01605 (US).

*[Continued on next page]*

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

(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.

Figure 1




WO 2010/127284 A3

(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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, 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, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published**:

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

(88) **Date of publication of the international search report**:
10 February 2011

# 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)* | 22 NOV 2010 |
| Applicant's or agent's file reference: 9770WO01 | FOR FURTHER ACTION: See paragraph 2 below |

| International application No. | International filing date *(day/month/year)* | Priority date *(day/month/year)* |
|---|---|---|
| PCT/US 10/33231 | 30 April 2010 (30.04.2010) | 01 May 2009 (01.05.2009) |

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC(8) - C12P 21/08; A61K 39/00 (2010.01)
USPC - 530/387.3; 424/136.1;

Applicant ABBOTT LABORATORIES

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

- ☒ 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
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ 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<br>Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-3201 | 13 November 2010 (13.11.2010) | Lee W. Young<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774 |

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

2A

**WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US 10/33231

**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:

GenCore 6.3: SEQ ID NOs: 27, 29-30

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/33231

**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:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I+: claims 1-24, drawn to a binding protein comprising a polypeptide chain that comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n. The first invention is restricted to a binding protein comprising a polypeptide chain VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n , wherein VD1 and VD2 comprise an amino acid sequence SEQ ID NOs: 27 and 29, respectively. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional SEQ ID NO(s) to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected SEQ ID NO(s).
[NOTE: Claims 4-24 were excluded from the search, because they are drawn to a non-elected subject matter.]

Group II, claims 25-38, drawn to a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin that can bind two antigens comprising the steps of:
(a) obtaining a first parent antibody, or antigen binding portion thereof, that can bind a first antigen;
(b) obtaining a second parent antibody, or antigen binding portion thereof, that can bind a second antigen;
(c) constructing first and third polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n.

The inventions listed as Groups I+ through II 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 of Group I+ do not include the inventive concept of a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n that can bind two antigens, as required by Group II.

The inventions of Groups I+ and II share the technical feature of a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, US 2007/0071675 A1 to Wu et al. (hereinafter 'Wu'), discloses binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD 1-(X I)n -VD2-C-(X2 )n (para [0012], [0098]), wherein;
VDI is a first heavy chain variable domain obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);
VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);
C is a heavy chain constant domain (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);
(X I)n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X I)n is either present or absent (para [0012], [0016], [0098], Fig. 1); and
(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (para [0012], [0016], [0098],
wherein VDI and VD2 comprise an amino acid sequence that is identical to the claimed SEQ ID NO 27 (Example 4; SEQ ID NO 100). As said binding protein comprising VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n was known at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific amino acid sequence recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because 1) no significant structural similarities can readily be ascertained among the amino acid sequences, and 2) Wu et al discloses the claimed SEQ ID NO:27 (Example 4; SEQ ID NO 100). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they 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. 1-3, 25-38

Form PCT/ISA/237 (Box No. IV) (July 2009)

**WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US 10/33231

**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 | 1-3, 25-37 | YES |
| | Claims | 38 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | None | YES |
| | Claims | 1-3, 25-38 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-3, 25-38 | YES |
| | Claims | None | NO |

2. Citations and explanations:
Claim 38 lacks novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2007/0071675 A1 to Wu et al. (hereinafter 'Wu').

As to claim 38, Wu teaches a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding two antigens with desired properties 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 [0239], [0252], Table 1);
(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 [0239], [0252], Table 1);
(c) constructing first and third polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (Claim 22, Fig. 1B, para [0098], [0239]), wherein:
VD 1 is a first heavy chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof (Claim 22, para [0012], [0016], [0098], [0239], Fig. 1B);
VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding portion thereof (Claim 22, para [0012], [0016], [0098], [0239], Fig. 1B);
C is a heavy chain constant domain (Claim 22, [0012], [0098], [0239]);
(X I)n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X I)n is either present or absent (Claim 22, [0012], [0098], [0239], Fig. 1B); and
(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (claim 22, [0012], [0098], [0239], Fig. 1B);
(d) constructing second and fourth polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (Claim 22, para [0098], [0239], Fig. 1B), wherein:
VDI is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof (claim 22, para [0014]-[0015], [0113], [0239], Fig. 1B);
VD2 is a second light chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding thereof (claim 22, [0014]-[0015], [0113], [0239], Fig. 1B);
C is a light chain constant domain (claim 21, [0015], [0098], [0239], Fig. 1B);
(X I)n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X I)n is either present or absent (claim 22, [0015], [0098], [0239], Fig. 1B); and
(X2)n does not comprise an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (claim 22, [0113], Fig. 1B); and
(e) expressing said first, second, third and fourth polypeptide chains; such that a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding said first and said second antigen with desired properties is (para [0240]-[0245]).

Claims 1-3, 25-37, lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Wu, as above, in view of US 2003/0039645 A1 to Adair et al. (hereinafter 'Adair') and further in view of WO 2005/120557 A2 to Pereira et al. (hereinafter 'Pereira').

As per claim 1, Wu discloses binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD 1-(X I)n -VD2-C-(X2 )n (para [0012], [0098]), wherein;
VDI is a first heavy chain variable domain obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);
VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);
C is a heavy chain constant domain (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);
(X I)n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X I)n is either present or absent (para [0012], [0016], [0098], Fig. 1); and
(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (para [0012], [0016], [0098]),
wherein VDI and VD2 compriso an amino acid sequence that is 98.3% homologous to SEQ ID NO 27, but fails to teach 100% homology to SEQ ID NO 27 or 29. Adair does disclose a variable domain that is 100% homologous to SEQ ID NO 27 (SEQ ID NO 30).
Furthermore, Pereira does teach a variable domain that is 100% homologous to SEQ ID NO 29 (SEQ ID NO 7). It would have been obvious to one skilled in the art to utilize the VD of Adair and Pereira in the Dual Variable domain immunoglobulin of Wu in order to obtain an antibody that binds the desired target.

As per claim 2, Wu further teaches that the binding protein is capable of binding a pair selected from the group consisting of EGFR and CD-3; EGFR and IGFIR; EGFR and RON; EGFR and HGF; VEGF and EGFR; EGFR and ErbB3, EGFR and DLL-4, EGFR and PLGF, EGFR and EGFR, EGFR and RGMa, EGFR and tetanus toxoid; VEGF and tetanus toxoid; and tetanus toxoid and tetanus toxoid (para [0040]).

-------Continued in Supplemental Box-----

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/33231

**Supplemental Box**

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

Continuation of:
Box 5(2)

As per claim 3, Wu further teaches wherein (X2)n is absent (para [0012]--n is 0).

As per claim 25, Wu teaches a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding two antigens comprising the steps of
(a) obtaining a first parent antibody, or antigen binding portion thereof, that can bind a first antigen (para [0239]);
(b) obtaining a second parent antibody, or antigen binding portion thereof, that can bind a second antigen (para [0239]);
(c) constructing first and third polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (Claim 22, Fig. 1B, para [0098], [0239]), wherein:
VD 1 is a first heavy chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof (Claim 22, para [0012], [0016], [0098], [0239], Fig. 1B);
VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding portion thereof (Claim 22, para [0012], [0016], [0098], [0239], Fig. 1B);
C is a heavy chain constant domain (Claim 22, [0012], [0098], [0239]);
(X I)n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X I)n is either present or absent (Claim 22, [0012], [0098], [0239], Fig. 1B); and
(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (claim 22, [0012], [0098], [0239], Fig. 1B);
(d) constructing second and fourth polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (Claim 22, para [0098], [0239], Fig. 1B), wherein:
VDI is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof (claim 22, para [0014]-[0015], [0113], [0239], Fig. 1B);
VD2 is a second light chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding thereof (claim 22, [0014]-[0015], [0113], [0239], Fig. 1B);
C is a light chain constant domain (claim 21, [0015], [0098], [0239], Fig. 1B);
(X I)n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X I)n is either present or absent (claim 22, [0015], [0098], [0239], Fig. 1B); and
(X2)n does not comprise an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (claim 22, [0113], Fig. 1B); and
(e) expressing said first, second, third and fourth polypeptide chains (para [0240]-[0245].
Wu fails to specifically disclose that the VDI and VD2 heavy chain variable domains comprise an amino acid sequences 27 and 29 and wherein the VDI and VD2 light chain variable domains comprise an amino acid sequence SEQ ID NO 30.
Adair does disclose a variable domain that is 100% homologous to SEQ ID NO 27 (SEQ ID NO 30).
Adar also fails to teach SEQ ID NOs 29 and 30.
Pereira does teach a variable domain that is 100% homologous to SEQ ID NO 29 (SEQ ID NO 7) and SEQ ID NO 30 (SEQ ID NO 18). It would have been obvious to one skilled in the art to utilize the VD of Adair and Pereira in the Dual Variable domain immunoglobulin of Wu in order to obtain an antibody that binds the desired target.

As per claim 26, Wu further teach 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, human antibody, CDR grafted antibody, and humanized antibody (para [0012], [0067]-[0068], [0073]).

As per claim 27, Wu further teaches 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, a F( ab'h fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; a Fd fragment consisting of the VH and CHI domains; a Fv fragment consisting of the VL and VH domains ofa single arm of an antibody, a dAb fragment, an isolated complementarity determining region (CDR), a single chain antibody, and diabodies (para [0054], [0073], [0105]).

As per claim 28, Wu further teaches wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof possesses at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0239], [0252]).

As per claim 29, Wu further teaches wherein said second parent antibody or antigen binding portion thereof possesses at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0239], [0252]).

As per claim 30, Wu further discloses that the Fc region is selected from the group consisting of a native sequence Fc region and a variant sequence Fc region (para [0053]).

As per claim 31, Wu further discloses that 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]).

As per claims 32-35, Wu further teaches that said desired property is selected from one or more antibody parameters, such as affinity to antigen (para [0252])

As per claim 36, Wu further teaches that 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 (para [0233], Table 1).

As per claim 37, Wu further teaches 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 (para [0233], Table 1).

Claims 1-3, 25-38 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

# 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 9770WO01 | FOR FURTHER ACTION | See Form PCT/IPEA/416 |
|---|---|---|
| International application No. PCT/US10/33231 | International filing date *(day/month/year)* 30 April 2010 (30.04.2010) | Priority date *(day/month/year)* 01 May 2009 (01.05.2009) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>IPC: C12P 21/08( 2006.01);A61K 39/00( 2006.01)<br>USPC: 530/387.3;424/136.1 | | |
| Applicant<br>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 10 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 0 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 |
|---|---|
| 01 December 2010 (01.12.2010) | 27 April 2011 (27.04.2011) |
| Name and mailing address of the IPEA/ US<br>Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US<br>Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450<br>Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. (571) 273-3201 | Authorized officer<br>Marianne Seidel<br>Telephone No. (571) 272-0584 |

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

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US10/33231

**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 1-232 as originally filed/furnished
pages* NONE received by this Authority on _____
pages* NONE received by this Authority on _____

☒ the claims:
pages 233-240 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 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/US10/33231

**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:

Please See Continuation Sheet

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. 1-3 and 25-38

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US10/33231

**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 1-3, 25-37 | YES |
| | Claims 38 | NO |
| Inventive Step (IS) | Claims NONE | YES |
| | Claims 1-3, 25-38 | NO |
| Industrial Applicability (IA) | Claims 1-3, 25-38 | YES |
| | Claims NONE | NO |

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

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US10/33231

**Supplemental Box Relating to Sequence Listing**

**Continuation of Box No. I, item 2:**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of:

   a. type of material

   ☒ a sequence listing

   ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   ☐ contained in the international application as filed

   ☒ filed together with the international application in electronic form

   ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination

   ☐ received by this Authority as an amendment* on _____

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto 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:

GenCore 6.3: SEQ ID NOs: 27, 29-30

* *If item 4 in Box No. I applies, the listing and/or table(s) related thereto, which form part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US10/33231

**Supplemental Box**

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

Continuation of:

**IV. 3. This Authority considers that the requirement of unity of invention is accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is not complied with for the following reasons:**
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I+: claims 1-24, drawn to a binding protein comprising a polypeptide chain that comprises VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n. The first invention is restricted to a binding protein comprising a polypeptide chain VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein VD1 and VD2 comprise an amino acid sequence SEQ ID NOs: 27 and 29, respectively. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional SEQ ID NO(s) to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected SEQ ID NO(s). [NOTE: Claims 4-24 were excluded from the search, because they are drawn to a non-elected subject matter.]

Group II, claims 25-38, drawn to a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin that can bind two antigens comprising the steps of:
(a) obtaining a first parent antibody, or antigen binding portion thereof, that can bind a first antigen;
(b) obtaining a second parent antibody, or antigen binding portion thereof, that can bind a second antigen;
(c) constructing first and third polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n.

The inventions listed as Groups I+ through II 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 of Group I+ do not include the inventive concept of a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n that can bind two antigens, as required by Group I1.

The inventions of Groups I+ and II share the technical feature of a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, US 2007/0071675 A1 to Wu et al. (hereinafter 'Wu'), discloses binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD 1-(X I)n -VD2-C-(X2 )n (pare [0012], [0098]), wherein;

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US10/33231

Supplemental Box

VDI is a first heavy chain variable domain obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);
VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);
C is a heavy chain constant domain (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1); (X I)n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X I)n is either present or absent (para [0012], [0016], [0098], Fig. 1); and
(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (pare [0012], [0016], [0098],
wherein VDI and VD2 comprise an amino acid sequence that is identical to the claimed SEQ ID NO 27 (Example 4; SEQ ID NO 100). As said binding protein comprising VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n was known at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific amino acid sequence recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because 1) no significant structural similarities can readily be ascertained among the amino acid sequences, and 2) Wu et al discloses the claimed SEQ ID NO:27 (Example 4; SEQ ID NO 100). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

V. 2. Citations and Explanations:

Claim 38 lacks novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2007/0071675 A1 to Wu et al. (hereinafter 'Wu').

As to claim 38, Wu teaches a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding two antigens with desired properties 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 (pare [0239], [0252], Table 1);

(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. [0239], [0252], Table 1);

(c) constructing first and third polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (Claim 22, Fig. 1 B, para [0098], [0239]), wherein:

VD 1 is a first heavy chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof (Claim 22, para [0012], [0016], [0098], [0239], Fig. 1B);

VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding portion thereof (Claim 22, para [0012], [0016], [0098], [0239], Fig. 1B);

C is a heavy chain constant domain (Claim 22, [0012], [0098], [0239]);

(X I)n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X I)n is either present or absent (Claim 22, [0012], [0098], [0239], Fig. 1B); and

(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (claim 22, [0012], [0098], [0239], Fig. 1B);

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US10/33231

Supplemental Box

(d) constructing second and fourth polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (Claim 22, para [0098], [0239], Fig. 1B), wherein: VDI is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof (claim 22, para [0014]-[0015], [0113], [0239], Fig. 1B);

VD2 is a second light chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding thereof (claim 22, [0014]-[0015], [0113], [0239], Fig. 1 B);

C is a light chain constant domain (claim 21, [0015], [0098], [0239], Fig. 1B);

(X I)n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X I)n is either present or absent (claim 22, [0015], [0098], [0239], Fig. 1B); and

(X2)n does not comprise an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (claim 22, [0113], Fig. 1B); and

(e) expressing said first, second, third and fourth polypeptide chains; such that a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding said first and said second antigen with desired properties is (para [0240]-[0245]).

Claims 1-3, 25-37, lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Wu, as above, in view of US 2003/0039645 A1 to Adair et al. (hereinafter 'Adair') and further in view of WO 2005/120557 A2 to Pereira et al. (hereinafter 'Pereira').

As per claim 1, Wu discloses binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD 1-(X I)n -VD2-C-(X2 )n (para [0012], [0098]), wherein;

VDI is a first heavy chain variable domain obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);

VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. t);

C is a heavy chain constant domain (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);

(X I)n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X I)n is either present or absent (para [0012], [0016], [0098], Fig. 1); and

(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (para [0012], [0016], [0098]), wherein VDI and VD2 comprise an amino acid sequence that is 98.3% homologous to SEQ ID NO 27, but fails to teach 100% homology to SEQ ID NO 27 or 29. Adair does disclose a variable domain that is 100% homologous to SEQ ID NO 27 (SEQ ID NO 30).

Furthermore, Pereira does teach a variable domain that is 100% homologous to SEQ ID NO 29 (SEQ ID NO 7). It would have been obvious to one skilled in the art to utilize the VD of Adair and Pereira in the Dual Variable domain Immunoglobulin of Wu in order to obtain an antibody that binds the desired target.

As per claim 2, Wu further teaches that the binding protein is capable of binding a pair selected from the group consisting of EGFR and CD-3; EGFR and IGFIR; EGFR and RON; EGFR and HGF; VEGF and EGFR; EGFR and ErbB3, EGFR and DLL-4, EGFR and PLGF, EGFR and EGFR, EGFR and RGMa, EGFR and tetanus toxoid; VEGF and tetanus toxoid; and tetanus toxoid and tetanus toxoid (para [0040]).

As per claim 3, Wu further teaches wherein (X2)n is absent (para [0012]--n is 0).

As per claim 25, Wu teaches a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding two antigens comprising the steps of

(a) obtaining a first parent antibody, or antigen binding portion thereof, that can bind a first antigen (para [0239]);

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US10/33231

Supplemental Box

(b) obtaining a second parent antibody, or antigen binding portion thereof, that can bind a second antigen (para [0239]);

(c) constructing first and third polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (Claim 22, Fig. 1B, para [0098], [0239]), wherein:

VD 1 is a first heavy chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof (Claim 22, para [0012], [0016], [0098], [0239], Fig. 1 B);

VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding portion thereof (Claim 22, para [0012], [0016], [0098], [0239], Fig. 1B);

C is a heavy chain constant domain (Claim 22, [0012], [0098], [0239]);

(X I)n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X I)n is either present or absent (Claim 22, [0012], [0098], [0239], Fig. 1B); and

(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (claim 22, [0012], [0098], [0239], Fig. 1B);

(d) constructing second and fourth polypeptide chains comprising VDI-(XI)n-VD2-C-(X2)n (Claim 22, para [0098], [0239], Fig. 1B), wherein: VDI is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof (claim 22, para [0014]-[0015], [0113], [0239], Fig. 1B);

VD2 is a second light chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding thereof (claim 22, [0014]-[0015], [0113], [0239], Fig. 1B);

C is a light chain constant domain (claim 21, [0015], [0098], [0239], Fig. 1B);

(X I)n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X I)n is either present or absent (claim 22, [0015], [0098], [0239], Fig. 1B); and

(X2)n does not comprise an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (claim 22, [0113], Fig. 1B); and

(e) expressing said first, second, third and fourth polypeptide chains (para [0240]-[0245].

Wu fails to specifically disclose that the VDI and VD2 heavy chain variable domains comprise an amino acid sequences 27 and 29 and wherein the VDI and VD2 light chain variable domains comprise an amino acid sequence SEQ ID NO 30.

Adair does disclose a variable domain that is 100% homologous to SEQ ID NO 27 (SEQ ID NO 30).

Adar also fails to teach SEQ ID NOs 29 and 30.

Pereira does teach a variable domain that is 100% homologous to SEQ ID NO 29 (SEQ ID NO 7) and SEQ ID NO 30 (SEQ ID NO 18). It would have been obvious to one skilled in the art to utilize the VD of Adair and Pereira in the Dual Variable domain immunoglobulin of Wu in order to obtain an antibody that binds the desired target.

As per claim 26, Wu further teach 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, human antibody, CDR grafted antibody, and humanized antibody (para [0012], [0067]-[0068], [0073]).

As per claim 27, Wu further teaches 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, a F( ab'h fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; a Fd fragment consisting of the VH and CHI domains; a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody, a dAb fragment, an isolated complementarity determining region (CDR), a single chain antibody, and diabodies (para [0054], [0073], [0105]).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US10/33231

**Supplemental Box**

As per claim 28, Wu further teaches wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof possesses at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0239], [0252]).

As per claim 29, Wu further teaches wherein said second parent antibody or antigen binding portion thereof possesses at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0239], [0252]).

As per claim 30, Wu further discloses that the Fc region is selected from the group consisting of a native sequence Fc region and a variant sequence Fc region (para [0053]).

As per claim 31, Wu further discloses that the Fc region is selected from the group consisting of an Fc region from an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, and IgD (para [0118]).

As per claims 32-35, Wu further teaches that said desired property is selected from one or more antibody parameters, such as affinity to antigen (para [0252])

As per claim 36, Wu further teaches that 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 (para [0233], Table 1).

As per claim 37, Wu further teaches 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 (para [0233], Table 1).

Claims 1-3, 25-38 have industrial applicability as defined by 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 las proteínas de unión polivalentes y multiespecíficas diseñadas, métodos de fabricación, y específicamente a sus usos en la prevención, diagnóstico, y/o tratamiento de la enfermedad.

**SECTOR**: proteínas de unión, preparación de péptidos o proteínas, particularmente anticuerpos monoclonales y preparaciones medicinales que contienen dichos antígenos o anticuerpos.

# INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS

## Referencia Cruzada a la Solicitud Relacionada

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional Norteamericana No. 61/174,711 que es incorporada expresamente en la presente por referencia en su totalidad para cualquier propósito.

## Campo de la Invención

La presente descripción se relaciona con las proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas, métodos de fabricación, y específicamente con sus aplicaciones en el diagnóstico, profilaxis y/o tratamiento de las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, cáncer y otras enfermedades.

## Antecedentes de la Invención

Las proteínas diseñadas, tal como anticuerpos multiespecíficos que puedan unir a dos o más antígenos se conocen en la técnica. Tales proteínas de unión multiespecíficas se pueden generar usando la fusión celular, conjugación química, o técnicas de ADN recombinantes.

Los anticuerpos biespecíficos se han producido usando la tecnología de cuadroma (ver Milstein, C. and A.C. Cuello, (1983) Nature 305 (5934); 537-40) basada en la fusión somática de dos diferentes líneas de células de hibridoma que expresan los anticuerpos monoclonales de murino (mAbs por sus siglas en

inglés), con las características deseadas del anticuerpo biespecífico. Debido al apareamiento aleatorio de dos diferentes cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina (Ig) dentro de la línea de células resultante del hibridoma híbrido (o cuadroma), se generan hasta diez diferentes especies de Ig, de las cuales solamente una es el anticuerpo biespecífico funcional. La presencia de subproductos apareados incorrectamente, y rendimientos de producción significativamente reducidos, significa que son requeridos los procedimientos de purificación sofisticados.

Los anticuerpos biespecíficos también se pueden producir por la conjugación química de dos diferentes mAbs (ver Staerz, U.D. y colaboradores (1985) Nature 314(6012): 628-31). Este método no produce la preparación homogénea. Otros métodos han utilizado la conjugación química de dos diferentes mAbs o fragmentos más pequeños de anticuerpo (ver Brennan, M y colaboradores (1985) Science 229(4708): 81-3).

Otro método usado para producir los anticuerpos biespecíficos es el acoplamiento de dos anticuerpos madre con un reticulador hetero-bifuncional, pero los anticuerpos biespecíficos resultantes sufren de heterogeneidad molecular significativa debido a que la reacción del reticulador con los anticuerpos madre no se dirige al sitio. Para obtener preparaciones más homogéneas de los anticuerpos biespecíficos, dos diferentes fragmentos Fab se han reticulado químicamente en sus residuos de cisteína bisagra de una

manera dirigida al sitio (ver Glennie, M.J. y colaboradores (1987) Immunol. 139(7):2367-75) Pero este método da lugar a los fragmentos Fab'2, no una molécula de IgG completa.

Una gran variedad de otros formatos de anticuerpo biespecíficos recombinantes se han desarrollado (ver Kriangkum, J. y colaboradores (2001) Biomol. Engin. 18(2): 31-40). Entre ellas, las moléculas y diacuerpos Fv de cadena simple en tándem, y varios derivados de los mismos, son los más ampliamente utilizados. Comúnmente, la construcción de estas moléculas empieza con dos fragmentos Fv de cadena simple (scFv por sus siglas en inlgés), que reconocen diferentes antígenos (ver Economides, A.N. y colaboradores (2003) Nat. Med. 9(1): 47-52). Las moléculas scFv en tándem (taFv por sus siglas en inglés), representan un formato directo que conecta simplemente las dos moléculas scFv con un enlace de péptido adicional. Los dos fragmentos scFv presentes en estas moléculas scFv en tándem forman entidades plegables separadas. Varios enlaces se pueden utilizar para conectar los dos fragmentos scFv y enlaces con una longitud de hasta 63 residuos (ver Nakanishi, K. y colaboradores (2001) Ann. Rev. Immunol. 19: 423-74). Aunque los fragmentos scFv madre se puedan expresar normalmente en forma soluble en las bacterias, sin embargo, se observa frecuentemente que las moléculas scFv en tándem forman los agregados insolubles en las bacterias. Por lo tanto, los protocolos de replegado o uso de los sistemas de expresión mamíferos se aplican comúnmente para

producir las moléculas scFv en tándem solubles. En un estudio reciente, fue descrita la expresión *in vivo* por los conejos y ganado transgénicos de un scFv en tándem dirigido contra CD28 y un proteoglicano asociado a melanoma (ver Gracie, J.A. y colaboradores (1999) J. Clin. Invest. 104(10): 1393-401). En este constructo, las dos moléculas scFv fueron conectadas por un enlace de CH1 y fueron encontradas las concentraciones en suero de hasta 100 mg/l del anticuerpo biespecífico. Varias estrategias que incluyen las variaciones del orden de dominio o usando enlaces medios con longitud o flexibilidad variable fueron utilizados para permitir la expresión soluble en las bacterias. Algunos estudios ahora han reportado la expresión de las moléculas scFv en tándem solubles en las bacterias (ver Leung, B.P. y colaboradores (2000) J. Immunol. 164(12): 6495-502; Ito, A. y colaboradores (2003) J. Immunol. 170(9): 4802-9; Kami, A. y colaboradores (2002) J. Neuroimmunol. 125(1-2): 134-40) usando un enlace Ala3 muy corto o enlaces largos ricos en glicina/serina. En un estudio reciente, la expresión en fago de un repertorio de scFv en tándem que contiene enlaces medios seleccionados de manera aleatoria con una longitud de 3 ó 6 residuos fue utilizada para enriquecer aquellas moléculas que se producen en forma soluble y activa en las bacterias. Este método dio lugar al aislamiento de una molécula scFv en tándem con un enlace de 6 residuos de aminoácido (ver Arndt, M. and Krauss, J. (2003) Methods Mol. Biol. 207: 305-21). Es confuso si esta secuencia de

enlace representa una solución general a la expresión soluble de las moléculas scFv en tándem. Sin embargo, este estudio demostró que la expresión en fago de las moléculas scFv en tándem en combinación con la mutagénesis dirigida es una herramienta potente para enriquecer estas moléculas, que se pueden expresar en las bacterias en una forma activa.

Los diacuerpos biespecíficos (Db por sus siglas en inglés), utilizan el formato de diacuerpo para la expresión. Los diacuerpos son producidos a partir de los fragmentos scFv reduciendo la longitud del enlace que conecta el dominio de VH y VL con aproximadamente 5 residuos (ver Peipp, M. and Valerius, T. (2002) Biochem. Soc. Trans. 30(4): 507-11). Esta reducción del tamaño de enlace facilita la dimerización de dos cadenas de polipéptido mediante apareamiento cruzado de los dominios de VH y VL. Los diacuerpos biespecíficos son producidos expresando, dos cadenas de polipéptido con la estructura VHA-VLB y VHB-VLA (configuración de VH-VL), o VLA-VHB y VLB-VHA (configuración de VL-VH) dentro de la misma célula. Una variedad grande de diferentes diacuerpos biespecíficos se ha producido en el pasado y la mayoría de ellos se puede expresar en forma soluble en las bacterias. Sin embargo, un estudio comparativo reciente demuestra que la orientación de los dominios variables puede afectar la expresión y formación de sitios de unión activos (ver Mack, M. y colaboradores (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(15): 7021-5). Sin embargo, la expresión soluble en bacterias

representa una ventaja importante sobre las moléculas scFv en tándem. Sin embargo, puesto que dos diferentes cadenas de polipéptido se expresan dentro de una célula, los homodímeros inactivos se pueden producir junto con los heterodímeros activos. Esto hace necesaria la implementación de las etapas de purificación adicionales para obtener las preparaciones homogéneas de los diacuerpos biespecíficos. Un método para forzar la generación de los diacuerpos biespecíficos es la producción de diacuerpos de mutación de acoplamiento (ver Holliger, P., y colaboradores (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14): 6444-8.18). Esto fue demostrado para un diacuerpo biespecífico dirigido contra HER2 y CD3. Un acoplamiento grande fue introducido en el dominio de VH intercambiando Val37 por Phe y Leu45 por Trp y una mutación complementaria fue producida en el dominio de VL mutando Phe98 a Met y Tyr87 a Ala, en los dominios variables anti-HER2 o anti-CD3. Usando este método la producción de diacuerpos biespecíficos se pudo aumentar de 72% por el diacuerpo madre a más de 90% por el diacuerpo de mutación de acoplamiento. Notablemente, los rendimientos de producción disminuyeron sólo ligeramente como resultado de estas mutaciones. Sin embargo, una reducción de la actividad de unión a antígeno fue observada para varios constructos analizados. Así, este método preferiblemente elaborado requiere el análisis de varios constructos para identificar aquellas mutaciones que producen la molécula

heterodimérica con actividad de unión inalterada. Además, tal método requiere la modificación de mutación de la secuencia de inmunoglobulina en la región constante, creando así la forma no nativa y no natural de la secuencia de anticuerpo, que puede dar lugar a la inmunogenicidad aumentada, estabilidad *in vivo* insuficiente, así como farmacocinética indeseable.

Los diacuerpos de cadena simple (scDb por sus siglas en inglés), representan una estrategia alternativa para mejorar la formación de las moléculas de tipo diacuerpo biespecífico (ver Holliger, P. and Winter, G. (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4): 128-30; Wu, A.M. y colaboradores (1996) Immunotechnology 2(1): p. 21-36). Los diacuerpos biespecíficoss de cadena simple son producidos conectando las dos cadenas de polipéptido de formación de diacuerpo con un enlace medio adicional con una longitud de aproximadamente 15 residuos de aminoácido. Por lo tanto, todas las moléculas con un peso molecular que corresponde a los diacuerpos de cadena simple monoméricos (50-60 kDa) son biespecíficas. Varios estudios han demostrado que los diacuerpos biespecíficos de cadena simple son expresados en las bacterias en forma soluble y activa con la mayoría de moléculas purificadas presentes como monómeros (ver Holliger, P. and Winter, G. (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4): 128-30; Wu, A.M. y colaboradores (1996) Immunotechnol. 2(1): 21-36; Pluckthun, A. and Pack, P. (1997) Immunotechnol. 3(2): 83-105; Ridgway, J.B. y colaboradores

(1996) Protein Engin. 9(7): 617-21). Así, los diacuerpos de cadena simple combinan las ventajas de scFvs en tándem (todos los monómeros son biespecífico) y de los diacuerpos (expresión soluble en las bacterias).

Más recientemente, los diacuerpos han sido fusionados a Fc para generar más moléculas similares a Ig, nombradas di-diacuerpos (ver Lu, D. y colaboradores (2004) J. Biol. Chem. 279(4): 2856-65). Además, se ha descrito el constructo de anticuerpo multivalente que comprende dos repeticiones Fab en la cadena pesada de un IgG y que puede unir a cuatro moléculas de antígeno (ver la Publicación PCT No. WO 0177342A1, y Miller, K. y colaboradores (2003) J. Immunol. 170(9): 4854-61).

Existe una necesidad en la técnica de las proteínas de unión multivalentes mejoradas que puedan unir dos o más antígenos. La Patente Norteamericana No. 7,612,181 proporciona una nueva familia de proteínas de unión, que pueden unir dos o más antígenos con alta afinidad y que se llaman inmunoglobulinas de dominio variable dual (DVD-Ig™). La presente descripción proporciona otras nuevas proteínas de unión que pueden unir a dos o más antígenos.

**Breve Descripción de la Invención**

La presente descripción pertenece a las proteínas de unión multivalentes que pueden unir a dos o más antígenos. La presente descripción proporciona una nueva familia de proteínas de unión que puede unir dos o más antígenos con alta afinidad.

En una modalidad, la presente descripción proporciona 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 aminoácido o polipéptido, X2 representa una región Fc, y n es 0 ó 1. En una modalidad VD1 y VD2 en la proteína de unión son dominios variables de cadena pesada. En otra modalidad, el dominio variable de cadena pesada se selecciona del grupo que consiste de un dominio variable de cadena pesada de murino, un dominio variable de cadena pesada humano, un dominio variable de cadena pesada injertado en CDR, y un dominio variable de cadena pesada humanizado. En aún otra modalidad, VD1 y VD2 pueden unir al mismo antígeno. En otra modalidad, VD1 y VD2 pueden unir a diferentes antígenos. En aún otra modalidad, C es un dominio constante de cadena pesada. Por ejemplo, X1 es un enlace con la condición de que X1 no sea CH1. Por ejemplo, X1 es un enlace seleccionado del grupo que consiste de AKTTPKLEEGEFSEAR (SEC ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEC ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEC ID NO: 4); SAKTTP (SEC ID NO: 5); RADAAP (SEC ID NO: 6); RADAAPTVS (SEC ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEC ID NO: 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEC ID NO: 9), SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 10); ADAAP (SEC ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEC ID NO: 12); TVAAP (SEC ID NO:

13); TVAAPSVFIFPP (SEC ID NO: 14); QPKAAP (SEC ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEC ID NO: 16); AKTTPP (SEC ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEC ID NO: 18); AKTTAP (SEC ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEC ID NO: 20); ASTKGP (SEC ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEC ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID NO: 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEC ID NO: 26). En una modalidad, X2 es una región Fc. En otra modalidad, X2 es una región Fc variable.

En una modalidad la proteína de unión descrita en la presente 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 enlace con la condición de que no sea CH1, y X2 es una región Fc.

En una modalidad VD1 y VD2 en la proteína de unión son los dominios variables de la cadena ligera. En una modalidad, el dominio variable de cadena ligera se selecciona del grupo que consiste de un dominio variable de cadena ligera de murino, un dominio variable de cadena ligera de humano, un dominio variable de cadena ligera injertado en CDR, y un dominio variable de cadena ligera humanizado. En una modalidad VD1 y VD2 pueden unir al mismo antígeno. En otra modalidad VD1 y VD2 pueden unir a diferentes antígenos. En una modalidad C es un dominio

constante de cadena ligera. En otra modalidad, X1 es un enlace con la condición de que X1 no sea CL1. En una modalidad X1 es un enlace seleccionado del grupo que consiste de AKTTPKLEEGEFSEAR (SEC ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEC ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEC ID NO: 4); SAKTTP (SEC ID NO: 5); RADAAP (SEC ID NO: 6); RADAAPTVS (SEC ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEC ID NO: 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEC ID NO: 9), SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 10); ADAAP (SEC ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEC ID NO: 12); TVAAP (SEC ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEC ID NO: 14); QPKAAP (SEC ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEC ID NO: 16); AKTTPP (SEC ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEC ID NO: 18); AKTTAP (SEC ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEC ID NO: 20); ASTKGP (SEC ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO: 22); GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 23); GENKVEYAP ALMALS (SEC ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID NO: 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEC ID NO: 26). En una modalidad, la proteína de unión no comprende X2.

En una modalidad, la cadena pesada variable y cadena ligera variable comprenden el mismo enlace. En otra modalidad, la cadena pesada variable y la cadena ligera variable comprenden diferentes enlaces. En otra modalidad, la cadena pesada variable y la cadena ligera variable comprenden un enlace corto (de aproximadamente 6 aminoácidos). En otra modalidad, la cadena pesada variable y la cadena ligera variable comprenden un enlace

largo (de más de 6 aminoácidos). En otra modalidad, la cadena pesada variable comprende un enlace corto y la cadena ligera variable comprende un enlace largo. En otra modalidad, la cadena pesada variable comprende un enlace largo y la cadena ligera variable comprende un enlace corto.

En una modalidad, la proteína de unión descrita en la presente 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 ligera, VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera, C es un dominio constante de cadena ligera, X1 es un enlace con la condición de que no sea CH1, y X2 no comprende una región Fc.

En otra modalidad, la presente descripción proporciona una proteína de unión que comprende dos cadenas de polipéptido, en donde la primera 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 enlace con la condición de que no sea CH1, y X2 es una región Fc; y la 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 dominio constante de cadena ligera, X1 es un enlace con la condición de que no sea CH1, y X2 no comprende una región Fc. En una modalidad particular, la proteína de unión

de Dominio Variable Dual (DVD, por sus siglas en inglés) comprende cuatro cadenas de polipéptido, en donde cada una de las primeras dos cadenas 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 enlace con la condición de que no sea CH1, y X2 es una región Fc; y cada una de las dos segundas cadenas 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 dominio constante de cadena ligera, X1 es un enlace con la condición de 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 modalidad, las proteínas de unión descritas en la presente pueden unir a uno o más objetivos. En una modalidad, el objetivo se selecciona del grupo que consiste de citosinas, proteínas de superficie celular, enzimas, y receptores. En otra modalidad, la proteína de unión puede modular una función biológica de uno o más objetivos. En otra modalidad, la proteína de unión puede neutralizar uno o más objetivos. La proteína de unión de la presente descripción puede unir a las citosinas seleccionadas del grupo que consiste de linfocinas, monocinas, hormonas de polipéptido, receptores, y marcadores tumorales. Por ejemplo, el DVD-Ig de la presente descripción puede unir dos

o más de los siguientes: CD-3, RON, IGFIR, HGF, VEGF,DLL-4, EGFR, PLGF, ErbB3 RGMa, y tetano toxoide (ver también la tabla 2). En una modalidad específica, la proteína de unión puede unir a los pares de objetivos seleccionados del grupo que consiste de.

En una modalidad la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y EGFR (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEC. ID NOS: 59, y SEC. ID No. 61; una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO.: 60 y SEC. ID. NO. 62. En una modalidad la proteína de unión que puede unir a EGFR (sec. 2) y EGFR (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de la SEC ID NO. 59 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 60. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EFGR (sec. 2) y EGFR (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 61 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 62.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y EGFR (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de la SEC ID NO: 63 y SEC ID NO. 65; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD del grupo que consiste de la de la SEC ID NO: 64 y SEC ID NO. 66. En una modalidad la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y EGFR (sec. 3)

JD

comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NOS: 63 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de la SEC ID NO: 64. En otra una modalidad la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y EGFR (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 65 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 66.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y EGFR (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de la SEC ID NO: 67 y SEC ID NO. 69; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera seleccionada del grupo de la SEC ID NO: 68. y SEC ID NO. 70. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y EGFR (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NOS: 67 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD SEC ID NOS: 68. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y EGFR (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 69 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 70.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y EGFR (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo

que consiste de las SEC ID NOS: 71 y SEC ID NO. 73; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOS. 72 y SEC ID NO. 74. En una modalidad la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y EGFR (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 71 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 72. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y EGFR (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 73 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 74.

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y RON comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 75 y SEC ID NO 77 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 76 y SEC ID NO 78. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y RON comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 75 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 76. En otra modalidad la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y RON tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 77 y una secuencia de

aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 78.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y RON comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 79 y SEC ID NO. 81 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 80 y SEC ID NO 82. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y RON comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 79 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 80. En otra modalidad la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y RON tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 891 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 82.

En una tercera modalidad la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y RON comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 83 y SEC ID NO: 85 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 84 y SEC ID NO: 86. En otra modalidad, la proteína de unión que puede unir a EGFR (sec. 1) y RON comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 83 y una secuencia de aminoácido de

cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 84. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y RON tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 85 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 86.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y RON comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 87, y SEC ID NO: 89 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 88, y SEC ID NO: 90. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y RON comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 87 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 88. En otra modalidad, la proteína de unión que puede unir a EGFR (sec. 2) y RON tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 89 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 90.

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y ErbB3 (sec.1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 91, y SEC ID NO: 93; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada

del grupo que consiste de las SEC ID NO: 92, y SEC ID NO: 94. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e ErbB3 (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 91 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 92. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 93 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 94.

En una segunda modalidad la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 95 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 97; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 96 y SEC ID NO. 98. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 95 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 96. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 97 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 98.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 99 y 101 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 100 y 102. En una modalidad, la proteína de unión que capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 99 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 100. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 101 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 102.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 103 y SEC ID NO. 105; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 104 y SEC ID NO. 106. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 103 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC

ID NO: 104. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 105 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 106.

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 107 y la SEC ID NO. 109; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO. 108 y SEC ID NO. 110. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 107 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 108. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (seq. 2) y ErbB3 (sec. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 109 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 110.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 111; y SEC ID NO: 113 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada

del grupo que consiste de las SEC ID NOS: 112 y 114. En una modalidad la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 111 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 112. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 2) tiene una orientación inversa comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 113 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 114.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 115 y SEC ID NO: 117; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 116 y SEC ID NO: 118. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 115 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 116. En otra modalidad la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 117 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 118;

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 119 y SEC ID NO. 121; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 120 y SEC ID NO. 122. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 119 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 120. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 121 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 122.

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y CD3 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 123 y SEC ID NO. 125; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 124 y SEC ID NO. 126. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y CD3 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 123 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 124. En otra modalidad,

la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y CD3 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 125 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 126.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y CD3 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 127 y SEC ID NO. 129; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 128 y SEC ID NO. 130. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y CD3 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 127 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 128. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y CD3 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 129 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 130.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y CD3 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 131 y SEC ID NO. 133; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada

del grupo que consiste de las SEC ID NO: 132 y SEC ID NO. 134. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y CD3 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 131 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 132. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y CD3 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 133 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 134.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y CD3 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 135 y SEC ID NO. 137; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 136 y SEC ID NO. 138. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y CD3 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 135 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 136. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y CD3 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 137 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 138.

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a

GA

EGFR (sec. 2) e IGF1R comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 139 y SEC ID NO. 141; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 140 y SEC ID NO. 142. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e IGF1R comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 139 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 140. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e IGF1R tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 141 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 142.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e IGF1R comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 143 y SEC ID NO. 145; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 144 y SEC ID NO. 146. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e IGF1R comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 143 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 144. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e IGF1R tiene una orientación inversa y comprende una

secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 145 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 146.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e IGF1R comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 147 y SEC ID NO. 149; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 148 y SEC ID NO. 150. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e IGF1R comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 147 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 148. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e IGF1R tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 149 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 150.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e IGF1R comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 151 y SEC ID NO. 153; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 152 y SEC ID NO. 154. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e

IGF1R comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 151 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 152. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e IGF1R tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 153 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 154.

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y HGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 155 y SEC ID NO. 157; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 156 y SEC ID NO. 158. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e HGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 155 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 156. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) e HGF tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 157 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 158.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y HGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de

64

las SEC ID NO: 159 y SEC ID NO. 161; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 160 y SEC ID NO. 162. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y HGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 159 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 160. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y HGF tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 161 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 162.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y HGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 163 y SEC ID NO. 165; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 164 y SEC ID NO. 166. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y HGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 163 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 164. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y HGF tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 165 y

una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 166.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y HGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 167 y SEC ID NO. 169; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 168 y SEC ID NO. 170. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y HGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 167 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 168. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y HGF tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 169 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 170.

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 171 y SEC ID NO. 173; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 172 y SEC ID NO. 174. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 171 y una secuencia de

aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 172. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 173 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 174.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 175 y SEC ID NO. 177; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 176 y SEC ID NO. 178. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 175 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 176. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 177 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 178.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 179 y SEC ID NO. 181; y una secuencia de

aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 180 y SEC ID NO. 182. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 179 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 180. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 181 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 182.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 183 y SEC ID NO. 185; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 184 y SEC ID NO. 186. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 183 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 184. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 185 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD

de la SEC ID NO: 186.

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y DLL-4 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 187 y SEC ID NO. 189; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 188 y SEC ID NO. 190. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y DLL-4 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 187 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 188. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y DLL-4 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 189 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 190.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y DLL-4 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 191 y SEC ID NO. 193; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 192 y SEC ID NO. 194. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y DLL-4 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 191 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 192. En

otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y DLL-4 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 193 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 194.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y DLL-4 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 195 y SEC ID NO. 197; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 196 y SEC ID NO. 198. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y DLL-4 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 195 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 196. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y DLL-4 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 197 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 198.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y DLL-4 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 1899 y SEC ID NO.201; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las

SEC ID NO: 200 y SEC ID NO. 202. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y DLL-4 comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 199 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 200. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y DLL-4 tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 201 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 202.

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y PLGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 203 y SEC ID NO. 205; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 204 y SEC ID NO. 206. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y PLGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 203 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 204. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y PLGF tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 205 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 206.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y PLGF comprende una secuencia de

aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 207 y SEC ID NO. 209; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 208 y SEC ID NO. 210. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y PLGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 207 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 208. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y PLGF tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 209 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 210.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y PLGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 211 y SEC ID NO. 213; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 212 y SEC ID NO. 214. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y PLGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 211 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 212. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y PLGF tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de

aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 213 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 214.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y PLGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 215 y SEC ID NO. 217; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 216 y SEC ID NO. 218. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y PLGF comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 215 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 216. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y PLGF tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 217 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 218.

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 219 y SEC ID NO. 221; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 220 y SEC ID NO. 222. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de

cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 219 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 220. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 221 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 222.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 223 y SEC ID NO. 225; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 224 y SEC ID NO. 226. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 223 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 224. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 225 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 226.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste

de las SEC ID NO: 227 y SEC ID NO. 229; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 228 y SEC ID NO. 230. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 227 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 228. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 229 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 230.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 231 y SEC ID NO. 233; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 232 y SEC ID NO. 234. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 231 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 232. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID

NO: 233 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 234.

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 235 y SEC ID NO. 237; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 236 y SEC ID NO. 238. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 235 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 236. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 237 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 238.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 239 y SEC ID NO. 241; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 240 y SEC ID NO. 242. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácido de

cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 239 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 240. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 241 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 242.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 243 y SEC ID NO. 245; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 244 y SEC ID NO. 246. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 243 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 244. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 245 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 246.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de

las SEC ID NO: 247 y SEC ID NO. 249; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 248 y SEC ID NO. 250. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 247 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 248. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 249 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 250.

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 251 y SEC ID NO. 253; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 252 y SEC ID NO. 254. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 251 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 252. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID

NO: 253 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 254.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 255 y SEC ID NO. 257; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 256 y SEC ID NO. 258. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 255 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 256. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 257 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 258.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 259 y SEC ID NO. 261; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 260 y SEC ID NO. 262. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de

cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 259 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 260. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 261 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 262.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 263 y SEC ID NO. 265; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 264 y SEC ID NO. 266. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 263 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 264. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 265 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 266.

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y RGMa comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID

NO: 267 y SEC ID NO. 269; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 268 y SEC ID NO. 270. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y RGMa comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 267 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 268. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y RGMa tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 269 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 270.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y RGMa comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 271 y SEC ID NO. 273; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 272 y SEC ID NO. 274. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y RGMa comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 271 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 272. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y RGMa tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 273 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD

de la SEC ID NO: 274.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y RGMa comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 275 y SEC ID NO. 277; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 276 y SEC ID NO. 278. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y RGMa comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 275 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 276. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y RGMa tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 277 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 278.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y RGMa comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 279 y SEC ID NO. 281; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 280 y SEC ID NO. 282. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y RGMa comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 279 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD

de la SEC ID NO: 280. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y RGMa tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 281 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 282

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 283 y SEC ID NO. 285; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 284 y SEC ID NO. 286. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 283 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 284. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y tétanos toxoide tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 285 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 286

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 287 y SEC ID NO. 289; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que

consiste de las SEC ID NO: 288 y SEC ID NO. 290. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 287 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 288. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y tétanos toxoide tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 289 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 290.

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 291 y SEC ID NO. 293; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 292 y SEC ID NO. 294. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 291 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 292. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y tétanos toxoide tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 293 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 294.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 295 y SEC ID NO. 297; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 296 y SEC ID NO. 298. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 295 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 296. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a EGFR (sec. 1) y tétanos toxoide tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 297 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 298

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a VEGF (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 299 y SEC ID NO. 301; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 300 y SEC ID NO. 302. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a VEGF (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 299 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 300. En

otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a VEGF (sec. 1) y tétanos toxoide tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 301 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 302

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir a VEGF (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 303 y SEC ID NO. 305; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 304 y SEC ID NO. 306. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a VEGF (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 305 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 304. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a VEGF (sec. 1) y tétanos toxoide tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 305 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 306

En una tercera modalidad, la proteína de unión capaz de unir a VEGF (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 307 y SEC ID NO. 309; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que

consiste de las SEC ID NO: 308 y SEC ID NO. 310. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a VEGF (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 307 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 308. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a VEGF (sec. 1) y tétanos toxoide tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 309 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 310.

En una cuarta modalidad, la proteína de unión capaz de unir a VEGF (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 311 y SEC ID NO. 313; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 312 y SEC ID NO. 314. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a VEGF (sec. 1) y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 311 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 312. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a VEGF (sec. 1) y tétanos toxoide tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 313 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 314

En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir a tétanos toxoide y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 315 y SEC ID NO. 317; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 316 y SEC ID NO. 318. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir tétanos toxoide y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 315 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 316. En otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a tétanos toxoide y tétanos toxoide tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 317 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 318.

En una segunda modalidad, la proteína de unión capaz de unir tétanos toxoide y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD del grupo que consiste de las SEC ID NO: 319 y SEC ID NO. 321; y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD seleccionada del grupo que consiste de las SEC ID NO: 320 y SEC ID NO. 322. En una modalidad, la proteína de unión capaz de unir tétanos toxoide y tétanos toxoide comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 319 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 320. En

otra modalidad, la proteína de unión capaz de unir a tétanos toxoide y tétanos toxoide tiene una orientación inversa y comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de DVD de la SEC ID NO: 321 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de DVD de la SEC ID NO: 322.

En una modalidad, la secuencia EGFR VH de cualquiera de DVD-Ig descrito anteriormente comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las SEC ID NOs: 323 o 327. En otra modalidad la secuencia EGFR VL de cualquiera de DVD-Ig descrito anteriormente comprende la secuencia de aminoácido de cualquiera de las SEC ID NOs. 324, 326, ó 328.

En otra modalidad la invención proporciona 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 de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo madre (o porción de unión a antígeno del mismo); VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo madre (o porción de unión a antígeno del mismo); C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlace con la condición de que no sea CH1, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente. En una modalidad, la región Fc está ausente en la proteína de unión.

En otra modalidad, la invención proporciona 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 de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo madre (o porción de unión a antígeno del mismo); VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo madre (o porción de unión a antigeno del mismo), C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlace con la condición de que no sea CH1, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente. En una modalidad, (X2)n está ausente en la proteína de unión.

En otra modalidad, la proteína de unión de la presente descripción comprende las primeras y segundas cadenas de polipéptido, en donde la 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 madre (o porción de unión a antígeno del mismo); VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlace con la condición de que no sea CH1, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente; y en donde la 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 madre o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlace con la condición de que no sea CH1, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente. En otra modalidad, la proteína de unión comprende dos primeras cadenas de polipéptido y dos segundas cadenas de polipéptido. En aún otra modalidad (X2)n está ausente en el segundo polipéptido. En aún otra modalidad, la región Fc, si está presente en el primer polipéptido, seleccionada del grupo que consiste de una región Fc de secuencia nativa y una región Fc de secuencia variable. En aún otra modalidad, 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 modalidad, la proteína de unión de la presente descripción es una DVD-Ig capaz de unir a dos antígenos que comprenden cuatro cadenas de polipéptido, en donde cada una de las primeras y terceras cadenas 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 madre o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo

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

La invención proporciona un método para hacer una proteína de unión de DVD-Ig seleccionando previamente los anticuerpos madre. En una modalidad el método para hacer una Inmonoglubila de Dominio Variable Dual capaz de unir a dos antígenos que comprende las etapas de a) obtener un primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unir a un primer antígeno; b) obtener un segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unir a un segundo antígeno; c) construir las primeras y terceras cadenas de polipéptido, que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido del primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido del segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlace con la condición de que no sea CH1, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente; d) construir las segundas y cuartas cadenas de polipéptido, que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido del primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido del segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlace con la condición de que no sea CH1, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente; y e) expresar las primeras, segundas, terceras y cuartas cadenas de polipéptido; tal que se genere una Inmonoglobulina de Dominio Viarable Dual capaz de unir el primer antígeno y el segundo antígeno.

En aún otra modalidad, la invención proporciona un método para generar una Inmonoglobulina de Dominio Viarable Dual que pueda unir a dos antígenos con las características deseadas, que comprende las etapas de a) obtener un primer anticuerpo madre o

porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unir a un primer antígeno y que posee por lo menos una de las características deseadas exhibidas por la inmunoglobulina de Dominio Variable Dual; b) obtener un segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unir a un segundo antígeno, y posee por lo menos una de las características deseadas exhibidas por la inmunoglobulina de Dominio Variable Dual; c) construir las primeras y terceras cadenas de polipéptido que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido del primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido del segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlace con la condición de que no sea CH1, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente; d) construir las segundas y cuartas cadenas de polipéptido que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido del primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido del segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlace con la condición de que no sea CH1, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde (X2)n

está presente o ausente; e) expresar las primeras, segundas, terceras y cuartas cadenas de polipéptido; tal que se genere una inmunoglobulina de dominio variable dual que pueda unir los primeros y segundos antígenos con las características deseadas.

En una modalidad, el VD1 de las primeras y segundas cadenas de polipéptido descritas en la presente se obtienen del mismo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo. En otra modalidad, el VD1 de las primeras y segundas cadenas de polipéptido descritas en la presente se obtiene de diferentes anticuerpos madre o porciones de unión a antígeno de los mismos. En otra modalidad, el VD2 de las primeras y segundas cadenas de polipéptido descritas en la presente se obtiene del anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo. En otra modalidad, el VD2 de las primeras y segundas cadenas de polipéptido descritas en la presente se obtienen de diferentes anticuerpos madre o porciones de unión a antígeno de los mismos.

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

En una modalidad, el primer anticuerpo madre, o porción de unión a antígeno del mismo, une un primer antígeno y un segundo

anticuerpo madre, o porción de unión a antígeno del mismo, une un segundo antígeno. En una modalidad particular, los primeros y segundos antígenos son el mismo antígeno. En otra modalidad, los anticuerpos madre unen diferentes epítopos en el mismo antígeno. En otra modalidad, los primeros y segundos antígenos son diferentes antígenos. En otra modalidad, el primer anticuerpo madre, o porción de unión a antígeno del mismo, une el primer antígeno con una potencia diferente de la potencia con la cual el segundo anticuerpo madre, o porción de unión a antígeno del mismo, une el segundo antígeno. En aún otra modalidad, el primer anticuerpo madre, o porción de unión a antígeno del mismo, une el primer antígeno con una afinidad diferente de la afinidad con la cual el segundo anticuerpo madre, o porción de unión a antígeno del mismo, une el segundo antígeno.

En otra modalidad, el primer anticuerpo madre, o porción de unión a antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo madre, o porción de unión a antígeno del mismo, se seleccionan del grupo que consiste del anticuerpo humano, anticuerpo injertado en CDR, y anticuerpo humanizado. En una modalidad, las porciones de unión a antígeno se seleccionan del grupo que consiste de un fragmento Fab; fragmento $F(ab')_2$; fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace de disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste de los dominios de VH y CH1; un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de una sola ramificación de un anticuerpo; un

fragmento dAb; una región de determinación de complementariedad (CDR) aislada; un anticuerpo de cadena simple; y diacuerpos.

En otra modalidad, la proteína de unión de la presente descripción posee por lo menos una de las características deseadas exhibidas por el primer anticuerpo madre, o porción de unión a antígeno del mismo, o segundo anticuerpo madre, o porción de unión a antígeno del mismo. Alternativamente, el primer anticuerpo madre, o porción de unión a antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo madre, o porción de unión a antígeno del mismo, poseen por lo menos una de las características deseadas exhibidas por la Inmonoglobulina de Domino Variable Dual. En una modalidad, la característica deseada se selecciona de uno o más parámetros del anticuerpo. En otra modalidad, los parámetros del anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítopo, estabilidad, solubilidad, eficacia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y unión a antígeno ortólogo. En una modalidad, la proteína de unión es multivalente. En otra modalidad, la proteína de unión es multiespecífica. Las proteínas de unión multivalentes y/o multiespecíficas descritas en la presente tienen las características deseables particularmente desde un punto de vista terapéutico. Por ejemplo, la proteína de unión multivalente y/o

multiespecíficas puede se (1) internalizada (y/o catabolizada) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al cual los anticuerpos se unen; (2) un anticuerpo agonista; y/o (3) induce la muerte celular y/o apoptosis de una célula que expresa un antígeno al cual el anticuerpo multivalente se puede unir. El "anticuerpo madre", que proporciona por lo 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 expresa un antígeno al cual el anticuerpo se une y/o pueda ser un agonista, anticuerpo que induce la muerte celular célula y/o que induce la apoptosis, y la proteína de unión multivalente y/o multiespecífica según lo descrito en la presente puede exhibir mejoras en uno o más de estas características. Por otra parte, el anticuerpo madre puede carecer de cualquiera de una o más de estas características, pero se puede dotar con ellas cuando se construye como proteína de unión multivalente según lo descrito en la presente.

En otra modalidad la proteína de unión de la presente descripción tiene una constante de índice de unión ($K_{on}$) a uno o más objetivos seleccionados del grupo que consiste de: por lo menos aproximadamente $10^2M^{-1}s^{-1}$; por lo menos aproximadamente $10^3M^{-1}s^{-1}$; por lo menos aproximadamente $10^4M^{-1}s^{-1}$; por lo menos aproximadamente $10^5M^{-1}s^{-1}$; y por lo menos aproximadamente $10^6M^{-1}s^{-1}$, según lo medido por la resonancia de

plasmón superficial. En una modalidad, la proteína de unión de la invención tiene una constante de índice ($K_{on}$) a uno o más objetivos de entre $10^2M^{-1}s^{-1}$ y $10^3M^{-1}s^{-1}$; entre $10^3M^{-1}s^{-1}$ y $10^4MM^{-1}s^{-1}$; entre $10^4M^{-1}s^{-1}$ y $10^5M^{-1}s^{-1}$; o entre $10^5M^{-1}s^{-1}$ y $10^6M^{-1}s^{-1}$, según lo medido por la resonancia de plasmón superficial.

En otra modalidad, la proteína de unión tiene una constante de índice de desunión ($K_{off}$) para uno o más objetivos seleccionados del grupo que consiste de: a lo sumo aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; a lo sumo aproximadamente de $10^{-4}s^{-1}$; a lo sumo aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; y a lo sumo aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, según lo medido por la resonancia de plasmón superficial. En una modalidad, la proteína de unión de la invención tiene una constante de índice de desunión ($K_{off}$) a uno o más objetivos de aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$ a $10^{-4}s^{-1}$; $10^{-4}s^{-1}$ a $10^{-5}s^{-1}$; o $10^{-5}s^{-1}$ a $10^{-6}s^{-1}$, según lo medido por la resonancia de plasmón superficial.

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

En otra modalidad, la proteína de unión descrita en la presente es un conjugado que adicionalmente comprende un agente seleccionado del grupo que consiste de una molécula de inmunoadhesión, un agente de visualización, un agente terapéutico, y un agente citotóxico. En una modalidad el agente de visualización se selecciona del grupo que consiste de una radioetiqueta, enzima, etiqueta fluorescente, etiqueta luminescente, etiqueta bioluminiscente, etiqueta magnética, y biotina. En otra modalidad, el agente de visualización es una radioetiqueta seleccionada 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 aún otra modalidad, el agente terapéutico o citotóxico se selecciona del grupo que consiste de un anti-metabolito, agente alquilizante, antibiótico, factor de crecimiento, citosina, agente anti-angiogénico, agente antimitótico, antraciclina, toxina, y un agente apoptótico.

En otra modalidad, la proteína de unión descrita en la presente es una proteína de unión cristalizada y existe como cristal. En una modalidad, el cristal es un cristal de liberación controlada de farmacéutico libre de portador. En otra más modalidad, la proteína de unión cristalizada tiene una mayor vida media *in vivo* que las contrapartes solubles de la proteína de unión. En aún otra modalidad, la proteína de unión cristalizada conserva una actividad biológica.

En otra modalidad, la proteína de unión descrita en la

presente es glicosilada. Por ejemplo, la glicosilación es un patrón de glicosilación humana.

Un aspecto de la invención pertenece a un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de las proteínas de unión descritas en la presente. Otra modalidad proporciona un vector que comprende el ácido nucleico aislado descrito en la presente, en donde el vector se selecciona del grupo que consiste de pcADN; pTT (Durocher y colaboradores *Nucleic Acids Research* 2002 Vol. 30: No.2); pTT3 (pTT con el sitio de clonación múltiple adicional; pEFBOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) *Nucleic Acids Research* Vol. 18: No. 17); pBV; pJV; pcADN3.1 TOPO; pEF6 TOPO; y pBJ. En una modalidad, el vector es un vector descrito en la Solicitud de Patente Norteamericana No. 61/021,282.

En otro aspecto, una célula hospedadora se transforma con el vector descrito en la presente. En una modalidad, la célula hospedadora es una célula procariota. En otra modalidad la célula hospedadora es *E. coli*. En una modalidad relacionada, la célula hospedadora es una célula eucariota. En otra modalidad, la célula eucariota se selecciona del grupo que consiste de una célula protista, célula animal, célula vegetal y célula fúngica. En aún otra modalidad, la célula hospedadora es una célula mamífera que incluye, pero no se limita a, CHO, COS, NS0, SP2, PER.C6, célula fúngica, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, o una célula de insecto, tal como Sf9.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de producción de la proteína de unión descrita en la presente, que comprende cultivar cualquiera de las células hospedadoras también descritas en la presente en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir la proteína de unión. En una modalidad, 50%-75% de la proteína de unión producida con este método es una proteína de unión tetravalente específica dual. En una modalidad particular, 75%-90% de la proteína de unión producida con este método es una proteína de unión tetravalente específica dual. En una modalidad particular, 90%-95% de la proteína de unión producida es una proteína de unión tetravalente específica dual.

Una modalidad proporciona 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, según lo descrito en la presente, y un ingrediente, y por lo menos un portador polimérico. Por ejemplo, el portador polimérico comprende uno o más polímeros seleccionados del grupo que consiste de: poli(ácido de acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona), poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil)metacrilamida), poli[(organo)fosfaceno], poli(orto-ésteres), poli(alcohol de vinilo), poli(vinilpirrolidona),

copolímeros de anhídrido maleico-alquilviniléter, 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 se puede seleccionar del grupo que consiste de albúmina, sucrosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil-β-ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol. Otra modalidad proporciona un método para tratar un mamífero que comprende la etapa de administración al mamífero de una cantidad eficaz de la composición descrita en la presente.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión, según lo descrito en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra modalidad la composición farmacéutica comprende por lo menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno. Por ejemplo, el agente adicional se selecciona del grupo que consiste de: un agente terapéutico, agente de visualización, agente citotóxico, inhibidor de angiogenesis (incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo anti-VEGF o VEGF-trap), inhibidor de cinasa (incluyendo, pero sin limitarse a, un inhibidor de KDR y TIE-2), un bloqueador de molécula de co-estímulo (incluyendo, pero sin limitarse a, anti-B7.1, anti-B7.2, CTLA4-Ig, anti-CD20), un bloqueador de molécula de adherencia (incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo anti-LFA-1, un

anticuerpo de anti-selectina E/L, un inhibidor de molécula pequeña), un anticuerpo anti-citosina o un fragmento funcional del mismo (incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo del receptor anti-IL-18, anti-TNF, y anti-IL-6/citosina), metotrexato, ciclosporina, rapamicina, FK506, una etiqueta o reportero detectable, antagonista de TNF, antirreumático, relajante muscular, narcótico, fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), analgésico, anestésico, sedante, anestésico local, bloqueador neuromuscular, antimicrobiano, antipsoriásico, corticosteroide, esteroide anabólico, eritropoyetina, inmunización, inmunoglobulina, inmunosupresivo, hormona de crecimiento, fármaco de reemplazo de hormona, radiofarmacéutico, un antidepresivo, antipsicótico, estimulante, medicación de asma, agonista beta, esteroide inhalado, epinefrina o análogo, citosina, y un antagonista de citosina.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar un sujeto humano que sufre de un trastorno en el cual el objetivo, u objetivos, que se pueden unir por la proteína de unión descrita en la presente son perjudiciales, comprende la administración al sujeto humano una proteína de unión descrito en la presente tal que la actividad del objetivo, u objetivos, en el sujeto humano sean inhibidos y uno de más de los síntomas sean aliviados o se alcance el tratamiento. Por ejemplo, el trastorno puede ser artritis, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lime, artritis psoriática, artritis reactiva,

espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de intestino inflamatorio, diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, escleroderma por dermatitis, injerto contra enfermedad de anfitrión, rechazo de trasplante de órgano, enfermedad inmune aguda o crónica asociada al trasplante de órgano, sarcoidosis, ateroesclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, purpurea de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveitis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversal aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, malignidades, paro cardíaco, infarto del miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular esporádica tipo I y deficiencia poliglandular esporádica tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria (aguda) en adultos, alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriática, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropática, clamidia, yersinia y artropatía asociada a salmonela, espondiloartropatía, enfermedad

ateromatosa/arterioesclerosis, alergia atópica, enfermedad bulosa autoinmune, pénfigo vulgaris, pénfigo foliáceo, enfermedad penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica positiva de Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de célula gigante, hepatitis esclerótica primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, síndrome de enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, hepatitis B, hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, falla ovárica, falla ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosa criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada a la enfermedad de tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada a la enfermedad de tejido conectivo mezclada, enfermedad pulmonar intersticial asociada a la esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada a la artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada al lupus sistémico eritematoso, enfermedad pulmonar asociada a dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada a la enfermedad de Sjögren, enfermedad pulmonar asociada a la espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, enfermedad pulmonar asociada a la

hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármaco, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, pulmonía eosinófila crónica, enfermedad pulmonar infiltrativa linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial post-infección, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo 1 (hepatitis autoinmune o lupoide clásica), hepatitis autoinmune tipo 2 (hepatitis de anticuerpo anti-LKM), hipoglucemia mediada autoinmune, resistencia a insulina tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada al trasplante de órgano, enfermedad inmune crónica asociada al trasplante de órgano, osteoartrosis, colangitis esclerótica primaria, psoriasis tipo 2, psoriasis tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasulitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, masculina infertilidad idiopática o NOS, autoinmunidad de esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria a la enfermedad de tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjörgren, enfermedad de Takayasu/arteritis, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad de tiroides autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune con bocio (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico,

mixoedema primario, uveitis facogénica, vasculitis primaria, enfermedad hepática aguda con vitiligo, enfermedad hepática crónica, cirrosis alcohólica, lesión hepática inducida por alcohol, coleosatatis, laenfermedad hepática idiosincrásica, hepatitis inducida por fármaco, esteatohepatitis sin alcohol, alergia y asma, infección por estreptococos del grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas por la especie Th2 y Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), y cánceres tal como de pulmón, pecho, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovárico, cáncer de próstata y rectal y malignidades hematopoyéticas (leucemia y linfoma), abetalipoprotemia, acrocianosis, procesos parasitarios 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 aloingerto, deficiencia de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de células de cuerno anterior, terapia anti-cd3, síndrome de antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticas y periféricas, disección aórtica, hipertensión arterial, arteriosclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación atrial (continua o paroxismal), agitación atrial,

bloqueo auriculoventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto de hueso, rechazo de trasplante médula (BMT), bloqueo de ramificación de conjunto, linfoma de Burkitt, quemaduras, arritmias cardiacas, síndrome de parálisis cardiaco, tumores cardiacos, cardiomiopatía, respuesta inflamatoria a derivación cardiopulmonar, rechazo de trasplante de cartílago, degeneraciones corticales cerebelosas, trastornos cerebelosos, taquicardia atrial caótica o multifocal, trastornos asociados a la quimioterapia, leucemia mielocitic crónica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructora crónica (COPD), intoxicación crónica por salicilato, carcinoma colorrectal, paro cardíaco congestivo, conjuntivitis, dermatitis de contacto, cor pulmonale, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis negativa de cultivo, fibrosis enquistada, trastornos asociados a la terapia con citosina, demencia pugilistica, enfermedades desmielinizantes, fiebre hemorrágica por dengue, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad aterosclerótica diabética, enfermedad corporal difusa de Lewy, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos de ganglios básicos, síndrome de Down a mediana edad, trastornos de movimiento inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina de CNS, sensibilidad a fármaco, eczema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección con virus de epstein-barr, eritromelalgía,

trastornos extrapiramidales y cerebelosos, limfohistiocitosis hematofagocítica familiar, rechazo fetal de implante de timo, ataxia de Friedreich, trastornos arteriales periféricos funcionales, sepsis fúngica, gangrena por gas, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, sepsis gram-negativa, sepsis gram-positiva, granulomas debido a los organismos intracelulares, leucemia de células capilares, enfermedad de Hallerrorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre de heno, rechazo de trasplante de corazón, hemacromatosis, hemodialisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias por haz de His, infección de VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimiento hipercinéticos, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos de movimiento hipocinéticos, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal, 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 por ionización, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesión por squemia-reperfusión, infarto isquémico, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo de trasplante de riñón, legionelosis, leishmaniasis, lepra, lesiones de sistema corticospital, lipedema, rechazo de trasplante de hígado, linfedema, malaria, linfoma maligno, histiocitosis maligno,

MO

melanoma maligno, meningitis, meningococcemia, enfermedades metabólicas/idiopáticas, dolor de cabeza por migraña, trastorno mitocondrial de múltiples sistemas, enfermedad mezclada de tejido conectivo, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, mycobacterium avium intracellulare, tuberculosis por micobacteria, síndrome mielodiplásico, infarto del miocardio, trastornos isquémicos del miocardio, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofias musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma no Hodgkins, obstrucción de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos arteriales oclusivos, terapia de okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos de revocación de orquitis/vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo de trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad, rechazo de trasplante de paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad pericardial, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía de pneumocistis carinii, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal, y síndrome de cambios de piel), síndrome post-perfusión, complicación de derivación cardiopulmonar, síndrome de cardiotomía post-MI, pre-eclampsia,

parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, radioterapia, fenómeno y enfermedad Raynoud, enfermedad de Raynoud, enfermedad de Refsum, taquicardias regulares de QRS estrecho, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, demencia senil del tipo corporal de Lewy, artropatías seronegativas, choque, anemia falciforme, rechazo de aloinjerto de piel, síndrome de cambios de piel, rechazo de trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelosas, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerótica subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxia sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumatoide juvenil de inicio sistémico, ALL de células T o FAB, telangiectasia, tromboangeítis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, trauma/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades cardíacas valvulares, varices, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones vírales y fúngicas, encefalitis vital/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico asociado vital, síndrome de Wernicke- Korsakoff, enfermedad de Wilson, o rechazo de xenoinjerto de cualquier órgano o tejido.

En una modalidad, las enfermedades capaces de ser

tratadas o diagnosticadas con las composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, cánceres primarios y metastásicos, incluyendo carcinomas de mama, colon, recto, pulmón, orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula biliar y conductos biliares, intestino delgado, tracto urinario (incluyendo riñón, vejiga y urotelio), tracto genital femenino (incluyendo cerviz, útero, y ovarios así como coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestacional), tracto genital masculino (incluyendo tumores de próstata, vesículas seminales, testículos y células germinales), glándulas endocrinas (incluyendo tiroides, suprarrenal, y glándulas pituitarias), y piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluyendo aquellos que se presentan en hueso y tejidos suaves así como sarcoma de Kaposi), tumores de cerebro, nervios, ojos, y meninges (incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, schwanomas, y meningiomas), tumores sólidos que se presentan a partir de malignidades hematopoyéticas tal como leucemias, y linfomas (linfomas de Hodgkin y no Hodgkin).

En una modalidad, los anticuerpos de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos se utilizan para tratar el cáncer o inhibir la metástasis de los tumores descritos en la presente, cuando se utilizan solos o en combinación con radioterapia y/u otros agentes quimioterapéuticos.

En otro aspecto la invención proporciona un método para

tratar a un paciente que sufre de un trastorno que comprende la etapa de administrar las proteínas de unión descritas en la presente antes, concurrentemente, o después de la administración de un segundo agente, según lo discutido en la presente. En una modalidad particular, el segundo agente se selecciona del grupo que consiste budesónida, factor de crecimiento epidérmico, corticoesteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipooxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor IL-1, mAbs anti-IL-1β, mAbs anti-IL-6 o 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, mofetilo de micofenolato, leflunomida, NSAIDs, ibuprofeno, corticoesteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adensosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de cinasa MAP, inhibidores de enzima de conversión de IL-1β, inhibidores de enzima de conversión de TNFα, inhibidores de señalización de células T, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina,

azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima de conversión deangiotensina, receptores de citosina solubles, receptor soluble de p55 TNF, receptor soluble de p75 TNF, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citosinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ.

En una modalidad particular, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente son administradas al paciente mediante por lo menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intrarticular, intrabronquial, intrabdominal, intracapsular, intracartilago, intracavidad, intracelial, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraosteal, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarectal, intrarenal, intrarretiniano, intraspinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, y transdérmico.

Un aspecto de la invención proporciona por lo menos un anticuerpo anti-idiotípico a por lo menos una proteína de unión de la invención. El anticuerpo anti-idiotípico incluye cualquier proteína o péptido que contenga la molécula que comprende por lo menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, tal como, pero sin limitarse a, por lo menos una región de determinación complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión de ligando de la misma, una región

variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región estructural, o cualquier porción de la misma, que se pueda incorporar en una proteína de unión de la presente invención.

**Breve Descripción de los Dibujos**

La figura 1A es una representación esquemática de los constructos de dominio variable dual (DVD)-Ig y muestra la estrategia para la generación de un DVD-Ig de los dos anticuerpos madre.

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

**Descripción Detallada de la Invención**

La invención pertenece a las proteínas de unión multivalentes y/o multiespecíficas capaces de unir a dos o más antígenos. Específicamente, la invención se relaciona con las inmunoglobulinas de dominio variable dual (DVD-Ig), y las composiciones farmacéuticas de las mismas, así como ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células hospedadoras para hacer tales DVD-Igs. Los métodos para usar los DVD-Igs de la invención para detectar los antígenos específicos, *in vitro* o *in vivo* también son comprendidos por la invención.

A menos que se defina lo contrario en la presente, los

términos científicos y técnicos usados con respecto a la invención tienen los significados que son entendidos comúnmente por los expertos en la técnica. El significado y alcance de los términos deben ser claros; sin embargo, en caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente toman precedente sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Además, a menos que sea requerido lo contrario por el contexto, los términos singulares incluirán los términos plurales y los términos plurales incluirán los términos singulares. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluir", así como otras formas, por ejemplo "incluye" y "incluido" no está limitando. También, los términos tal como "elemento" o "componente" comprenden los elementos y componentes que comprenden una unidad y los elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se indique específicamente lo contrario.

Generalmente, las nomenclaturas usadas con respecto a, y a técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteína y ácido nucleico, descritas en la presente son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en la técnica y según lo descrito en varias referencias generales y más

específicas que se citan y discuten a través de la presente especificación a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, según lo logrado comúnmente en la técnica o según lo descrito en la presente. Las nomenclaturas usadas con respecto a, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, la química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica, descritas en la presente son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Las técnicas estándar se utilizan para las síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y suministro, y tratamiento de pacientes.

Para que la invención se pueda entender más fácilmente, se seleccionan los términos definidos a continuación.

El término "polipéptido", según lo utilizado en la presente, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se utilizan alternativamente con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" comprende las proteínas, fragmentos de proteína, y análogos de polipéptido de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación no se asocia a los componentes asociados

naturalmente que la acompañan en su estado nativo; está sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; es expresado por una célula de una diferente especie; o no se encuentra en la naturaleza. Así, un polipéptido que se sintetiza químicamente o que está sintetizado en un sistema celular diferente de la célula de la cual se origina naturalmente será "aislado" de sus componentes naturalmente asociados. Una proteína se puede también hacer sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados por el aislamiento, usando las técnicas de purificación de proteína bien conocidas en la técnica.

El término "recuperación", según lo utilizado en la presente, se refiere al proceso de producir una especie química, tal como un polipéptido, sustancialmente libre de los componentes naturalmente asociados por aislamiento, por ejemplo, usando las técnicas de purificación de proteína bien conocidas en la técnica.

La "actividad biológica", según lo utilizado en la presente, se refiere a cualquiera de una o más características biológicamente inherentes de una molécula. Las características biológicas incluyen pero no se limitan a la unión de un receptor, inducción de la proliferación celular, inhibición del crecimiento celular, inducción de otras citosinas, inducción de apoptosis, y actividad enzimática.

Los términos "unión específica" o "unir específicamente", según lo utilizado en la presente, en referencia a la interacción

de un anticuerpo, proteína, o péptido con una segunda especie química, significan que la interacción es dependiente de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante o epítopo antigénico) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y une a una estructura de proteína especifica, en lugar de a las proteínas generales. Si un anticuerpo es específico para el epítopo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítopo A (o A libre sin etiquetar) en una reacción que contiene "A" etiquetado y el anticuerpo reducirá la cantidad de A etiquetado unido al anticuerpo.

El término "anticuerpo", según lo utilizado en la presente, se refiere ampliamente a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento, mutante, variante, o derivación funcional de las mismas, que conserve las características de unión a epítopo esenciales de una molécula de Ig. Tales formatos de anticuerpo mutantes, variantes, o derivados se conocen en la técnica, y los ejemplos no limitantes de los mismos se discuten posteriormente en la presente.

En un anticuerpo integral, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera

(abreviada en la presente como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones de VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en las regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones de determinación de complementariedad (CDR), entremezcladas con las regiones que son conservadas, llamadas regiones estructurales. Cada VH y VL se compone de tres CDRs y cuatro FRs, ubicadas desde la terminal amino a la terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), o subclase.

El término "región Fc" se utiliza para definir la región de terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina, que se puede generar por la digestión de papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc nativa de la secuencia o una región Fc variable. La región 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 los residuos de aminoácido en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo, se conocen en la técnica (Patentes Norteamericanas Nos. 5,648,260 y 5,624,821). La porción Fc de un anticuerpo media varias funciones efectoras importantes, por

ejemplo, la inducción de citosina, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, por sus siglas en inglés), y vida media/índice de eliminación del anticuerpo y complejos de antígeno-anticuerpo. Estas funciones efectoras son en algunos casos deseables para un anticuerpo terapéutico pero en otros casos pueden ser innecesarias o incluso dañinas, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humano, particularmente IgG1 e IgG3, ADCC mediado y CDC vía unión a FcγRs y complemento C1q, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la vida media de circulación de los anticuerpos. En aún otra modalidad, por lo menos un residuo de aminoácido se sustituye en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, tal que las funciones efectoras del anticuerpo sean alteradas. La dimerización de dos cadenas pesadas idénticas de una inmunoglobulina es mediada por la dimerización de los dominios CH3 y estabilizada por los enlaces de disulfuro dentro de la región bisagra (Huber y colaboradores (1976) Nature 264: 415-20; Thies y colaboradores (1999) J. Mol. Biol. 293: 67-79). La mutación de los residuos de cisteína dentro de las regiones bisagra para prevenir que los enlaces de disulfuro de cadena pesada-cadena pesada desestabilicen la dimeración de los dominios CH3. Los residuos responsables de la dimerización de CH3 se han identificado (Dall' Acqua (1998) Biochem. 37: 9266-73). Por lo tanto, es posible generar una mitad

monovalente-Ig. Notablemente, estas moléculas de mitad monovalente-Ig se han encontrado en la naturaleza para las subclases IgG e IgA (Seligman (1978) Ann. Immunol. 129: 855-70; Biewenga y colaboradores, (1983) Clin. Exp. Immunol. 51: 395-400). La estequiometría de la región FcRn:Ig Fc se ha determinado como 2:1 (West y colaboradores (2000) Biochem. 39: 9698-708) y la mitad Fc es suficiente para mediar la unión de FcRn (Kim y colaboradores (1994) Eur. J. Immunol. 24: 542-548). Las mutaciones para interrumpir la dimerización del dominio CH3 pueden no tener mayor efecto nocivo en su unión de FcRn mientras que los residuos importantes para la dimerización de CH3 están ubicados en la interfaz interna de la estructura de hoja de CH3 b, mientras que la región responsable de la unión de FcRn esté ubicada en la interfaz exterior de los dominios CH2-CH3. Sin embargo, la molécula de la mitad-Ig puede tener ciertas ventajas sobre la penetración del tejido debido a su tamaño más pequeño con respecto al de un anticuerpo regular. En una modalidad, por lo menos un residuo de aminoácido se sustituye en la región constante de la proteína de unión de la invención, por ejemplo la región Fc, tal que la dimerización de las cadenas pesadas sea interrumpida, dando por resultado las moléculas de mitad-DVD-Ig.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), según lo utilizado en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que

conservan la capacidad de unir específicamente a un antígeno. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar por los fragmentos de un anticuerpo integral. Tales modalidades del anticuerpo pueden también ser formatos biespecíficos, específicos duales, o multiespecíficos — que unen específicamente a dos o más diferentes antígenos. Los ejemplos de los fragmentos de unión comprendidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace 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 una sola ramificación de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward (1989) Nature 341 : 544-546; y al Publicación PCT No. WO 90/05144 A1), que comprende un solo dominio variable; y (vi) una región de determinación de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por los genes separados, se pueden acoplar, usando los métodos recombinantes, por un enlace sintético que les permite ser una cadena de proteína simple en donde las regiones VL y VH se aparean para formar las moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); ver por ejemplo, Bird y colaboradores (1988) Science 242: 423-426; y Huston y

colaboradores (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Tales anticuerpos de cadena simple también se piensan para ser comprendidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos de cadena simple, tal como diacuerpos, también son comprendidos. Los diacuerpos son los anticuerpos bivalentes y biespecíficos en los cuales los dominios VH y VL se expresan en una cadena simple de polipéptido, solamente usando un enlace que es demasiado corta para permitir que se apareen entre los dos dominios en la misma cadena, para de tal modo forzar los dominios a que se apareen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno (ver, por ejemplo, Holliger, P. y colaboradores (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, RJ. y colaboradores (1994) Structure 2:_1 121-1123). Tales porciones de unión del anticuerpo se conocen en la técnica (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York, pp.790 (ISBN 3-540-41354-5)). Además los anticuerpos de cadena simple también incluyen los "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con los polipéptidos complementarios de cadena ligera, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata y colaboradores (1995) Protein Eng. 8(10): 1057-1062 y la Patente Norteamericana No. 5,641,870).

El término "proteína de unión multivalente" se utiliza a través de esta especificación para denotar una proteína de unión

que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. En una modalidad la proteína de unión multivalente se diseña para tener tres o más sitios de unión a antígeno y no es generalmente un anticuerpo natural. El término "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz unir dos o más objetivos relacionados o sin relación. Las proteínas de unión de dominio variable dual (DVD) de la invención comprenden dos o más sitios de unión a antígeno y son las proteínas de unión tetravalentes o multivalentes. Los DVDs pueden ser monoespecíficos, es decir, unir a un antígeno, o multiespecíficas, es decir unir a dos o más antígenos. Las proteínas de unión de DVD que comprenden dos polipéptidos de DVD de cadena pesada y dos polipéptidos de DVD de cadena ligera son referidos como DVD-Ig. Cada mitad de DVD-Ig comprende un polipéptido de DVD de cadena pesada, y un polipéptido de 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 implicadas en la unión a antígeno por sitio de unión a antígeno.

El término "anticuerpo biespecífico", según lo utilizado en la presente, se refiere a los anticuerpos integrales que son generados por la tecnología de cuadroma (ver Milstein, C. and Cuello, A.C. (1983) Nature 305(5934): p. 537-540), por la conjugación química de dos diferentes anticuerpos monoclonales (ver Staerz, U.D. y colaboradores (1985) Nature 314(6012): 628-

31), o por la mutación de acoplamiento o métodos similares, que introducen las mutaciones en la región Fc (ver Holliger, P. y colaboradores (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90(14): 6444-8.18), dando por resultado múltiples diferentes especies de inmunoglobulina de la cuales solamente una es el anticuerpo biespecífico funcional. Por la función molecular, un anticuerpo biespecífico une un antígeno (o epítopo) en una de sus dos ramificaciones de unión (un par de HC/LC), y une un diferente antígeno (o epítopo) en su segunda ramificación (un diferente par de HC/LC). Por esta definición, un anticuerpo biespecífico tiene dos distintas ramificaciones de unión a antígeno (en las secuencias de especificidad y CDR), y es monovalente para cada antígeno que une.

El término "anticuerpo específico dual", según lo utilizado en la presente, se refiere a los anticuerpos integrales que pueden unir dos diferentes antígenos (o epítopos) en cada una de sus dos ramificaciones de unión (un par de HC/LC) (ver la Publicación PCT No. WO 02/02773). Una proteína de unión específica dual tiene; por consiguiente dos ramificaciones de unión a antígeno idénticas, con especificidad idéntica y secuencias de CDR idénticas, y es bivalente para cada antígeno al cual une.

Un "sitio de unión a antígeno funcional" de una proteina de unión es uno que es capaz de unir a un antígeno del objetivo. La afinidad de unión a antígeno del sitio de unión a antígeno no es necesaria tan notablemente como el anticuerpo madre del cual se

deriva el sitio de unión a antígeno, solamente la capacidad de unión a antígeno debe ser mensurable usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos para evaluar el anticuerpo que une un antígeno. Por otra parte, la afinidad de unión a antígeno de cada uno de los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo multivalente en la presente no necesita ser cuantitativamente igual.

El término "citosina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular, que actúan en otra población celular como mediadores intercelulares. Los ejemplos de tales citosinas son linfocinas, monocinas, y hormonas de polipéptido tradicionales. Se incluye entre las citosinas la hormona de crecimiento, tal como la hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento humana de N-metionilo, y la hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroides; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteína, tal como la hormona de estimulación de folículo (FSH), hormona estimulante de tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblasto; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia de inhibición mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento de nervio, tal como NGF-alfa; factor de crecimiento de plaqueta; factor de

crecimiento placentario, factores de crecimiento de transformación (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a insulina 1 y 11; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tal como interferón-alfa, -beta y -gamma; factores de estimulación de colonia (CSF), tal como CFS de macrófago (M-CSF), CFS de macrófago de granulocito (GM-CSF), y CFS de granulocito (G-CSF); interleucinas, tal 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, e IL-33; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores de polipéptido que incluyen LIF y el ligando de kit (LK). Según lo utilizado en la presente, el término citosina incluye las proteínas de fuentes naturales o del cultivo celular recombinante y de equivalentes biológicamente activos de las citosinas de secuencia nativa.

El término "enlace" se utiliza para denotar los polipéptidos que comprenden dos o más residuos de aminoácido unidos por los enlaces de péptido y se utilizan para unir una o más porciones de unión a antígeno. Tales polipéptidos de enlace son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Holliger, P. y colaboradores (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, RJ. y colaboradores (1994) Structure 2:_I 121-1123). Los enlaces ejemplares incluyen, pero no se limitan a, AKTTPKLEEGEFSEAR (SEC ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEC ID NO: 3); SAKTTPKLGG

(SEC ID NO: 4); SAKTTP (SEC ID NO: 5); RADAAP (SEC ID NO: 6); RADAAPTVS (SEC ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEC ID NO: 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEC ID NO: 9), SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 10); ADAAP (SEC ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEC ID NO: 12); TVAAP (SEC ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEC ID NO: 14); QPKAAP (SEC ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEC ID NO: 16); AKTTPP (SEC ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEC ID NO: 18); AKTTAP (SEC ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEC ID NO: 20); ASTKGP (SEC ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEC ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID NO: 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEC ID NO: 26).

Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Las secuencias de aminoácido de dominio constante de cadena pesada y cadena ligera de IgG humano se conocen en la técnica.

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" según lo utilizado en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de las mutaciones naturales posibles que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, son dirigidos contra un solo antígeno. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpo policlonal que incluyen comúnmente

diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada mAb se dirige contra un solo determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" no debe ser interpretado como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular.

El término "anticuerpo humano", según lo utilizado en la presente, se piensa para incluir los anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir los residuos de aminoácido no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, las mutaciones introducidas por la mutagénesis aleatoria o de sitio específico *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDRs y particularmente la CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", según lo utilizado en la presente, no se piensa para incluir los anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie mamífera, tal como un ratón, se ha injertado en las secuencias estructurales humanas.

El término "anticuerpo humano recombinante", según lo utilizado en la presente, se piensa para incluir todos los anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados con medios recombinantes, tal como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante

transfectado en una célula hospedadora (descrita posteriormente en la sección II C), anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpo recombinante humano combinatoria (Hoogenboom, H.R. (1997) TIB Tech. 15: 62-70; Azzazy, H. and Highsmith, W.E. (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445; Gavilondo, J. V. and Larrick, J.W. (2002) BioTechniques 29: 128-145; Hoogenboom, H. and Chames, P. (2000) Immunol. Today 21:_371-378), los anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (ver, Taylor, L. D. y colaboradores (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295; Kellermann, S-A. and Green, L.L. (2002) Cur. Opin. in Biotechnol. 13: 593-597; Little, M. y colaboradores (2000) Immunol. Today 21: 364-370) o los anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados con cualquier otro medio que implique acoplar las secuencias del gen de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a la mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, la mutagénesis somática *in vivo*) y así las secuencias de aminoácido de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son las secuencias de las cuales, mientras que se deriven y relacionen con las secuencias de VH y VL de línea germinal humana, no

pueden existir naturalmente dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*.

Un anticuerpo de "afinidad madura" es un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDRs de las mismas, que da lugar a una mejora de la afinidad del anticuerpo para el antígeno comparado con un anticuerpo madre, que no posee tales alteraciones. Los anticuerpos de afinidad madura ejemplares tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos de afinidad madura son producidos por los procedimientos conocidos en la técnica. Marks y colaboradores (1992) Bio/Technology 10: 779-783 describe la maduración de la afinidad por transposición del dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los residuos de CDR y/o estructura es descrita por Barbas, y colaboradores (1994) Proc Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813 (1994); Schier y colaboradores (1995) Gene 169: 147-155; Yelton y colaboradores, (1995) J. Immunol. 155: 1994-2004; Jackson y colaboradores (1995) J. Immunol. 154(7): 3310-9; y Hawkins y colaboradores (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896; y la mutación selectiva en las posiciones de mutagénesis, posiciones de contacto o hipermutación con un residuo de aminoácido de aumento de actividad se describe en la Patente Norteamericana US 6914128B1.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a los anticuerpos, que comprenden las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie y las secuencias de

región constante de otras especies, tal como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera de murino unidas a las regiones constantes humanas.

El término "anticuerpo injertado en CDR" se refiere a los anticuerpos, que comprenden las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie pero en donde se sustituyen las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL por las secuencias de CDR de otras especies, tal como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera de murino en donde una o más de las CDRs de murino (por ejemplo, CDR3) se han sustituido por las secuencias de CDR humanas.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a los anticuerpos, que comprenden las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, un ratón) pero en donde por lo menos una porción de la secuencia de VH y/o VL se ha alterado para ser más "de tipo humana", es decir, más similar a las secuencias variables de línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado en CDR, en donde las secuencias de CDR humanas se introducen en las secuencias de VH y VL no humanas para sustituir las secuencias de CDR no humanas correspondientes. El "anticuerpo humanizado" también es un anticuerpo, o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo, que une de manera inmunoespécifica a un antigeno de

interés y que comprende una región estructural (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácido de un anticuerpo humano y una región (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácido de un anticuerpo no humano. Según lo utilizado en la presente, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácido por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácido de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de por lo menos uno, y comúnmente dos, dominios variables (Fab, Fab', $F(ab')_2$, FabC, Fv) en donde todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, el anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. En una modalidad, un anticuerpo humanizado también comprende por lo menos una porción de una región Fc de inmunoglobulina, comúnmente de una inmunoglobulina humana. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado contiene la cadena ligera así como por lo menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de cadena pesada. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado contiene solamente una cadena ligera humanizada. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado

contiene solamente una cadena pesada humanizada. En modalidades específicas, un anticuerpo humanizado contiene solamente un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

Los términos "numeración Kabat", "definiciones Kabat", y "etiquetado Kabat" se utilizan alternativamente en la presente. Estos términos, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de enumeración de residuos de aminoácido, que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácido en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo (Kabat y colaboradores (1971) Ann. NY Acad, Sci. 190: 382-391; y, Kabat, E.A. y colaboradores (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication NIH No. 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hiper-variable oscila de las posiciones de aminoácido 31 a 35 para CDR1, posiciones de aminoácido 50 a 65 para CDR2, y posiciones de aminoácido 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable oscila de las posiciones de aminoácido 24 a 34 para CDR1, posiciones de aminoácido 50 a 56 para CDR2, y posiciones de aminoácido 89 a 97 para CDR3.

Según lo utilizado en la presente, el término "CDR" se refiere a la región de determinación de complementariedad dentro de secuencias variables de anticuerpo. Existen tres CDRs en

cada una de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera, que se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDRs" según lo utilizado en la presente se refiere a un grupo de tres CDRs que se encuentran en una sola región variable capaz unir el antígeno. Los límites exactos de estas CDRs se han definido diferentemente de acuerdo con diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat y colaboradores (1987; 1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md.) no sólo proporciona un sistema de numeración de residuo inequívocamente aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino también proporciona los límites de residuo exactos que definen las tres CDRs. Estas CDRs pueden ser referidas como CDRs de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; y Chothia y colaboradores (1989) Nature 342: 877-883) encontraron que ciertas porciones secundarias dentro de las CDRs de Kabat adoptan las configuraciones estructurales de péptido casi idénticas, a pesar de tener gran diversidad en el nivel de la secuencia de aminoácido. Estas porciones secundarias fueron designadas como L1, L2 y L3 o h1, H2 y H3, donde "L" y "H" designan las regiones de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden ser referidas como CDRs de Chothia, que tienen límites que se traslapan con las CDRs de Kabat. Otros límites que definen las CDRs que se traslapaba con

las CDRs de Kabat han sido descritos por Padlan (1995) FASEB J. 9: 133-139 y MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5): 732-45. Aún otras definiciones del límite de las CDR pueden no seguir terminantemente uno de los sistemas en la presente, pero; no obstante se traslaparán con las CDRs de Kabat, aunque puedan ser acortadas o ser alargadas a la luz de la predicción o hallazgos experimentales de que los residuos o grupos de residuos particulares o incluso CDRs enteras no afectan significativamente la unión a antígeno. Los métodos usados en la presente pueden utilizar las CDRs definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque ciertas modalidades utilicen las CDRs definidas por Kabat o Chothia.

Según lo utilizado en la presente, el término "estructura" o "secuencia estructural" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDRs. Debido a que la definición exacta de una secuencia de CDR se puede determinar por diferentes sistemas, el significado de una secuencia estructural es de acuerdo con las diferentes interpretaciones correspondientemente. Las seis CDRs (CDR-L1, -L2, y -L3 de cadena ligera y CDR-H1, -H2, y -H3 de cadena pesada) también dividen las regiones estructurales en la cadena ligera y cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en donde CDR1 se ubica entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región

estructural, según lo referido por otras, representa las FRs combinadas dentro de la región variable de una cadena simple de inmunoglobulina que se encuentra en la naturaleza. Según lo utilizado en la presente, un FR representa una de las cuatro subregiones, y FRs representa dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región estructural.

Según lo utilizado en la presente, el término "gen de anticuerpo de línea germinal" o "fragmento de gen" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por las células no linfoides que no han experimentado el proceso de maduración que conduce a la reorganización y mutación genéticas para la expresión de una inmunoglobulina particular (ver, por ejemplo, Shapiro y colaboradores (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200; Marchalonis y colaboradores (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484: 13-30). Una de las ventajas proporcionadas por varias modalidades de la invención proviene del reconocimiento que es más probable que los genes de anticuerpo de línea germinal que los genes de anticuerpo maduros, conserven la característica de las estructuras de secuencia de aminoácido esenciales de los individuos en la especie, por lo tanto, se reconocerá menos probablemente como una fuente externa cuando se utiliza terapéuticamente en esa especie.

Según lo utilizado en la presente, el término "neutralización" se refiere a lo contrario de la actividad biológica de un antígeno cuando una proteína de unión une específicamente al antígeno.

En una modalidad, la proteína de unión neutralizante une a la citosina y reduce su actividad biológica por lo menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más.

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

El término "epítopo" incluye cualquier determinante de polipéptido que pueda unir específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. En ciertas modalidades, los determinantes de epítopo incluyen las agrupaciones superficiales químicamente activas de las moléculas, tal como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo, o sulfonilo, y, en ciertas modalidades, puede tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga especifica. Un epítopo es una región de un antígeno que es unido por un anticuerpo. En ciertas modalidades, un anticuerpo une específicamente un antígeno cuando reconoce su antígeno objetivo en una mezcla de complejo de proteínas y/o macromoléculas. Se dice que los anticuerpos "unen al mismo epítopo" si los anticuerpos compiten de manera cruzada (uno previene el efecto de unión o modulación del otro). Además, las definiciones estructurales de los epítopos (traslapo, similar, idéntico) son definiciones informativas, pero funcionales y son frecuentemente más relevantes ya que comprenden los parámetros estructurales (unión) y funcionales (modulación,

competencia).

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

El término "$K_{on}$", según lo utilizado en la presente, se piensa para referirse a la constante de índice para la asociación de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) al antígeno para formar el, por ejemplo del complejo de anticuerpo/antígeno como es conocido en la técnica.

El término "$K_{off}$", según lo utilizado en la presente, se piensa para referirse a la constante de índice para disociación de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo), por ejemplo, del complejo de anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

La "$K_{off}$" como es conocida en la presente, se desea para referirse a la constante disociación de una proteína de unión

particular de la interacción de (por ejemplo, un anticuerpo)-antígeno como se conoce en la técnica.

El término "proteína de unión etiquetada" como se utiliza en la presente, se refiere a una proteína con una etiqueta incorporada que se proporciona para la identificación de la proteína de unión. En una modalidad, la etiqueta es un marcador detectable, por ejemplo incorporación de un aminoácido radioetiquetado o unión a un polipétido de fracciones de biotinilo detectar por la avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o una actividad enzimática que se pueden detectar por los métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de etiquetas para los polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, $^{3}H$, $^{14}C$, $^{35}S$, $^{90}Y$, $^{99}Tc$, $^{111}In$, $^{125}I$, $^{131}I$, $^{177}Lu$, $^{166}Ho$, y $^{153}Sm$); etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, y fósforos de lantánido); etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, y fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminescentes; grupos de biotinilo; epítopos de polipéptido predeterminados reconocidos por un reportero secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de unión para los anticuerpos secundarios, dominios de unión de metal, y etiquetas de epítopo); y agentes magnéticos, tal como quelatos de gadolinio.

El término "conjugado" se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, químicamente ligado a una segunda

porción química, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se utiliza en la presente para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de los materiales biológicos. En una modalidad, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, toxina de tosferina, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracin-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y los análogos o homólogos de los mismos.

Los términos "cristal" y "cristalizado" según lo utilizado en la presente, se refieren a una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo), o porción de unión a antígeno del mismo, que existe en forma de cristal. Los cristales son una forma en estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tal como el estado sólido amorfo o estado cristalino líquido. Los cristales se componen de conjuntos regulares, repetidos, tridimensionales, de átomos, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas tal como anticuerpos), o montajes moleculares (por ejemplo, complejos de antígeno/anticuerpo). Estos conjuntos tridimensionales se organizan según las relaciones matemáticas específicas que se entienden bien en el campo. La unidad fundamental, o unidad estructural, que se repite en un cristal es llamada unidad

asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una organización que se conforma para dar, una simetría cristalográfica bien definida que proporciona la "célula de unidad" del cristal. La repetición de la célula de unidad por traslaciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Ver Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999).

El término "polinucleótido" significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye las formas mono- y bicatenarias de ADN.

El término "polinucleótido aislado" significará un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, cADN, o sintético, o una cierta combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" no se asocia a todos o una porción de un polinucleótido con el cual el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; se liga operativamente a un polinucleótido que no está ligado en la naturaleza; o no se encuentra en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "vector" se piensa para referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en donde los segmentos de

ADN adicionales puedan ser ligados. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de la réplica autónoma en una célula hospedadora en donde se introducen (por ejemplo, los vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de los vectores mamíferos de réplica y episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores mamíferos no episomal) pueden ser integrados en el genoma de una célula hospedadora durante la introducción en la célula hospedadora, y de tal modo se repliegan junto con el genoma hospedador. Por otra parte, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los cuales se ligan operativamente. Tales vectores son referidos en la presente como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). Los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante frecuentemente están generalmente en forma de plásmidos. En la presente especificación, el "plásmido" y "vector" pueden ser utilizados alternativamente como el plásmido en la forma más usada comúnmente del vector. Sin embargo, la invención se piensa para incluir tales otras formas de vectores de expresión, tal como vectores vírales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de réplica, adenovirus y virus asociados a adeno), que proporcionan funciones equivalentes.

El término "ligado operativamente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una

relación que permite que funcionen de su manera prevista. Una secuencia de control "ligada operativamente" a una secuencia de codificación se liga de una manera tal que la expresión de la secuencia de codificación se alcance bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "ligadas operativamente" incluye las secuencias de control de expresión que son contiguas con el gen de las secuencias de control de interés y expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés.

El término "secuencia de control de expresión" según lo utilizado en la presente se refiere a las secuencias de polinucleótido, que son necesarias para efectuar la expresión y el proceso de las secuencias de codificación a las cuales se ligan. Las secuencias de control de expresión incluyen las secuencias promotoras y reforzadoras de inicio, terminación apropiadas de la transcripción; las señales de procesamiento de ARN eficientes, tal como señales de división y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que mejoran la eficacia de la traducción (es decir, la secuencia de consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de proteína; y cuando se desea, las secuencias que mejoran la secreción de proteína. La naturaleza de tales secuencias de control es diferente, dependiendo del organismo anfitrión; en procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión ribosomal, y una secuencia de terminación de

transcripción; en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen un promotor y una secuencia de terminación de transcripción. El término "secuencias de control" se piensa para incluir los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y puede también incluir los componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, las secuencias líderes y secuencias de asociado de fusión.

"Transformación" se refiere a cualquier proceso por el cual el ADN exógeno incorpore una célula hospedadora. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales usando varios métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para la inserción de las secuencias de ácido nucleico externas en una célula hospedadora procariota o eucariota. Se selecciona el método basado en la célula hospedadora que es transformada y puede incluir, pero sin limitarse a, infección viral, electroporación, lipofection, y bombardeo de partícula. Tales células "transformadas" incluyen las células transformadas establemente en las cuales el ADN insertado es capaz de la réplica, como plásmido de réplica autónomo o como parte del cromosoma anfitrión. También incluyen las células, que expresan temporalmente el ADN o ARN insertado por periodos de tiempo limitados.

El término "célula hospedadora recombinante" (o

simplemente "célula hospedadora") se piensa para referirse a una célula en la cual se ha introducido el ADN exógeno. Debe ser entendido que tales términos están pensados para referirse no sólo a la célula objeto particular sino a la progenie de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en las generaciones sucesivas debido a la mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aún se incluye dentro del alcance del término "célula hospedadora" según lo utilizado en la presente. En una modalidad, las células hospedadoras incluyen las células procariotas y eucariotas seleccionadas de cualquiera de los reinos de la vida. En otra modalidad, las células eucariotas incluyen las células protistas, fúngicas, vegetales y animales. En otra modalidad, las células hospedadoras incluyen, pero no se limitan a, la línea de células procariotas *E. coli*; líneas de células mamíferas CHO, HEK 293, COS, NSO, SP2 y PER.C6; línea de células de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Las técnicas estándar se pueden utilizar para el ADN recombinante, síntesis de oligonucleótido, y cultivo y transformación de tejido (por ejemplo, electroporación, lipofection). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o según lo logrado comúnmente en la técnica o según lo descrito en la presente. Las técnicas y procedimientos

anteriores se pueden realizar generalmente de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en la técnica y según lo descrito en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a través de la presente especificación. Ver, por ejemplo, Sambrook y colaboradores (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), la cual se incorpora en la presente por referencia para cualquier propósito.

El "organismo transgénico", según lo conocido en la técnica, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgén, en donde el transgén introducido en el organismo (o un antepasado del organismo) expresa un polipéptido expresado no naturalmente en el organismo. Un "transgén" es un constructo de ADN, que se integra de manera estable y operativa en el genoma de una célula de la cual un organismo transgénico se desarrolla, que dirige la expresión de un producto de gen codificado en uno o más tipos de célula o tejidos del organismo transgénico.

El término "regula" y "modula" se utilizan alternativamente, y, según lo utilizado en la presente, se refiere a un cambio o alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de una citosina). La modulación puede ser un aumento o una disminución 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, las características de unión, actividad

enzimática, activación de receptor de célula, 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 (por ejemplo, la actividad biológica de una citosina). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o disminución de la magnitud de una cierta actividad o función de una molécula comparada a la magnitud de la actividad o función observada de la ausencia del modulador. En ciertas modalidades, un modulador es un inhibidor, que disminuye la magnitud por lo menos de una actividad o función de una molécula. Los inhibidores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, carbohidratos o pequeñas moléculas orgánicas. Los pepticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento WO 01/83525.

El término "agonista" se refiere a un modulador que, cuando entra en contacto con una molécula de interés, causa un aumento en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula comparada a la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del agonista. Los agonistas particulares de interés pueden incluir, pero sin limitarse a, los polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, y cualquier otra molécula que une al antígeno.

El término "antagonista" o "inhibidor" se refiere a un modulador que, cuando entra en contacto con una molécula de

interés, causa una disminución de la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula comparada a la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del antagonista. Los antagonistas particulares de interés incluyen los que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica del antígeno. Los antagonistas e inhibidores de antígenos pueden incluir, pero sin limitarse a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, y cualquier otra molécula, que une al antígeno.

Según lo utilizado en la presente, el término "cantidad eficaz" 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, inhibir o prevenir el avance de un trastorno, causar el retroceso de un trastorno, inhibir o prevenir la recurrencia, desarrollo, inicio o progresión de uno o más síntomas asociados a un trastorno, detectar un trastorno, o reforzar o mejorar los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico).

El término "muestra", según lo utilizado en la presente, se utiliza en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", según lo utilizado en la presente, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia de una cosa viva o cosa previamente viva. Tales cosas vivas incluyen, pero no se limitan a, humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, (por ejemplo, sangre entera), plasma, suero, orina, líquido amniótico, líquido

sinovial, células endoteliales, leucocitos, monocitos, otras células, órganos, tejidos, médula, nodos linfáticos y bazo.

***I. Generación de la proteína de unión de DVD***

La invención pertenece a las proteínas de unión de Dominio Variable Dual capaces de unir uno o más objetivos y métodos que hacen lo mismo. En una modalidad, la proteína de unión comprende una cadena de polipétido, cuando la cadena de polipétido comprende VD1-(X1)n-VD2-C(X")n, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, C es un dominio constante, X1 representa un aminoácido o polipéptido, X2 representa una región Fc y n es 0 o 1. La proteína de unión de la invención puede generarse usando varias técnicas. La invención proporciona vectores de expresión, células hospedadoras y métodos de generación de la proteína de unión.

***A. Generación de anticuerpos monoclonales madre***

Los dominios variables de la proteína de unión de DVD se pueden obtener de los anticuerpos madre, incluyendo los policlonales y mAbs que puedan unir los antígenos de interés. Estos anticuerpos pueden ser naturales o se pueden generar por tecnología recombinante.

Los mAbs se pueden preparar usando una gran variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo el uso de las tecnologías de hibridoma, recombinantes, y expresión de fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los mAbs se pueden producir usando las técnicas de hibridoma que incluyen las

conocidas en la técnica y enseñados, por ejemplo, en Harlow y colaboradores (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.); Hammerling, y colaboradores (1981) en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y.). El término "anticuerpo monoclonal" según lo utilizado en la presente no se limita a los anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota, o fagocítico, y no al método por el cual es producido. Los hibridomas se seleccionan, clonan y además analizan para determinar las características deseables, incluyendo el crecimiento de hibridoma robusto, alta producción de anticuerpo y características de anticuerpo deseables, según lo discutido en el siguiente ejemplo 1. Los hibridomas se pueden cultivar y ampliar *in vivo* en animales singénicos, en los animales que carecen de un sistema inmunológico, por ejemplo, ratones desnudos, o en cultivo celular *in vitro*. Los métodos de hibridomas de selección, clonación y expansión son bien conocidos por los expertos en la técnica. En una modalidad particular, los hibridomas son hibridomas de ratón. En otra modalidad, los hibridomas se producen en una especie no humana, no ratón tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado o caballos. En otra modalidad, los hibridomas son los hibridomas humanos, en donde un mieloma no secretor humano está fusionado con una célula humana que

expresa un anticuerpo capaz unir un antígeno específico.

Los mAbs recombinantes también se generan de los linfocitos aislados simples usando un procedimiento designado en la técnica como el método de anticuerpo de linfocito seleccionado, descrito en la Patente Norteamericana No. 5,627,052; Publicación PCT No. WO 92/02551, y Babcock, J.S. y colaboradores (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-7848. En este método, las células que secretan los anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos derivados de un animal inmunizado, se identifican, y los cADNs de región variable de cadena pesada y cadena ligera son rescatados de las células por PCR de transcriptasa inversa. Estas regiones variables se pueden entonces expresar, en el contexto de las regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas), en las células hospedadoras mamíferas, tal como células COS o CHO. Las células hospedadoras transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de los linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden entonces experimentar el análisis adicional y selección *in vitro*, por ejemplo, filtrando las células transfectadas para aislar las células que expresan los anticuerpos para el antígeno de interés. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas se pueden manipular adicionalmente *in vitro*, tal como por métodos de maduración de afinidad *in vitro*, tal como los descritos en las Publicaciones PCT Nos. WO 97/29131 y WO 00/56772.

Los anticuerpos monoclonales también son producidos inmunizando un animal no humano que comprende alguno, o todos los, locus de inmunoglobulina humana con un antígeno de interés. En una modalidad, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón diseñada que comprende los fragmentos grandes de los locus de inmunoglobulina humana y es deficiente en la producción del anticuerpo de ratón. Ver, por ejemplo, Green y colaboradores (1994) Nature Genetics. 7: 13-21 y las Patentes Norteamericanas 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 las Publicaciones PCT Nos. WO 91/10741; WO 94/02602; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 98/16654; WO 98/24893; WO 98/50433; WO 99/45031; WO 99/53049; WO 00/ 09560; y WO 00/037504. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano de tipo adulto de los anticuerpos completamente humanos, y genera los anticuerpos monoclonales humanos específicos a antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpo humano a través de la introducción de YAC de configuración de línea germinal con tamaño de megabase de los locus de cadena pesada humana y locus de cadena ligera x. Ver Mendez y colaboradores (1997) Nature Genet. 15: 146-156; Green and Jakobovits (1998) J. Exp. Med. 188: 483-495.

Los métodos *in vitro* también se pueden utilizar para hacer

los anticuerpos madre, en donde una biblioteca de anticuerpo se analiza para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para tal análisis de las bibliotecas de anticuerpo recombinante son bien conocido en la técnica e incluyen los métodos descritos en, por ejemplo, Ladner y colaboradores, Patentes Norteamericanas Nos. 5,223,409; Publicaciones PCT Nos. WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690 y WO 97/29131; Fuchs y colaboradores (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay y colaboradores (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3: 81-85; Huse y colaboradores (1989) Science 246: 1275-1281; McCafferty y colaboradores (1990) Nature 348: 552-554; Griffiths y colaboradores (1993) EMBO J. 12: 725-734; Hawkins y colaboradores (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896; Clackson y colaboradores (1991) Nature 352: 624-628; Gram y colaboradores (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3576-3580; Garrad y colaboradores (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom y colaboradores (1991) Nucl. Acid Res. 19: 4133-4137; and Barbas y colaboradores (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982, y la Publicación de Patente, Norteamericana No. 2003/018637, y Publicación de PCT No WO 97/29131, los contenidos de cada una de las cuales está incorporado por referencia en la presente.

Los anticuerpos madre de la presente invención también se pueden generar usando varios métodos de expresión en fago

conocidos en la técnica. En los métodos de expresión en fago, los dominios de anticuerpo funcionales se exhiben en la superficie de las partículas de fago que llevan las secuencias de polinucleótido que las codifican. Particularmente, tal fago se puede utilizar para exhibir los dominios de unión a antígeno expresados de un repertorio o una biblioteca de anticuerpo combinatoria (por ejemplo, humana o murino). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que une el antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con el antígeno, por ejemplo, usando el antígeno etiquetado o el antígeno unido o capturado en una superficie sólida o gránulo. El fago usado en estos métodos es un fago comúnmente filamentoso que incluye los dominios de unión fd y M13 expresados del fago con dominios de anticuerpo Fv estabilizados Fab, Fv o disulfuro fusionados de manera recombinante a la proteína del gen III o gen VIII de fago. Los ejemplos de los métodos de expresión en fago que se pueden utilizar para hacer los anticuerpos de la invención incluyen los descritos en Brinkman y colaboradores (1995) J. Immunol. Methods 182: 41-50; Ames y colaboradores (1995) J. Immunol. Methods 184: 177-186; Kettleborough y colaboradores (1994) Eur. J. Immunol. 24: 952-958; Persic y colaboradores (1997) Gene 187: 9-18; Burton y colaboradores (1994) Advances in Immunol. 57: 191-280; Solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; Publicaciones PCT Nos. WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; y WO 95/20401; y las

Patentes Norteamericanas 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 en la presente por referencia en está totalidad.

Según lo descrito en las referencias en la presente, después de la selección de fago, las regiones de codificación de anticuerpo del fago se pueden aislar y utilizarse para generar los anticuerpos enteros incluyendo los anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier anfitrión deseado, incluyendo las células mamíferas, células de insecto, células vegetales, levadura, y bacterias, por ejemplo, según lo descrito detalladamente más adelante. Por ejemplo, las técnicas para producir de manera recombinante los fragmentos Fab, Fab' y $F(ab')_2$ también se pueden utilizar usando los métodos conocidos en la técnica tal como los descritos en la Publicación PCT No. WO 92/22324; Mullinax y colaboradores (1992) BioTechniques 12(6): 864-869; Sawai y colaboradores (1995) AJRI 34: 26-34; y Better y colaboradores (1988) Science 240: 1041-1043. Los ejemplos de las técnicas, que se pueden utilizar para producir los Fvs de cadena simple y anticuerpos, incluyen los descritos en las Patentes Norteamericanas Nos. 4,946,778 y 5,258, 498; Huston y colaboradores (1991), Methods Enzymol. 203:46-88; Shu y colaboradores (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7995-7999; y

Skerra y colaboradores (1988) Science 240: 1038-1040.

La alternativa al análisis de las bibliotecas de anticuerpo recombinantes por la expresión en fago, otras metodologías conocidas en la técnica para en análisis de las bibliotecas combinatorias grandes se pueden aplicar a la identificación de los anticuerpos madre. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno en el cual la biblioteca de anticuerpo recombinante se expresa como fusiones de ARN-proteína, según lo descrito en la Publicación PCT No. WO 98/31700, y en Roberts, R. W. and Szostak, J. W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12297-12302. En este sistema, una fusión covalente se crea entre un ARNm y el péptido o la proteína que lo codifica por la traducción *in vitro* de los ARNms sintéticos que llevan la puromicina, antibiótico aceptador de peptidilo, en su extremo 3'. Así, un ARNm específico se puede enriquecer de una mezcla de complejo de ARNms (por ejemplo, una biblioteca combinatoria) basado en las características del péptido o proteína codificada, por ejemplo, anticuerpo, o porción del mismo, tal como la unión del anticuerpo, o porción del mismo, al antígeno de especificidad dual. Los anticuerpos que codifican las secuencias de ácido nucleico, o porciones de los mismos, recuperados del análisis de tales bibliotecas, se pueden expresar por medios recombinantes según lo descrito en la presente (por ejemplo, en las células hospedadoras mamíferas) y, por otra parte, se pueden someter a la maduración de afinidad adicional por cualquier ciclo adicional

de análisis de las fusiones de ARNm-péptido en donde las mutaciones se han introducido en las secuencias seleccionadas originalmente, o por otros métodos para la maduración de afinidad *in vitro* de los anticuerpos recombinantes, según lo descrito en la presente.

En otro método, los anticuerpos madre también se pueden generar usando los métodos de expresión en levadura conocidos en la técnica. En los métodos de expresión en levadura, los métodos genéticos se utilizan para unir los dominios de anticuerpo a la pared celular de levadura y para expresarlos en la superficie de levadura. Particularmente, tal levadura se puede utilizar para exhibir los dominios de unión a antígeno expresados de un repertorio o una biblioteca de anticuerpo combinatoria (por ejemplo, humana o murino). Los ejemplos de los métodos de expresión en levadura que se pueden utilizar para hacer los anticuerpos madre incluyen los descritos en la Patente Norteamericana No. 6,699,658.

Los anticuerpos descritos en la presente se pueden modificar adicionalmente para generar los anticuerpos madre injertados en CDR y humanizados. Los anticuerpos madre injertados en CDRs comprenden las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano en donde una o más de las regiones de CDR de $V_H$ y/o $V_L$ se sustituyen por las secuencias de CDR de los anticuerpos de murino capaces de unir el antígeno de interés. Una secuencia estructural de cualquier

anticuerpo humano puede servir como molde para el injerto en CDR. Sin embargo, el reemplazo de la cadena recta en tal estructura lleva frecuentemente a una cierta pérdida de afinidad de unión a antígeno. Cuanto más homólogo un anticuerpo humano sea al anticuerpo de murino original, menor es la posibilidad de que al combinar las CDRs de murino con la estructura humano se introduzcan las distorsiones en las CDRs que podrían reducir la afinidad. Por lo tanto, en una modalidad, la estructura variable humana que se elige para sustituir la estructura variable de murino además de las CDRs, tiene por lo menos una identidad de secuencia del 65% con la estructura de región variable de anticuerpo de murino. En una modalidad, las regiones variables humanas y de murino además de las CDRs, tienen por lo menos una identidad de secuencia de 70%. En una modalidad particular, las regiones variables humanas y de murino además de las CDRs, tienen por lo menos una identidad de secuencia de 75%. En otra modalidad, las regiones variables humanas y de murino además de las CDRs, tienen por lo menos una identidad de secuencia del 80%. Los métodos para producir tales anticuerpos se conocen en la técnica (ver EP 239,400; Publicación PCT No. WO 91/09967; y las Patentes Norteamericanas Nos. 5,225,539; 5,530,101; y 5,585,089), recubrimiento o revestimiento (EP 592,106; EP 519,596; Padlan (1991) Mol. Immunol. 28(4/5): 489-498; Studnicka y colaboradores (1994) Prot. Engineer. 7(6): 805-814; y Roguska y colaboradores (1994) Proc. Acad. Sci. USA 91: 969-

973), transposición de cadena (Patente Norteamericana No. 5,565,352), y anticuerpos anti-idiotípicos.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de las especies no humanas que une el antígeno deseado y tienen una o más CDRs de las especies no humanas y regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina humana. Se divulgan las secuencias de Ig humanas conocidas, por ejemplo, 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/Immunology.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/antibody; www.m.ehime-u.acjp/.about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.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; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOsem-inar/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/humanisation/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/frroducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html; y Kabat y colaboradores, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983). Tales secuencias importadas se pueden utilizar para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, índice de unión, índice de desunión, avidez, especificidad, vida media, o cualquier otra característica conveniente, según lo conocido en la técnica.

Los residuos estructurales en las regiones estructurales humanas se pueden sustituir con el residuo correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, por ejemplo, mejorar, la

unión a antígeno. Estas sustituciones estructurales son identificadas por los métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de los residuos de CDR y estructurales para identificar los residuos estructurales importantes para la unión a antígeno y comparación de la secuencia para identificar los residuos estructurales inusuales en las posiciones particulares (ver, por ejemplo, Patente Norteamericana No. 5,585,089; Riechmann y colaboradores (1988) Nature 332: 323). Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son conocidos para los expertos en la técnica. Los programas de computadora están disponibles lo cuales ilustran y exhiben las estructuras de conformación tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina candidato seleccionadas. La inspección de estas exhibiciones permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidato, es decir, el análisis de los residuos que afectan la capacidad de la inmunoglobulina candidato de unir su antígeno. De esta manera, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar de las secuencias de consenso e importación para alcanzar la característica de anticuerpo deseadas, tal como afinidad creciente para los antígenos objeto. Los residuos de CDR están por lo general directamente y muy sustancialmente implicados en la alteración de la unión a antígeno. Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de

procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, pero sin limitarse a, los descritos en Jones y colaboradores (1986) Nature 321: 522; Verhoeyen y colaboradores (1988) Science 239: 1534; Sims y colaboradores (1993) J. Immunol. 151: 2296; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901; Carter y colaboradores (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285; Presta y colaboradores (1993) J. Immunol. 151: 2623; Padlan (1991) Mol. Immunol. 28(4/5): 489-498; Studnicka y colaboradores (1994) Prot. Engineer. 7(6): 805-814; Roguska y colaboradores, (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 969-973; Publicaciones PCT Nos. WO 91/09967: US98/16280; US96/18978; US91/09630; US91/05939; US94/01234; GB89/01334; GB91/01134; GB92/01755; WO90/14443; WO90/14424; y WO90/14430; Publicaciones de Patente Europea Nos. EP 229246; EP 592,106; EP 519,596; y EP 239,400; y las Patentes Norteamericanas Nos. 5,565,332; 5,723,323; 5,976,862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192; 5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 6,204,023; 6,180,370; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089; 5,225,539; y 4,816,567, cada una de las cuales está incorporada en la presente por referencia, incluyendo las referencias citadas en la presente.

***B. Criterios para seleccionar los anticuerpos monoclonales madre***

Una modalidad de la invención pertenece a seleccionar los anticuerpos madre con por lo menos una o más características

deseadas en la molécula de DVD-Ig. En una modalidad la característica deseada se selecciona de uno o más parámetros de anticuerpo. En otra modalidad los parámetros de anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítopo, estabilidad, solubilidad, eficacia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y unión a antígeno ortólogo.

***B1. Afinidad a antígeno***

La afinidad deseada de un mAb terapéutico puede depender de la naturaleza del antígeno y del punto final terapéutico deseada. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales tienen afinidades más altas (Kd = 0.01-0.50 pM) al bloquear una interacción del receptor de citosina-citosina puesto que tales interacciones son generalmente interacciones de alta afinidad (por ejemplo, intervalos de <pM-<nM). En tales casos, la afinidad de mAb para su objetivo debe ser igual a o mejor que la afinidad de la citosina (ligando) para su receptor. Por otra parte, el mAb con menos afinidad (intervalo de >nM) podría ser terapéuticamente eficaz, por ejemplo, en la eliminación de las proteínas patógenas potencialmente circulantes, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a los cuales se une, secuestro, y eliminación de la especie circulante del amiloide Aβ. En otros casos, la reducción de la afinidad de un mAb de alta afinidad existente por mutagénesis dirigida al sitio o usando un mAb con

una afinidad más baja para su objetivo se podría utilizar para evitar los efectos secundarios potenciales, por ejemplo, un mAb de alta afinidad puede secuestrar/neutralizar todo su objetivo previsto, para de tal modo agotar/eliminar completamente las funciones de la proteína objeto. En este panorama, un mAb de afinidad baja puede secuestrar/neutralizar una fracción del objetivo capaz ser responsable de los síntomas de enfermedad (niveles patológicos o sobre-producidos), permitiendo así que una fracción del objetivo continúe realizando sus funciones fisiológicas normales. Por lo tanto, puede ser posible reducir la Kd para ajustar la dosis y/o reducir los efectos secundarios. La afinidad del mAb madre puede desempeñar una función sobre las moléculas superficiales de célula de localización apropiada para alcanzar el resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, si un objetivo se expresa en las células cancerosas con alta densidad y en las células normales con baja densidad, un mAb de afinidad más baja unirá un mayor número de objetivos en las células tumorales que las células normales, dando por resultado la eliminación de la célula tumoral vía ADCC o CDC, y por lo tanto puede tener efectos terapéuticos deseables. Así, la selección de un mAb con afinidad deseada puede ser relevante para los objetivos solubles y superficiales.

La señalización a través de un receptor durante la interacción con su ligando puede depender de la afinidad de interacción del receptor-ligando. Similarmente, es concebible que

la afinidad de un mAb para un receptor superficial podría determinar la naturaleza de la señalización intracelular y si el mAb puede suministrar un agonista o una señal antagonista. La naturaleza basada en la 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 terapéuticos necesitan ser determinadas cuidadosamente por la experimentación *in vitro* e *in vivo*.

La Kd deseada de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) se puede determinar experimentalmente dependiendo del resultado terapéutico deseado. En una modalidad, se seleccionan los anticuerpos madre con la afinidad (Kd) para un antígeno particular igual, o mejor que, la afinidad deseada de DVD-Ig para el mismo antígeno. Los anticuerpos madre para una molécula de DVD-Ig dada pueden ser el mismo anticuerpo o diferentes anticuerpos. La afinidad de unión a antígeno y la cinética son determinadas por Biacore u otra técnica similar. En una modalidad cada anticuerpo madre tiene una constante disociación (Kd) a su antígeno seleccionado del grupo que consiste de: a lo sumo aproximadamente $10^{-7}$M; a lo sumo aproximadamente $10^{-8}$M; a lo sumo aproximadamente $10^{-9}$M; a lo sumo aproximadamente $10^{-10}$M; a lo sumo aproximadamente $10^{-11}$M; a lo sumo aproximadamente $10^{-12}$M; y a lo sumo $10^{-13}$M. El primer anticuerpo madre, del cual se obtiene VD1, y el segundo anticuerpo madre, del cual se obtiene VD2, puede tener una afinidad similar o diferente ($K_D$) para el antígeno respectivo. Cada

anticuerpo madre tiene una constante de índice de unión ($K_{on}$) para el antígeno seleccionado del grupo que consiste de: por lo menos aproximadamente $10^2M^{-1}s^{-1}$; por lo menos aproximadamente $10^3M^{-1}s^{-1}$; por lo menos aproximadamente $10^4M^{-1}s^{-1}$; por lo menos aproximadamente $10^5M^{-1}s^{-1}$; y por lo menos aproximadamente $10^6M^{-1}s^{-1}$, según lo medido por la resonancia de plasmón superficial. El primer anticuerpo madre, del cual se obtiene VD1, y el segundo anticuerpo madre, del cual VD2 se obtiene, puede tener una constante de índice de unión ($K_{on}$) similar o diferente para el antígeno respectivo. En una modalidad, cada anticuerpo madre tiene una constante de índice de desunión ($K_{off}$) para el antígeno seleccionado del grupo que consiste de: a lo sumo aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; a lo sumo aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; a lo sumo aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; y a lo sumo aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, según lo medido por la resonancia de plasmón superficial. El primer anticuerpo madre, del cual se obtiene VD1, y el segundo anticuerpo madre, del cual se obtiene VD2, pueden tener una constante de índice de desunión ($K_{off}$) similar o diferente para el antígeno respectivo.

***B2. Potencia***

La afinidad/potencia deseada de los anticuerpos monoclonales madre dependerá del resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, para las interacciones del receptor-ligando (R-L) la afinidad (kd) es igual o mejor que la kd de R-L (intervalo de pM). Para la eliminación simple de una proteína circulante patológica, la kd podía estar en el intervalo baja de nM, por ejemplo, la eliminación de varias especies del péptido A-β circulante. Además, la kd también dependerá de si el objetivo expresa

múltiples copias del mismo epítopo, por ejemplo, un mAb dirigido a un epítopo de conformación en los oligómeros Aβ.

Donde VD1 y VD2 unen el mismo antígeno, pero diferentes epítopos, la DVD-Ig contendrá cuatro sitios de unión para el mismo antígeno, aumentando así la avidez y de tal modo la kd evidente de la DVD-Ig. En una modalidad, se eligen los anticuerpos madre con una kd igual o más baja que la deseada en la DVD-Ig. Las consideraciones de afinidad de un mAb madre pueden también depender sobre si la DVD-Ig contiene cuatro o más sitios de unión a antígeno idénticos (es decir, una DVD-Ig de un solo mAb). En este caso, la kd evidente sería mayor que el mAb debido a la avidez. Tales DVD-Igs se pueden utilizar para reticular el receptor superficial, aumentar la potencia de neutralización, mejorar la eliminación de las proteínas patológicas, etc.

En una modalidad, se seleccionan los anticuerpos madre con la potencia de neutralización para el antígeno específico igual o mejor que el potencial de neutralización deseado de la DVD-Ig para el mismo antígeno. La potencia de neutralización se puede determinar por un análisis biológico dependiente de objetivo donde las células del tipo apropiado producen una señal mensurable (es decir, la proliferación o producción de citosina) en respuesta al estímulo de objetivo, y la neutralización de objetivo por el mAb puede reducir la señal de una manera dependiente de dosis.

***B3. Funciones biológicas***

Los anticuerpos monoclonales pueden realizar potencialmente varias funciones. Algunas de estas funciones se enumeran en la tabla 1. Estas

funciones se pueden determinar por los análisis *in vitro* (por ejemplo, análisis basado en células y bioquímicos) y los modelos animales *in vivo*.

***Tabla 1. Algunas aplicaciones potenciales para los anticuerpos terapéuticos***

| **Objetivo (Clase)** | **Mecanismo de acción (objetivo)** |
|---|---|
| Soluble (citosinas, otros) | Neutralización de la actividad (por ejemplo, una citosina), Mejorar eliminación (por ejemplo, oligómeros Aβ), Aumentar la vida media (por ejemplo, GLP1) |
| Superficie celular (receptores, otros) | Agonista (por ejemplo, GLP1 R; EPO R, etc.), Antagonista (por ejemplo, integrinas, etc.), Citotóxico (CD 20; etc.) |
| Depósitos de proteína | Mejorar la eliminación/degradación (por ejemplo, placas Aβ, depósitos amiloides) |

Los mAbs con distintas funciones descritas en los ejemplos en la presente en la tabla 1 se pueden seleccionar para alcanzar los resultados terapéuticos deseados. Dos o más anticuerpos

madre monoclonales seleccionados se pueden entonces utilizar en el formato de DVD-Ig para alcanzar dos funciones distintas en una sola molécula de DVD-Ig. Por ejemplo, una DVD-Ig puede ser generada seleccionando un mAb madre que neutraliza la función de una citosina específica, y seleccionando un mAb madre que mejore la eliminación de una proteína patológica. Similarmente, dos anticuerpos madre monoclonales que reconocen dos diferentes receptores de superficie celular se pueden seleccionar, por ejemplo, un mAb con una función agonista en un receptor y el otro mAb con una función antagonista en un diferente receptor. Estos dos anticuerpos monoclonales seleccionados, cada uno con una función distinta, se pueden utilizar para construir una sola molécula de DVD-Ig que poseerá las dos distintas funciones (agonista y antagonista) de los anticuerpos monoclonales seleccionados en una sola molécula. Similarmente, dos anticuerpos monoclonales antagónicos a los receptores de superficie celular, cada uno que bloquea la unión de los ligandos de receptor respectivos (por ejemplo, EGF e IGF), se pueden utilizar en un formato de DVD-Ig. Inversamente, un mAb anti-receptor antagónico (por ejemplo, anti-EGFR) y un mediador anti-soluble neutralizante (por ejemplo, anti-IGFI/2)mAb se puede seleccionar para hacer una DVD-Ig.

***B4. Reconocimiento epítopo***

Diferentes regiones de las proteínas pueden realizar diferentes funciones. Por ejemplo, las regiones específicas de

una citosina interactúan con el receptor de citosina para causar la activación del receptor, mientras que otras regiones de la proteína se pueden requerir para estabilizar la citosina. En este caso se puede seleccionar un mAb que une específicamente a las regiones de interacción de receptor en la citosina y de tal modo bloquear la interacción de citosina-receptor. En algunos casos, por ejemplo, pueden ser seleccionados ciertos receptores de quimiocina que unen múltiples ligandos, un mAb que une al epítopo (región en el receptor de quimiocina) que interactúa con solamente un ligando. En otros casos, los anticuerpos monoclonales pueden unir a los epítopos en un objetivo que no son directamente responsables de las funciones fisiológicas de la proteína, pero la unión de un mAb a estas regiones podría interferir con las funciones fisiológicas (obstáculo estérico) o alterar la conformación de la proteína tal que la proteína no pueda funcionar (mAb para los receptores con múltiples ligandos que alteran la conformación del receptor tal que ningún ligando pueda unirse). Los anticuerpos monoclonales anti-citosina que no bloquean la unión de citosina a su receptor, pero bloquean la transducción de señal, también se han identificado (por ejemplo, 125-2H, un mAb anti-IL-18).

Los ejemplos de funciones epítopos y mAb incluyen, pero no se limitan a, bloquear la interacción del receptor-ligando (R-L) (mAb de neutralización que une el sitio de interacción R); por ejemplo, obstáculo estérico que da por resultado la disminuido o

ninguna unión a R. Un Ab puede unir el objetivo en un sitio distinto de un sitio de unión a receptor, pero todavía interfiere con la unión a receptor y las funciones del objetivo induciendo el cambio de conformación y función de eliminación (por ejemplo, Xolair), por ejemplo, unir a R pero bloquear de señalización (125-2H).

En una modalidad, el mAb madre necesita dirigirse al epítopo apropiado para una eficacia máxima. Tal epítopo se debe conservar en la DVD-Ig. El epítopo de unión de un mAb se puede determinar por varios métodos, incluyendo la co-cristalografía, proteólisis limitada del complejo de mAb-antígeno más el trazado de péptido espectrométrico de masa (Legros, V. y colaboradores (2000) Protein Sci. 9: 1002-10), phage displayed peptide libraries (O'Connor, K.H. y colaboradores (2005) J. Immunol. Methods 299: 21-35), as well as mutagenesis (Wu C. y colaboradores (2003) J. Immunol. 170:5571-7).

***B5. Características fisicoquímicas y farmacéuticas***

El tratamiento terapéutico con los anticuerpos requiere frecuentemente la administración de altas dosis, frecuentemente varios mg/kg (debido a una potencia baja en una base de masa como consecuencia de un peso molecular comúnmente grande). Para adaptar la conformidad del paciente y tratar adecuadamente las terapias de enfermedad crónica y el tratamiento de paciente no internado, es deseable la administración subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.) de los mAbs terapéuticos. Por ejemplo, el

volumen deseable máximo para la administración s.c. es de ~1.0 ml, y por lo tanto, las concentraciones de >100 mg/ml son deseables para limitar el número de inyecciones por dosis. En una modalidad, el anticuerpo terapéutico se administra en una dosis. El desarrollo de tales formulaciones es limitado, sin embargo, por las interacciones de proteína-proteína (por ejemplo, la agregación, que potencialmente aumenta los riesgos de inmunogenicidad) y por limitaciones durante el procesamiento y suministro (por ejemplo, viscosidad). Por lo tanto, las grandes cantidades requeridas para la eficacia clínica y las preocupaciones de desarrollo asociadas limitan la explotación completa del potencial de la formulación de anticuerpo y la administración s.c. en regímenes de dosis alta. Es evidente que las características fisicoquímicas y farmacéuticas de una molécula de proteína y la solución de proteína son de importancia extrema, por ejemplo, las características de estabilidad, solubilidad y viscosidad.

***B5.1 Estabilidad***

Una formulación de anticuerpo "estable" es una en la cual el anticuerpo en la misma conserva esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica durante el almacenamiento. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un periodo seleccionado. En una modalidad, el anticuerpo en la formulación es estable a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) o a 40°C durante

por lo menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2-8°C durante por lo menos 1 año, tal como durante por lo menos 2 años. Además, en una modalidad, la formulación es estable después de congelamiento (a, por ejemplo, -70°C) y descongelamiento de la formulación, más abajo referido como un "ciclo de congelamiento/descongelamiento". En otro ejemplo, una formulación "estable" puede ser una en donde menos de aproximadamente 10% y menos de aproximadamente 5% de la proteína está presente como agregado en la formulación.

Es deseable una DVD-Ig que es estable *in vitro* a varias temperaturas durante un periodo prolongado. Se puede alcanzar esto por el análisis rápido de los mAbs madre que son estables *in vitro* a temperatura elevada, por ejemplo, a 40°C durante 2-4 semanas, y después determinando la estabilidad. Durante almacenamiento a 2-8°C, la proteína revela la estabilidad durante por lo menos 12 meses, por ejemplo, durante por lo menos 24 meses. La estabilidad (% de molécula monomérica intacta) se puede determinar usando varias técnicas, tal como cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de exclusión de tamaño, SDS-PAGE, así como la prueba de bioactividad. Para una lista más comprensiva de las técnicas analíticas que se pueden utilizar para analizar las modificaciones covalentes y de conformación favor de ver Jones, A. J. S. (1993) Analytical methods for the assessment of protein formulations and delivery systems. En: Formulation and delivery of peptides and proteins, Cleland and

Langer, eds. 1st edition, ACS, Washington, pg. 22-45; y Pearlman, R. and Nguyen, T. H. (1990) Analysis of protein drugs. En: Peptide and protein drug delivery, Lee, ed. 1st edition, Marcel Dekker, Inc., New York, pg. 247-301.

**Heterogeneidad y formación de agregado:** La estabilidad del anticuerpo puede ser tal que la formulación pueda revelar menos que aproximadamente 10%, tal como menos de aproximadamente 5%, tal como menos de aproximadamente 2%, o dentro del intervalo de 0.5% a 1.5% o menos en el material del anticuerpo de GMP que está presente como agregado. La cromatografía de exclusión de tamaño es un método que es sensible, reproductivo, y muy robusto en la detección de agregados de proteína.

Además de niveles bajos de agregado, el anticuerpo debe, en una modalidad, ser químicamente estable. La estabilidad química se puede determinar por la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo cromatografía de intercambio catiónico o aniónico), la cromatografía de interacción hidrofóbica, u otros métodos, tal como concentración isoeléctrica o electroforesis capilar. Por ejemplo, la estabilidad química del anticuerpo puede ser tal que después de almacenamiento durante por lo menos 12 meses a 2-8°C el pico que representa el anticuerpo sin modificar en una cromatografía de intercambio catiónico puede aumentar no más de 20%, tal como no más de 10%, o no más de 5% con respecto a la solución de anticuerpo antes de la prueba de

almacenamiento.

En una modalidad, los anticuerpos madre exhiben una integridad estructural; formación correcta del enlace de disulfuro, y plegamiento correcto. La inestabilidad química debido a los cambios de la estructura secundaria o terciaria de un anticuerpo puede afectar la actividad del anticuerpo. Por ejemplo, la estabilidad, según lo indicado por la actividad del anticuerpo, puede ser tal que, después de almacenamiento durante por lo menos 12 meses a 2-8°C, la actividad del anticuerpo puede disminuir no más de 50%, tal como no más de 30%, no más de 10%, o no más de 5% o 1% con respecto a la solución de anticuerpo antes de la prueba de almacenamiento. Los análisis de unión a antígeno convenientes se pueden utilizar para determinar la actividad de anticuerpo.

***B5.2. Solubilidad***

La "solubilidad" de un mAb se correlaciona con la producción de IgG monomérico plegado correctamente. La solubilidad de IgG se puede, por lo tanto, determinar por HPLC. Por ejemplo, el IgG (monomérico) soluble dará lugar a un solo pico en el cromatógrafo de HPLC, mientras que es insoluble (por ejemplo, multimérico y agregado) dará lugar a una pluralidad de picos. Un experto en la técnica, por lo tanto, podrá detectar un aumento o disminución de la solubilidad de un IgG usando las técnicas de HPLC rutinarias. Para una lista más comprensiva de técnicas analíticas que se pueden utilizar para analizar la

solubilidad, ver Jones, A. G. Dep. Chem. Biochem. Eng., Univ. Coll. London, London, UK. Editores: Shamlou, P. Ayazi. Process. Solid-Liq. Suspensions (1993), 93-117. Casa editora: Butterworth-Heinemann, Oxford, UK; y Pearlman and Nguyen (1990) Advances in Parenteral Sciences, 4 (Pept. Protein Drug Delivery), 247-301). La solubilidad de un mAb terapéutico es crítica para formular a la alta concentración requerida frecuentemente para la dosificación adecuada. Según lo descrito en la presente, las solubilidades de >100 mg/ml se pueden requerir para adaptar la dosificación eficiente del anticuerpo. Por ejemplo, la solubilidad de anticuerpo puede ser de no menos de aproximadamente 5 mg/ml en la fase de investigación temprana, tal como no menos de aproximadamente 25 mg/ml en etapas de ciencia de proceso avanzadas, tal como no menos de aproximadamente 100 mg/ml, o no menos de aproximadamente 150 mg/ml. Es obvio para un experto en la técnica que las características intrínsecas de una molécula de proteína son importantes, las características fisicoquímicas de la solución de proteína, por ejemplo, estabilidad, solubilidad, viscosidad. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que exista una variedad amplia de excipientes que se pueden utilizar como aditivos para afectar benéficamente las características de la formulación de proteína final. Estos excipientes pueden incluir: (i) solventes líquidos, cosolventes (por ejemplo, alcoholes, tal como etanol); (ii) neutralizantes (por ejemplo, fosfato, acetato, citrato, y

amortiguadores de aminoácido); (iii) azúcares o alcoholes de azúcar (por ejemplo, sucrosa, trehalosa, fructosa, rafinosa, manitol, sorbitol, y dextranos); (iv) tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 20, 40, 60, y 80, y poloxámeros); (v) modificadores de isotonicidad (por ejemplo, sales, tal como NaCl, azúcares, y alcoholes de azúcar); y (vi) otros (por ejemplo, conservadores, agentes quelantes, antioxidantes, sustancias quelatantes (por ejemplo, EDTA), polímeros biodegradables, y moléculas portadoras (por ejemplo, HAS, y PEG).

La viscosidad es un parámetro de la alta importancia con respecto a la fabricación del anticuerpo y procesamiento de anticuerpo (por ejemplo, diafiltración/ultrafiltración), procesos de acabado de relleno (aspectos de bombeo, aspectos de filtración) y aspectos de suministro (capacidad de inyección, suministro de dispositivo sofisticado). Las viscosidades bajas permiten la solución líquida del anticuerpo que tiene una concentración más alta. Esto permite que la misma dosis se pueda administrar en volúmenes más pequeños. Los pequeños volúmenes de inyección son inherentes para la ventaja de un dolor más bajo sobre las sensaciones de inyección, y las soluciones no necesariamente tienen que ser isotónicas para reducir dolor durante la inyección en el paciente. La viscosidad de la solución de anticuerpo puede ser tal que, a las velocidades de corte de 100 (1/s), la viscosidad de la solución de anticuerpo está por debajo de 200 mPa□s, tal como por de bajo de 125 mPa□s, tal como por debajo de 70

mPa□s, tal como por debajo de 25 mPa□s, o incluso por debajo de 10 mPa□s.

***B5.3. Eficacia de producción***

La generación de una DVD-Ig que se expresa eficientemente en las células mamíferas, tal como células ováricas de hámster chino (CHO), en una modalidad requerirá dos anticuerpos madre monoclonales, que son, por sí mismos, expresados eficientemente en las células mamíferas. El rendimiento de producción de una línea mamífera estable (es decir, CHO) debe estar por encima de aproximadamente 0.5 g/l, tal como por encima de aproximadamente 1 g/l, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 2-5 g/l o más (Kipriyanov, S. M and Little M. (1999) Mol. Biotechnol. 12: 173-201; Carroll, S. and Al-Rubeai, M. (2004) Expert. Opin. Biol. Ther. 4: 1821-9).

La producción de los anticuerpos y proteínas de fusión de Ig en las células mamíferas es afectada por varios factores. El diseño del vector de expresión vía la incorporación de promotores, reforzadores y marcadores de selección potentes puede maximizar la transcripción del gen de interés de una copia de vector integrada. La identificación de los sitios de integración de vector que son permisivos para los niveles altos de transcripción de gene puede aumentar la expresión de proteína de un vector (Wurm y colaboradores (2004) Nature Biotechnol. 22(11): 1393-1398). Además, los niveles de producción son afectados por la relación de las cadenas pesadas y ligeras del

anticuerpo y varias etapas en el proceso de montaje y secreción de proteína (Jiang y colaboradores (2006) Biotechnol. Prog. 22(1): 313-8).

***B6. Inmunogenicidad***

La administración de un mAb terapéutico puede dar lugar a cierta incidencia de una inmunorespuesta (es decir, la formación de anticuerpos endógenos dirigidos contra el mAb terapéutico). Los elementos potenciales que pudieron inducir la inmunogenicidad se deben analizar durante la selección de los anticuerpos monoclonales madre, y las etapas para reducir tal riesgo se pueden realizar para optimizar los anticuerpos monoclonales madre antes de la construcción de DVD-Ig. Los anticuerpos derivados de ratón se han encontrado como muy inmunogénicos en los pacientes. La generación de anticuerpos quiméricos compuestos de las regiones variables de ratón y regiones constantes humanas, presenta una siguiente etapa lógica para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos. Alternativamente, la inmunogenicidad se puede reducir transfiriendo las secuencias de CDR de murino a una estructura de anticuerpo humana (remodelado/injerto a CDR/humanización), según lo descrito para un anticuerpo terapéutico por Riechmann y colaboradores (1988) Nature 332: 323-327. Otro método es referido como "revestimiento" o "recubrimiento", comenzando con los dominios de cadena ligera y cadena pesada, sólo los aminoácidos de estructura accesibles por

superficie se alteran para los humanos, mientras que las CDR y aminoácidos insertados permanecen en el anticuerpo madre de roedor (Roguska y colaboradores (1996) Prot. Engineer 9: 895-904). En otro tipo de humanización, en lugar de injertar las CDRs enteras, una técnica injerta solamente las "región de determinación de especificidad" (SDR, por sus siglas en inglés), definidas como el subconjunto de residuos de CDR que están implicados en la unión del anticuerpo a su objetivo (Kashmiri y colaboradores (2005) Methods 36(1): 25-34). Esto hace necesaria la identificación de las SDRs a través del análisis de las estructuras tridimensionales disponibles de los complejos de anticuerpo-objetivo o análisis de mutación de los residuos de CDR de anticuerpo para determinar cuáles interactúan con el objetivo. Alternativamente, los anticuerpos completamente humanos pudieron haber reducido la inmunogenicidad comparada a los anticuerpos de murino, quiméricos o humanizados.

Otro método para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos es la eliminación de ciertas secuencias específicas que se predicen como inmunogenéticas. En un método, después de que una primera generación biológica se haya probado en humanos y se haya encontrado como inaceptable de manera inmunogenética, los epítopos de células B se pueden trazar y después alterar para evitar la detección inmune. Otro método utiliza los métodos para predecir y eliminar los epítopos de células T potenciales. Los métodos de cómputo se han

desarrollado para explorar e identificar las secuencias de péptido de terapéuticos biológicos con el potencial de unir a las proteínas de MHC (Desmet y colaboradores (2005) Proteins 58: 53-69). Alternativamente, un método basado en células dendríticas humanas se puede utilizar para identificar los epítopos de células T de $CD4^+$ en los alérgenos de proteína potenciales (Stickler y colaboradores (2005); S.L. Morrison and J. Schlom, Important Adv. Oncol. (1990), pp. 3-18; Riechaman, L., Clark, M. Waldmann, H. and Winter, G. "Reshaping human antibodies for therapy". Nature Nature 332: 323-327; Roguska y colaboradores (1996). Una comparación de dos mAbs murinos humanizados por el injerto de CDR y recubrimiento de dominio variable. Protein Engineer. 9: 895-904; Kashmiri y colaboradores (2005) Methods 36(1): 25-34; Desmet y colaboradores (2005) Proteins 58: 53-69; y Stickler y colaboradores (2000) J. Immunotherapy 23: 654-60.)

***B7. Eficacia in vivo***

Para generar una molécula de DVD-Ig con eficacia *in vivo* deseada, es importante generar y seleccionar los mAbs con la eficacia *in vivo* similarmente deseada cuando se dan en combinación. Sin embargo, ocasionalmente la DVD-Ig puede exhibir la eficacia *in vivo* que no se puede alcanzar con la combinación de dos mAbs separados. Por ejemplo, una DVD-Ig puede llevar dos objetivos en gran proximidad lo cual conduce a una actividad que no se puede alcanzar con la combinación de dos mAbs separados. Las funciones biológicas deseables

adicionales se describen en la presente en la sección B3. Los anticuerpos madre con las características deseables en la molécula de DVD-Ig se pueden seleccionar basada en los factores tal como farmacocinética t1/2; distribución de tejido; solubilidad contra objetivos de superficie de célula; y concentración de objetivo-solubilidad/densidad-superficie.

***B8. Distribución de tejido in vivo***

Para generar una molécula de DVD-Ig con la distribución de tejido *in vivo* deseada, en una modalidad, deben ser seleccionados los mAbs madre con el perfil de distribución de tejido *in vivo* deseado similar. A este respecto, los mAbs madre pueden ser el mismo anticuerpo o diferentes anticuerpos. Alternativamente, basado en el mecanismo de estrategia de localización específica dual, en otras ocasiones no puede ser requerido para seleccionar los mAbs madre con la distribución de tejido *in vivo* similarmente deseada cuando se dan en combinación (por ejemplo, en el caso de una DVD-Ig en donde el componente de unión dirige la DVD-Ig a un sitio específico para de tal modo llevar el segundo componente de unión al mismo sitio objetivo). Por ejemplo, una especificidad de unión de una DVD-Ig podría dirigirse al páncreas (células islote) y la otra especificidad podría llevar a GLP1 al páncreas para inducir la insulina.

***B9. Isotipo***

Para generar una molécula de DVD-Ig con las características deseadas que incluyen, pero sin limitarse a,

isotipo, funciones efectoras, y la vida media de circulación, en una modalidad, se seleccionan los mAbs madre con las funciones efectoras de Fc apropiadas dependiendo de la utilidad terapéutica y el punto final terapéutico deseado. Los mAbs madre pueden ser el mismo anticuerpo o diferentes anticuerpos. Existen cinco clases o isotipos principales de cadena pesada, algunas de las cuales tienen varios subtipos, y éstos determinan las funciones efectoras de una molécula de anticuerpo. Estas funciones efectoras residen en la región bisagra, los dominios CH2 y CH3 de la molécula de anticuerpo. Sin embargo, los residuos en otras partes de una molécula de anticuerpo pueden también tener efectos sobre las funciones efectoras. Las funciones efectoras de Fc de la región bisagra incluyen: (i) la citotoxicidad celular con dependencia de los anticuerpos, (ii) unión de complemento (C1q), activación y citotoxicidad dependiente de complemento, (iii) fagocitosis/eliminación de los complejos de antígeno-anticuerpo, y (iv) liberación de citosina en algunos casos. Estas funciones efectoras de Fc de una molécula de anticuerpo se median a través de la interacción de la región Fc con un conjunto de receptores de superficie de célula específicos a la clase. Los anticuerpos del isotipo de IgG1 son los más activos, mientras que IgG2 e IgG4 tienen una función mínima o ninguna función efectora. Las funciones efectoras de los anticuerpos IgG se median a través de las interacciones con tres tipos (y subtipos) de receptor Fc celulares estructuralmente homólogos (FcgRI,

FcgRII y FcgRIII). Estas funciones efectoras de un IgG1 pueden ser eliminadas mutando los residuos de aminoácido específicos en la región bisagra más baja (por ejemplo, L234A, L235A) que se requieren para la unión de FcgR y C1q. Los residuos de aminoácido en la región Fc, particularmente los dominios CH2-CH3, también determinan la vida media en circulación de la molécula de anticuerpo. Esta función de Fc se media a través de la unión de la región Fc al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de reciclar las moléculas de anticuerpo de los lisosomas ácidos de regreso a la circulación general.

Si un mAb debe tener un isotipo activo o inactivo dependerá del punto final terapéutico deseada para un anticuerpo. Algunos ejemplos del uso de los isotipos y resultado terapéutico deseado son mencionados a continuación:

a) si el punto final deseado es la neutralización funcional de una citosina soluble, entonces un isotipo inactivo puede ser utilizado;

b) si el resultado deseado es la eliminación de una proteína patológica, un isotipo activo puede ser utilizado;

c) si el resultado deseado es la eliminación de los agregados de proteína, un isotipo activo puede ser utilizado;

d) si el resultado deseado es antagonizar un receptor superficial, se utiliza un isotipo inactivo (Tysabri, IgG4; OKT3, IgG1 mutado);

e) si el resultado deseado es eliminar las células de

objetivo, se utiliza un isotipo activo (Herceptina, IgG1 (y con las funciones efectoras mejoradas); y

f) si el resultado deseado es eliminar las proteínas de la circulación sin ingresar al CNS, un isotipo de IgM puede ser utilizado (por ejemplo, eliminando la especie de péptido Ab de la circulación).

Las funciones efectoras de Fc de un mAb madre se pueden determinar por varios métodos *in vitro* bien conocidos en la técnica.

Según lo discutido, la selección del isotipo, y de tal modo las funciones efectoras dependerán del punto final terapéutico deseado. En casos donde se desee la neutralización simple de un objetivo circulante, por ejemplo, bloqueando las interacciones de receptor-ligando, las funciones efectoras pueden no ser requeridas. En tales casos, son deseables los isotipos o mutaciones en la región Fc de un anticuerpo que eliminan las funciones efectoras. En otros casos, donde la eliminación de las células objetivo es el punto final terapéutico, por ejemplo, la eliminación de las células tumorales, son deseables los isotipos o mutaciones o desfucosilación en la región Fc que mejoran las funciones efectoras (Presta, G. L. (2006) Adv. Drug Deliv. Rev. 58:640-656 y Satoh, M. y colaboradores (2006) Expert Opin. Biol. Ther. 6: 1161-1173). Similarmente, dependiendo de la utilidad terapéutica, la vida media en circulación de una molécula de anticuerpo puede ser reducida/prolongada modulando las

interacciones del anticuerpo-FcRn introduciendo las mutaciones específicas en la región Fc (Dall' Acqua, W.F. y colaboradores (2006) J. Biol. Chem. 281: 23514-23524; Petkova, S.B. (2006) y colaboradores, Internal Immunol. 18:1759-1769; Vaccaro, C. y colaboradores (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 18709-18714).

La información publicada con respecto a varios residuos que afectan las diferentes funciones efectoras de un mAb terapéutico normal puede necesitar ser confirmada para DVD-Ig. Puede ser posible que en un formato de DVD-Ig adicional los residuos de región Fc del (diferentes), distintos de los identificados para la modulación de las funciones efectoras del anticuerpo monoclonal, puedan ser importantes.

En conclusión, la decisión en cuanto a cuales funciones efectoras de Fc (isotipo) son críticas en el formato final de DVD-Ig dependerá de la indicación de enfermedad, objetivo terapéutico, y punto final terapéutico deseado y consideraciones de seguridad. A continuación se enumeran las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera apropiadas ejemplares que incluyen, pero no se limitan a:

- IgG1 - alotipo: G1mz
- IgG1 mutante - A234, A23
- IgG2 - alotipo: G2m(n-)
- Kappa - Km3
- Lambda

**Estudios de receptor de Fc y C1q:** La posibilidad de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos indeseada (ADCC, por sus siglas en inglés) y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) por la formación de complejo del anticuerpo con cualquier objetivo sobre-expresado en las membranas celulares se puede abrogar mediante las mutaciones de región bisagra (por ejemplo, L234A, L235A). Se espera que estos aminoácidos sustituidos, presentes en la región bisagra IgG1 de mAb, den lugar a la unión disminuida del mAb a los receptores de Fc humanos (pero no a FcRn), puesto que la unión de FcgR se piensa que ocurra dentro de los sitios traslapados en la región bisagra de IgG1. Esta característica del mAb puede llevar a un perfil de seguridad mejorado con respecto a los anticuerpos que contienen un IgG de tipo natural. La unión del mAb a los receptores de Fc humanos se puede determinar por los experimentos de citometría de flujo usando las líneas de células (por ejemplo, THP-1, K562) y una línea de células CHO diseñada que exprese el FcgRIIb (u otro FcgRs). Comparado con los anticuerpos monoclonales de control de IgG1, mAb mostró reducir la unión a FcgRI y FcgRIIa, mientras que la unión a FcgRIIb está sin afectar. La unión y activación de C1q por los complejos inmunes de antígeno/IgG acciona la cascada de complemento clásica con respuestas inflamatorias e inmunoreguladoras consiguientes. El sitio de unión de C1q en IgGs se ha localizado en los residuos dentro de la región bisagra de IgG. La unión a

C1q a concentraciones cada vez mayores de mAb fue determinada por ELISA de C1q. Los resultados muestran que el mAb no puede unir a C1q, según lo esperado cuando fue comparado con la unión de un IgG1 natural. En conclusión, la mutación de región bisagra L234A, L235A suprime la unión del mAb a FcgRI, FcgRIIa y C1q pero no afecta la interacción del mAb con FcgRIIb. Estos datos sugieren que el mAb *in vivo* con Fc mutante interactúa normalmente con FcgRIIb inhibitorio pero probablemente no podrá interactuar con los receptores de activación FcgRI y FcgRIIa o C1q.

**Unión de FcRn humano:** El receptor neonatal (FcRn) es responsable del transporte de IgG a través de la placenta y del control de la vida media catabólica de las moléculas de IgG. Puede ser que sea deseable aumentar la vida media terminal de un anticuerpo para mejorar la eficacia, reducir la dosis o frecuencia de la administración, o mejorar la localización en el objetivo. Alternativamente, puede ser que sea ventajoso hacer lo contrario, que es disminuir la vida media terminal de un anticuerpo para reducir la exposición del cuerpo entero o mejorar las relaciones de unión del objetivo a no objetivo. Adapta la interacción entre IgG y su receptor de recuperación, FcRn, ofrece una manera de aumentar o disminuir la vida media terminal de IgG. Las proteínas en la circulación, que incluyen IgG, son tomadas en la fase fluida a través de la macropinocitosis por ciertas células, tal como las del endotelio vascular. IgG puede

unir FcRn en los endosomas bajo condiciones ligeramente ácidas (pH 6.0-6.5) y puede reciclar a la superficie celular, donde se libera bajo condiciones casi neutrales (pH 7.0-7.4). El trazado del sitio de unión de región Fc en FcRn80, 16, 17 mostró que dos residuos de histidina que se conservan a través de la especie, His310 e His435, son responsables de la dependencia del pH de esta interacción. Usando la tecnología de expresión en fago, fue identificada una mutación de la región Fc de ratón que aumenta la unión a FcRn y prolonga la vida media de IgG de ratón (ver Victor, G. y colaboradores (1997) Nature Biotechnol. 15(7): 637-640). Las mutaciones de la región Fc que aumentan la afinidad de unión de IgG humano para FcRn a pH 6.0, pero no a pH 7.4, también se han identificado (ver Dall' Acqua, William F., y colaboradores (2002) J. Immunol. 169(9): 5171-80). Por otra parte, en un caso, un aumento dependiente de pH similar en la unión (hasta 27 veces) también fue observado para el FcRn de mono Rhesus, y éste dio lugar a un aumento de dos veces de la vida media del suero en los monos Rhesus comparado con IgG madre (ver Hinton, Paul R. y colaboradores (2004) J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216). Estos resultados indican que es factible prolongar la vida media del plasma de los terapéuticos de anticuerpo adaptando la interacción de la región Fc con FcRn. Por el contrario, las mutaciones de la región Fc que atenúan la interacción con FcRn pueden reducir la vida media del anticuerpo.

***B10. Farmacocinética (PK):***

Para generar una molécula de DVD-Ig con el perfil farmacocinético deseado, en una modalidad, se seleccionan los mAbs madre con el perfil farmacocinético similarmente deseado. Una consideración es que la respuesta inmunogénica a los anticuerpos monoclonales (es decir, HAHA, respuesta de anticuerpo anti-humano humano; HACA, respuesta de anticuerpo anti-quimérico humano) complica adicionalmente la farmacocinética de estos agentes terapéuticos. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales con mínima o ninguna inmunogenicidad se utilizan para construir las moléculas de DVD-Ig, tal que las DVD-Igs resultantes también tengan mínima o ninguna inmunogenicidad. Algunos de los factores que determinan la PK de un mAb incluyen, pero no se limitan a, características intrínsecas del mAb (secuencia de aminoácido de VH), inmunogenicidad, unión de FcRn, y funciones de Fc.

El perfil de PK de los anticuerpos monoclonales madre seleccionados se puede determinar fácilmente en los roedores mientras que el perfil de PK en los roedores se correlaciona bien con (o predice estrechamente) el perfil de PK de los anticuerpos monoclonales en monos Cinomolgus y humanos. El perfil de PK se determina según lo descrito en la sección 1.2.2.3.A. del ejemplo.

Después de que se seleccionen los anticuerpos monoclonales madre con las características de PK deseadas (y otras características funcionales deseadas según lo discutido en

la presente), se construye la DVD-Ig. Puesto que las moléculas de DVD-Ig contienen dos dominios de unión a antígeno de dos anticuerpos monoclonales madre, las características de PK de la DVD-Ig también se determinan. Por lo tanto, mientras se determinan las características de PK de la DVD-Ig, los análisis de PK pueden ser utilizados para determinar el perfil de PK basado en la funcionalidad de ambos dominios de unión a antígeno derivados de los dos anticuerpos monoclonales madre. El perfil de PK de una DVD-Ig se puede determinar según lo descrito en el ejemplo 1.2.2.3.A. Los factores adicionales capaz de afectar el perfil de PK de DVD-Ig incluyen la orientación del dominio (CDR), tamaño de enlace, e interacciones de unión a antígeno de Fc/FcRn. Las características de PK de los anticuerpos madre pueden ser evaluadas determinando los siguientes parámetros: absorción, distribución, metabolismo, y excreción.

**Absorción:** Hasta la fecha, la administración de anticuerpos monoclonales terapéuticos es vía las rutas parenterales (por ejemplo, intravenosa (IV), subcutánea (SC), o intramuscular (IM)). La absorción de un mAb en la circulación sistémica después de la administración SC o IM del espacio intersticial es principalmente a través de la ruta linfática. La degradación saturable, presistémica, proteolítica puede dar lugar a la biodisponibilidad absoluta variable después de la administración extravascular. Generalmente, los aumentos de la biodisponibilidad absoluta con el aumento de las dosis de anticuerpos monoclonales pueden ser

observados debido a la capacidad proteolítica saturada a dosis más altas. El proceso de absorción para un mAb es por lo general absolutamente lento puesto que el fluido linfático se drena lentamente en el sistema vascular, y la vida media de la absorción puede ocurrir durante horas a varios días. La biodisponibilidad absoluta de los anticuerpos monoclonales después de la administración SC oscila generalmente de 50% a 100%.

**Distribución:** Después de la administración IV, los anticuerpos monoclonales siguen generalmente un perfil de concentración-tiempo en suero (o plasma) bifásico, comenzando con una fase de distribución rápida, seguida por una fase de eliminación lenta. Un mejor modelo farmacocinético biexponencial describe generalmente esta clase de perfil farmacocinético. El volumen de distribución en el compartimiento central (Vc) para un mAb es generalmente igual o ligeramente más grande que el volumen de plasma (2-3 litros). Un patrón bifásico distinto en el perfil de concentración en suero (plasma) contra el tiempo puede no ser evidente a través de otras rutas de administración parenterales, tal como IM o SC, debido a que la fase de distribución de la curva de concentración en suero (plasma)-tiempo es enmascarada por la porción de absorción larga. Muchos factores, incluyendo las características fisicoquímicas, absorción mediada por el receptor específico a sitio y orientado al objetivo, capacidad de unión de tejido, y la dosis de mAb puede afectar la

biodistribución de un mAb. Algunos de estos factores pueden contribuir a la ausencia de linealidad en la biodistribución para un mAb.

**Metabolismo y excreción:** Debido al tamaño molecular, los anticuerpos monoclonales intactos no se excretan en la orina vía el riñón. Son desactivados principalmente por el metabolismo (por ejemplo, catabolismo). Para los anticuerpos monoclonales terapéuticos basados en IgG, la vida media oscila comúnmente de algunas horas o 1-2 días a 20 días. La eliminación de un mAb se puede afectar por muchos factores, que incluyen, pero sin limitarse a, afinidad para el receptor FcRn, inmunogenicidad de mAb, grado de glicosilación de mAb, susceptibilidad de mAb a la proteólisis, y eliminación mediada por receptor.

***B11. Patrón de reactividad cruzada de tejido en especies humanas y tox***

El patrón de coloración idéntico sugiere que la toxicidad humana potencial se puede evaluar en especie tox. Las especies tox son aquellos animales en donde se estudia la toxicidad sin relación.

Los anticuerpos individuales se seleccionan para cumplir dos criterios: (1) coloración de tejido apropiada para la expresión conocida del objetivo de anticuerpo y (2) patrón de coloración similar entre los tejidos de las especies humanas y tox del mismo órgano.

**Criterio 1:** Las inmunizaciones y/o selecciones de

anticuerpo utilizan comúnmente los antígenos recombinantes o sintetizados (proteínas, carbohidratos u otras moléculas). La unión a la contraparte natural y el análisis contrario contra los antígenos sin relación es frecuentemente parte del enfoque de análisis de los anticuerpos terapéuticos. Sin embargo, el análisis contra una pluralidad de antígenos es frecuentemente poco práctico. Por lo tanto, los estudios de reactividad cruzada de tejido con los tejidos humanos de todos los órganos importantes sirven para eliminar la unión indeseada del anticuerpo a cualquier antígeno sin relación.

**Criterio 2:** Los estudios comparativos de la reactividad cruzada de tejido con los tejidos de la especie humana y tox (mono Cinomolgus, perro, posiblemente roedores y otros, los mismos 36 o 37 tejidos son probados como en el estudio humano) ayudan a validar la selección de una especie tox. En la reactividad cruzada de tejido común, los estudios en los anticuerpos terapéuticos de secciones de tejido congeladas pueden demostrar la unión prevista al antígeno conocido y/o una unión de menor grado a los tejidos basado en las interacciones de nivel bajo (unión no específica, unión de nivel bajo a los antígenos similares, interacciones basadas en la carga de bajo nivel, etc.). En cualquier caso, la especie animal de toxicología más relevante es aquella con el grado más alto de coincidencia de unión al tejido humano y animal.

Los estudios de reactividad cruzada de tejido siguen las

pautas reguladoras apropiadas incluyendo la EC CPMP Guideline 111/5271/94 "Production and quality control of mAbs" y la 1997 U.S. FDA/CBER "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use". Las crioseccciones (5 µm) de los tejidos humanos obtenidos en la autopsia o biopsia fueron fijadas y secadas sobre el lente de objeto. La coloración con peroxidasa de las secciones de tejido fue realizada, usando el sistema de avidina-biotina (FDA's Guidance *"Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use.*) La referencias relevantes incluyen Clarke J 2004, Boon L. 2002ª., Boon L 2002b, Ryan A. 1998

Los estudios de reactividad cruzada de tejido se hacen frecuentemente en dos etapas, en donde la primera fase incluye las criosecciones de 32 tejidos (comúnmente: glándula suprarrenal, tracto gastrointestinal, próstata, vejiga, corazón, músculo esquelético, glóbulos, riñón, piel, médula, hígado, médula espinal, mama, pulmón, bazo, cerebelo, nodo linfático, testículos, corteza cerebral, ovario, timo, colon, páncreas, tiroides, endotelio, paratiroides, uréter, ojo, pituitaria, útero, tubo de falopio y placenta) de un donante humano. En la segunda fase un estudio completo de la reactividad cruzada se realiza con hasta 38 tejidos (incluyendo suprarrenal, sangre, vaso sanguíneo, médula, cerebelo, cerebro, cerviz, esófago, ojo, corazón, riñón, intestino grande, hígado, pulmón, nodo linfático, glándula

mamaria del seno, ovario, oviducto, páncreas, paratiroides, nervio periférico, pituitaria, placenta, próstata, glándula salival, piel, intestino delgado, médula espinal, bazo, estómago, músculo estriado, testículo, timo, tiroides, amígdala, uréter, vejiga urinaria, y útero) de 3 adultos sin relación. Los estudios se hacen comúnmente a un mínimo de dos niveles de dosis.

El anticuerpo terapéutico (es decir, artículo de prueba) y el anticuerpo de control del mismo isotipo se pueden biotinilar para la detección del complejo de avidina-biotina (ABC); otros métodos de detección pueden incluir la detección del anticuerpo terciario para un artículo de prueba etiquetado con FITC (o de otra manera), o formando previamente un complejo con un IgG anti-humano etiquetado para un artículo de prueba sin etiquetar.

Brevemente, las criosecciones (aproximadamente 5 µm) de los tejidos humanos obtenidos en la autopsia o biopsia son fijados y secados sobre la lente de objeto. La coloración con peroxidasa de las secciones de tejido se realiza, usando el sistema de avidina-biotina. Primero (en el caso de un sistema de detección de formación previa de complejo), el artículo de prueba se incuba con el IgG anti-humano biotinilado secundario y se desarrolla en un complejo inmune. El complejo inmune a las concentraciones finales de 2 y 10 µg/ml del artículo de prueba se agrega sobre las secciones de tejido en la lente de objeto y entonces las secciones de tejido se hacen reaccionar durante 30 minutos con un kit de avidina-biotina-peroxidasa. Posteriormente, DAB (3,3'-

diaminobencidina), un sustrato para la reacción de peroxidasa, es aplicado durante 4 minutos para la coloración de tejido. Los gránulos de antígeno-sefarosa se utilizan como secciones de tejido de control positivas.

Cualquier coloración específica se juzga como una reactividad esperada (por ejemplo, de acuerdo con la expresión de antígeno) o inesperada basado en la expresión de antígeno de objetivo conocida en cuestión. Cualquier coloración juzgada específica se registra para determinar la intensidad y frecuencia. La competencia del antígeno o suero o los estudios de bloqueo pueden ayudar adicionalmente a determinar si la coloración observada es específica o no específica.

Si se encuentra que dos anticuerpos seleccionados cumplen los criterios de selección — la coloración de tejido y la coloración de igualación apropiadas entre el tejido animal específico humano y de toxicología — pueden ser seleccionados para la generación de DVD-Ig.

El estudio de reactividad cruzada de tejido tiene que ser repetido con el constructo final de DVD-Ig pero, mientras que estos estudios siguen el mismo protocolo según lo descrito en la presente, son más complejos de evaluar debido a que cualquier unión puede provenir de cualquiera de los dos anticuerpos madre, y cualquier unión inexplicable necesita ser confirmada con los estudios de competencia de antígeno de complejo.

Es fácilmente evidente que la labor compleja de los estudios

de reactividad cruzada de tejido con una molécula multiespecífica como una DVD-Ig, es simplificada ampliamente si los dos anticuerpos madre se seleccionan para (1) la carencia de los hallazgos inesperados de la reactividad cruzada de tejido y (2) para la semejanza apropiada de los resultados de la reactividad cruzada de tejido entre los tejidos humanos y de especie animal de toxicología correspondientes.

***B12. Especificidad y selectividad***

Para generar una molécula de DVD-Ig con especificidad y selectividad deseadas, se necesita generar y seleccionar los mAbs madre con el perfil de especificidad y selectividad similarmente deseado. A este respecto, los mAbs madre pueden ser el mismo anticuerpo o diferentes anticuerpos.

Los estudios de unión para determinar la especificidad y selectividad con una DVD-Ig pueden ser complejos debido a cuatro o más sitios de unión, dos de cada uno para cada antígeno. Brevemente, los estudios de unión usando ELISA (análisis inmunosorbente ligado a enzimas), BIAcore, CinaxA u otros estudios de interacción con una DVD-Ig, necesitan supervisar la unión de uno, dos o más antígenos a la molécula de DVD-Ig. Mientras que la tecnología de BIAcore puede resolver la unión secuencial independiente de los antígenos múltiples, métodos más tradicionales, incluyendo ELISA, o técnicas más modernas, como CinaxA, no lo pueden hacer. Por lo tanto, la caracterización cuidadosa de cada anticuerpo madre es crítica.

Después de que cada anticuerpo individual se haya caracterizado para determinar la especificidad, la confirmación de la retención de especificidad de los sitios de unión individuales en la molécula de DVD-Ig se simplifica ampliamente.

Es fácilmente evidente que la labor compleja de la determinación de la especificidad de una DVD-Ig es simplificada ampliamente si los dos anticuerpos madre se seleccionan para determinar la especificidad antes de combinarse en una DVD-Ig. Los anticuerpos madre pueden ser el mismo anticuerpo o diferentes anticuerpos.

Los estudios de interacción de antígeno-anticuerpo pueden tomar muchas formas, incluyendo muchos estudios clásicos de interacción de proteína-proteína, ELISA, espectrometría de masa, reticulación química, SEC con la dispersión de luz, diálisis de equilibrio, impregnación de gel, ultrafiltración, cromatografía en gel, SEC analítico de zona grande, ultracentrifugación micropreparativa (equilibrio de sedimentación), métodos espectroscópicos, microcalorimetría de titulación, equilibrio de sedimentación (en ultracentrifugadora analítica), velocidad de sedimentación (en centrifugadora analítica), y resonancia superficial de plasmón (incluyendo BIAcore). Las referencias relevantes incluyen "Current Protocols in Protein Science," Coligan, J.E. y colaboradores (eds.) volumen 3, capítulos 19 y 20, publicado por John Wiley & Sons Inc., y "Current Protocols in Immunology", Coligan, J.E. y colaboradores (eds.) publicado por

John Wiley & Sons Inc., y las referencias relevantes incluidas en los mismos.

**Liberación de citosina en sangre entera:** La interacción del mAb con los glóbulos humanos se puede investigar por un análisis de liberación de citosina (Wing, M. G. (1995) Therapeut. Immunol. 2(4): 183-190; "Current Protocols in Pharmacology", Enna, SJ. y colaboradores (eds.) publicado por John Wiley & Sons Inc; Madhusudan, S. (2004) Clin. Cancer Res. 10(19): 6528-6534; Cox, J. (2006) Methods 38(4): 274-282; Choi, I. (2001) Eur. J. Immunol. 31(1): 94-106). Brevemente, varias concentraciones de mAb se incuban con la sangre entera humana durante 24 horas. La concentración probada debe cubrir un intervalo amplio que incluye las concentraciones finales que imitan los niveles de sangre comunes en los pacientes (incluyendo, pero sin limitarse a, 100 ng/ml-100 µg/ml). Después de la incubación, los sobrenadantes y lisados celulares fueron analizados para determinar la presencia de IL-1Rα, TNF-α, IL-1b, IL-6 y IL-8. Los perfiles de concentración de citosina generados para el mAb fueron comparados con los perfiles producidos por un control de IgG humano negativo y un control positivo de LPS o PHA. El perfil de citosina exhibido por el mAb de sobrenadantes celulares y lisados celulares fue comparable al control de IgG humano. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal no interactúa con los glóbulos humanos para liberar espontáneamente las citosinas inflamatorias.

Los estudios de liberación de Citosina para una DVD-Ig son complejos debido a cuatro o más sitios de unión, dos de cada uno para cada antígeno. Brevemente, la liberación de citosina estudia según lo descrito en la presente la medición del efecto de la molécula entera de DVD-Ig en sangre entera u otros sistemas de células, pero puede resolver qué porción de la molécula causa la liberación de citosina. Una vez que se ha detectado la liberación de citosina, la pureza de la preparación de DVD-Ig tiene que ser comprobada, debido a que algunos componentes celulares de co-purificación pueden causar la liberación de citosina por sí mismos. Si la pureza no es el problema, la fragmentación de DVD-Ig (incluyendo, pero sin limitarse a, eliminación de la porción de Fc, separación de los sitios de unión, etc.), la mutagénesis de sitio de unión u otros métodos pueden necesitar ser utilizados para deconvolucionar cualquier observación. Es fácilmente evidente que esta labor compleja es simplificada ampliamente si los dos anticuerpos madre se seleccionan para la carencia de liberación de citosina antes de combinarse en una DVD-Ig.

***B13. Reactividad cruzada con otra especie para los estudios toxicológicos***

En una modalidad, los anticuerpos individuales se seleccionan con suficiente reactividad cruzada para apropiarse de la especie tox, por ejemplo, mono Cinomolgus. Los anticuerpos madre necesitan unir al objetivo de especie ortólogo (es decir, mono Cinomolgus) y producir la respuesta apropiada (modulación,

neutralización, activación). En una modalidad, la reactividad cruzada (afinidad/potencia) con el objetivo de especie ortólogo debe estar dentro de diez veces del objetivo humano. En la práctica, los anticuerpos madre se evalúan para múltiples especies, incluyendo ratón, rata, perro, mono (y otros primates no humanos), así como la especie modelo de la enfermedad (es decir, ovejas para el modelo de asma). La reactividad cruzada aceptable con la especie tox de los anticuerpos monoclonales madre permite los estudios futuros de la toxicología de DVD-Ig en la misma especie. Por esa razón, los dos anticuerpos monoclonales madre deben tener una reactividad cruzada aceptable para una especie tox común, para de tal modo permitir los estudios de toxicología de DVD-Ig en la misma especie.

Los mAbs madre se pueden seleccionar de varios mAbs capaz de unir objetivos específicos y son bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos madre pueden ser el mismo anticuerpo o diferentes anticuerpos. Éstos incluyen, pero no se limitan al anticuerpo anti-TNF (Patente Norteamericana No. 6,258,562), anticuerpo anti-IL-12 y/o anti-IL-12p40 (Patente Norteamericana No. 6,914,128); anticuerpo anti-IL-18 (Publicación de Patente Norteamericana No. 2005/0147610), anti-C5, anti-CBL, anti-CD147, anti-gp120, anti-VLA-4, anti-CD11a, anti-CD18, anti-VEGF, anti-CD40L, anti-CD-40 (por ejemplo, ver la Publicación PCT No. WO 2007/124299) 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-SOST, anti-CD-19, anti-CD80 (por ejemplo, ver la Publicación PCT No. WO 2003/039486, anti-CD4, anti-CD3, anti-CD23, anti-beta2-integrina, anti-alfa4beta7, anti-CD52, anti-HLA DR, anti-CD22 (por ejemplo, ver la Patente Norteamericana 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-1 alfa, anti-IL-Ibeta, receptor anti-IL-1, receptor anti-IL-2, anti-IL-4, receptor anti-IL-4, anti-IL5, receptor anti-IL-5, anti-IL-6, anti-IL-8, anti-IL-9, anti-IL-13, receptor anti-IL-13, anti-IL-17, y anti-IL-23 (ver Presta, L.G. (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116: 731-6 y www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/antibodies.html).

Los mAbs madre también se pueden seleccionar de varios anticuerpos terapéuticos aprobados para el uso, en ensayos clínicos, o en el desarrollo para uso clínico. Tales anticuerpos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, rituximab (Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche) (ver, por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 5,736,137), un anticuerpo anti-CD20 quimérico aprobado para tratar el linfoma No Hodgkin; HuMax-CD20, anti-CD20 que es desarrollado actualmente por Genmab, un anticuerpo anti-CD20 descrito en la Patente Norteamericana

No. 5,500,362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLiM (Intracel), y PRO70769 (Solicitud PCT No. PCT/US2003/040426), trastuzumab (Herceptin®, Genentech) (ver, por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 5,677,171), un anticuerpo anti-Her2/neu humanizado aprobado para tratar el cáncer de mama; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg®), actualmente es desarrollado por Genentech; un anticuerpo anti-Her2 (Patente Norteamericana No. 4,753,894; cetuximab (Erbitux®, Imclone) (Patente Norteamericana No. 4,943,533; Publicación PCT No. WO 96/40210), un anticuerpo anti-EGFR quimérico en los ensayos clínicos para una variedad de cánceres; ABX-EGF (Patente Norteamericana No. 6,235,883), actualmente es desarrollado por Abgenix-Immunex-Amgen; HuMax- EGFr (Patente Norteamericana No. 7,247,301), actualmente es desarrollado por Genmab; 425, EMD55900, EMD62000, y EMD72000 (Merck KGaA) (Patente Norteamericana No. 5,558,864; Murthy, y colaboradores (1987) Arch. Biochem. Biophys. 252(2): 549-60; Rodeck, y colaboradores (1987) J. Cell. Biochem. 35(4): 315-20; Kettleborough, y colaboradores (1991) Protein Eng. 4(7): 773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (Publicación PCT No. WO 95/20045; Modjtahedi, y colaboradores (1993) J. Cell. Biophys. 22(1-3): 129-46; Modjtahedi, y colaboradores (1993) Br. J. Cancer 67(2): 247-53; Modjtahedi, y colaboradores (1996) Br. J. Cancer 73(2): 228-35; Modjtahedi, y colaboradores (2003) Int. J. Cancer 105(2): 273-80); TheraCIM

hR3 (YM Biosciences, Canada and Centra de Immunologia Molecular, Cuba (Patente Norteamericana No. 5,891,996; Patente Norteamericana No. 6,506,883; Mateo, y colaboradores (1997) Immunotechnol. 3(1): 71-81); mAb-806 (Ludwig Institue for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth, y colaboradores (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100(2): 639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MRI-1 (IVAX, National Cancer Institute) (Publicación PCT No. WO 01/62931A2); y SC100 (Scancell) (Publicación PCT No. WO 01/88138); alemtuzumab (Campath®, Millenium), un mAb humanizado actualmente aprovado para el tratamiento de leucemia linfática crónica de células 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 de Fc anti-LFA-3 desarrollada por Biogen), abciximab (ReoPro®), desarrollado 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 désarrollado por Abbott, Humicade®, un anticuerpo anti-TNFalpha desarrollado por Celltech, golimumab (CNTO- 148), un anticuerpo de TNF completamente humano desarrollado por Centocor,

etanercept (Enbrel®), una fusión de Fc del receptor p75TNF desarrollada por Immunex/Amgen, lenercept, una fusión de Fc del receptor p55TNF previamente desarrollado por Roche, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD147 que es desarrollado por Abgenix, ABX-IL8, un anticuerpo anti-IL8 que es desarrollado por Abgenix, ABX-MAI, un anticuerpo anti-MUC 18 que es desarrollado por Abgenix, Pemtumomab (R1549, 90Y-muHMFGI), un anticuerpo anti-MUCI en desarrollo por Antisoma, Therex (R1550), un anticuerpo anti-MUCI que es desarrollado por Antisoma, AngioMab (AS1405), que es desarrollado por Antisoma, HuBC-I que es desarrollado por Antisoma, Thioplatin (AS 1407) que es desarrollado por Antisoma, Antegren® (natalizumab), un anticuerpo anti-alfa-4-beta-1 (VLA-4) y alfa-4-beta-7 que es desarrollado por Biogen, mAb VLA-1, un anticuerpo de integrina anti-VLA-1 que es desarrollado por Biogen, LTBR mAb, un anticuerpo del receptor anti-linfotoxina beta (LTBR) que es desarrollado por Biogen, CAT-152, un anticuerpo anti-TGF-β2 que es desarrollado por Cambridge Antibody Technology, ABT 874 (J695), un anticuerpo anti- IL-12 p40 que es desarrollado por Abbott, CAT-192, un anticuerpo anti-TGFβ1 que es desarrollado por Cambridge Antibody Technology and Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxin1 que es desarrollado por Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B® un anticuerpo anti-Blys que es desarrollado por Cambridge Antibody Technology and Human Genome Sciences Inc., TRAIL-RImAb, un anticuerpo anti-TRAIL-R1 que es desarrollado por

Cambridge Antibody Technology and Human Genome Sciences, Inc., Avastin® bevacizumab, rhuMAb-VEGF), un anticuerpo anti-VEGF que es desarrollado por Genentech, un anticuerpo de la familia de receptor anti-HER que es desarrollado por Genentech, factor anti-tejido (ATF), un anticuerpo de factor anti-tejido que es desarrollado por Genentech, Xolair® (Omalizumab), factor anti-tejido un anticuerpo anti-IgE que es desarrollado por Genentech, Raptiva® (Efalizumab), un anticuerpo anti- CD1 que es desarrollado por Genentech and Xoma, anticuerpo MLN-02 (anteriormente LDP-02), que es desarrollado por Genentech and Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, un anticuerpo anti-CD4 que es desarrollado por Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 que es desarrollado por Genmab and Amgen, HuMax-Inflam, que es desarrollado por Genmab and Medarex, HuMax-Cancer, un anticuerpo anti-Heparanasa 1 que es desarrollado por Genmab and Medarex and Oxford GcoSciences, HuMax-Linfoma, que es desarrollado por Genmab and Amgen, HuMax-TAC, que es desarrollado por Genmab, IDEC-131, y un anticuerpoanti-CD40L que es desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (Clenoliximab), un anticuerpo anti-CD4 que es desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, un anticuerpo anti-CD80 antibody que es desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, un anticuerpo anti-CD23 que es desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos de factor de migración anti-macrófago (MIF) que son desarrollados por IDEC

Pharmaceuticals, BEC2, un anticuerpo anti-idiotípico que es desarrollado por Imclone, IMC-ICI 1, un anticuerpo anti-KDR que es desarrollado por Imclone, DCIOI, un anticuerpo anti-flk-1 que es desarrollado por Imclone, anticuerpos de cadherina anti-VE que son desarrollados por Imclone, CEA-Cide® (labetuzumab), un anticuerpo de antígeno anti-carcinoembriónico (CEA) que es desarrollado por Immunomedics, LymphoCide® (Epratuzumab), un anticuerpo anti-CD22 que es desarrollado por Immunomedics, AFP-Cide, que es desarrollado por Immunomedics, MyelomaCide, que es desarrollado por Immunomedics, LkoCide, que es desarrollado por Immunomedics, ProstaCide, que es desarrollado por Immunomedics, MDX-010, un anticuerpo anti-CTLA4 que es desarrollado por Medarex, MDX-060, un anticuerpo anti-CD30 que es desarrollado por Medarex, MDX-070 que es desarrollado por Medarex, MDX-018 que es desarrollado por Medarex, Osidem® (IDM-I), y un anticuerpo anti-Her2 que es desarrollado por Medarex and Immuno-Designed Molecules, HuMax®-CD4, un anticuerpo anti-CD4 antibody que es desarrollado por Medarex and Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 que es desarrollado por Medarex and Genmab, CNTO 148, un anticuerpo anti-TNFα que es desarrollado por Medarex and Centocor/J&J, CNTO 1275, un anticuerpo anti-citosina que es desarrollado por Centocor/J&J, MOR101 y MOR102, anticuerpos anti-molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (CD54) que son desarrollados por MorphoSys, MOR201, an anticuerpo anti-receptor del factor

211

de crecimiento de fibroblasto 3 (FGFR-3) que es desarrollado por MorphoSys, Nuvion® (visilizumab), un anticuerpo anti-CD3 que es desarrollado por Protein Design Labs, HuZAF®, un anticuerpo anti-interferón gamma que es desarrollado por Protein Design Labs, anti-integrina α5β1, que es desarrollado por Protein Design Labs, anti-IL-12, que es desarrollado por Protein Design Labs, ING-I, un anticuerpo anti-Ep-CAM que es desarrollado por Xoma, Xolair® (Omalizumab) un anticuerpo anti-IgE humanizado desarrollado por Genentech and Novartis, y MLN01, un anticuerpo anti-integrina Beta2 que es desarrollado por Xoma. En otra modalidad, los terapéuticos incluyen KRN330 (Kirin); anticuerpo huA33 (A33, Ludwig Institute for Cancer Research); CNTO 95 (integrinas alfa V, Centocor); MEDI-522 (integrina alfa Vβ3, Medimmune); volociximab (integrina alfa Vβ1, Biogen/PDL); mAb 216 humano (epítope glicosilado de células B, NCI); BiTE MT103 (CD19 x CD3 biespecíficos, Medimmune); 4G7xH22 (Bispecific BcellxFcgammaRI, Medarex/Merck KGa); rM28 (CD28 x MAPG biespecíficos, Patente EP No. EP1444268); MDX447 (EMD 82633) (CD64 x EGFR biespecíficos, Medarex); Catumaxomab (removab) (EpCAM x anti-CD3 biespecíficos, Trion/Fres); Ertumaxomab (HER2/CD3 biespecíficos, Fresenius Biotech); oregovomab (OvaRex) (CA-125, ViRexx); Rencarex® (WX G250) (anhidrasa carbónica 1X, Wilex); CNTO 888 (CCL2, Centocor); TRC105 (CD105 (endoglina), Tracon); BMS-663513 (agonista de 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 (receptor de Fc CD3, 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); Campathlh (Alemtuzumab) (CD52, Genzyme); MDX-1411 (CD70, Medarex); hLLI (EPB-1) (CD74.38, Immunomedics); Galiximab (IDEC-144) (CD80, Biogen); MT293 (TRC093/D93) (colágeno dividido, Tracon); HuLuc63 (CSI, 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-11 F8, (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 (receptor de folato α, Morphotech);

KW-2871 (ganglioside GD3, Kyowa); MORAb-009 (GP-9, Morphotech); CDX-1307 (MDX-1307) (hCGb, Celldex); Trastuzumab (Herceptin) (HER2, Celldex); Pertuzumab (rhuMAb 2C4) (HER2 (D1), Genentech); apolizumab (cadena de HLA-DR beta, PDL Pharma); AMG-479 (IGF-IR, Amgen); anti-IGF-IR R1507 (IGFI-R, Roche); CP 751871 (KTFI-R, Pfizer); IMC-A12 (IGFI-R, Imclone); BIIB022 (IGF-IR, Biogen); Mik-beta-1 (IL-2Rb (CD122), Hoffman LaRoche); CNTO 328 (IL6, Centocor); Anti-KIR (1-7F9) (receptor similar a Ig de eliminación celular (KIR), Novo); Hu3S193 (Lewis (y), Wyeth, Ludwig Institute of Cancer Research); hCBE-11 (LTBR, Biogen); HuHMFGI (MUCI, Antisoma/NCI); RAV12 (epítopo de carbohidrato ligado a N, Raven); CAL (proteína relacionda con la hormona paratiroides (PTH-rP), University of California); CT-011 (PDI, CureTech); MDX-1106 (ono-4538) (PDI, Medarex/Ono); MAb CT-011 (PDI, Curetech); IMC-3G3 (PDGFRa, Imclone); bavituximab (fosfatidilserina, Peregrine); huJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); muJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); GC 1008 (inhibidor (IgG4) de TGFb (pan), Genzyme); Infliximab (Remicade) (TNFα, 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, Publicación PCT No. WO/2000/034337, University of Texas); IMC- 18F1 (VEGFR1, Imclone); IMC-1121 (VEGFR2, Imclone).

*C. Construcción de las moléculas de DVD*

La molécula de inmunoglobulina de dominio variable dual (DVD-Ig) se diseña tal que dos diferentes dominios variables de cadena ligera (VL) de los dos anticuerpos monoclonales madre, capaz de ser iguales o diferentes, sean ligadas en tándem directamente o vía un enlace corto por las técnicas de ADN recombinante, seguido por el dominio constante de cadena ligera, y opcionalmente, una región Fc. Similarmente, la cadena pesada comprende dos diferentes dominios variables de cadena pesada (VH) ligados en tándem, seguido por el dominio constante CH1 y la región Fc (figura 1A).

Los dominios variables se pueden obtener usando las técnicas de ADN recombinante de un anticuerpo madre generado por cualquiera de los métodos descritos en la presente. En una modalidad, el dominio variable es un dominio variable de cadena pesada o ligera de murino. En otra modalidad, el dominio variable es una CDR injertada o un dominio variable de cadena pesada o ligera humanizado. En una modalidad, el dominio variable es un dominio variable de cadena pesada o ligera humano.

En una modalidad, los primeros y segundos dominios variables se ligan directamente entre sí usando las técnicas de ADN recombinante. En otra modalidad, los dominios variables se ligan vía una secuencia de enlace. En una modalidad, los dos dominios variables se ligan. Tres o más dominios variables también se pueden ligar directamente o vía una secuencia de

enlace. Los dominios variables pueden unir el mismo antígeno o pueden unir diferentes antígenos. Las moléculas de DVD de la invención pueden incluir un dominio variable de inmunoglobulina y un dominio variable distinto de inmunoglobulina, tal como un dominio de unión de ligando de un receptor o un dominio activo de una enzima. Las moléculas de DVD pueden también comprender dos o más dominios distintos de Ig.

La secuencia de enlace puede ser una cadena simple de aminoácido o polipéptido. En una modalidad, las secuencias de enlace se seleccionan del grupo que consiste de AKTTPKLEEGEFSEAR (SEC ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEC ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEC ID NO: 4); SAKTTP (SEC ID NO: 5); RADAAP (SEC ID NO: 6); RADAAPTVS (SEC ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEC ID NO: 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEC ID NO: 9), S AKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 10); ADAAP (SEC ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEC ID NO: 12); TVAAP (SEC ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEC ID NO: 14); QPKAAP (SEC ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEC ID NO: 16); AKTTPP (SEC ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEC ID NO: 18); AKTTAP (SEC ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEC ID NO: 20); ASTKGP (SEC ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEC ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID NO: 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEC ID NO: 26);. La elección de las secuencias de enlace se basa en el análisis de la

estructura cristalina de varias moléculas Fab. Existe un enlace flexible natural entre el dominio variable y el dominio constante de CH1/CL en Fab o en la estructura de anticuerpo molecular. Este enlace natural comprende aproximadamente 10-12 residuos de aminoácido, compuestos por 4-6 residuos de la terminal C del dominio V y 4-6 residuos de la terminal N del dominio CL/CH1. Las DVD-Igs de la invención fueron generadas usando 5-6 residuos de aminoácido de la terminal N, o 11-12 residuos de aminoácido de CL o CH1 como enlace en la cadena ligera y cadena pesada de DVD-Ig, respectivamente. Los residuos de terminal N del dominio CL o CH1, particularmente los primeros 5-6 residuos de aminoácido, adoptan una configuración de bucle sin estructura secundaria fuerte, y por lo tanto, pueden actuar como enlace flexible entre los dos dominios variables. Los residuos de terminal N del dominio CL o CH1 son una extensión natural de los dominios variables, puesto que son parte de las secuencias de Ig, y, por lo tanto, minimizan en gran parte cualquier inmunogenicidad potencial que se presenta de los enlaces y empalmes.

Otras secuencias de enlace 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 aminoácido de los dominios CL/CH1); los enlaces de cadena ligera pueden ser de Cκ o Cλ; y los enlaces de cadena pesada se pueden derivar de CH1 de cualquier isotipo, incluyendo Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cαl, Cα2, Cδ, Cε, y

Cμ. Las secuencias de enlace también se pueden derivar de otras proteínas, por ejemplo, proteínas similares a Ig (por ejemplo, TCR, FcR, KIR); secuencias basadas en G/S (por ejemplo, repeticiones de G4S); secuencias derivadas de la región bisagra; y otras secuencias naturales de otras proteínas.

En una modalidad, un dominio constante se liga a los dos dominios variables ligados usando las técnicas de ADN recombinante. En una modalidad, la secuencia que comprende los dominios variables de cadena pesada ligados se liga a un dominio constante de cadena pesada y la secuencia que comprende los dominios variables ligados se liga a un dominio constante de cadena ligera. En una modalidad, los dominios constantes son el dominio constante de cadena pesada humano y el dominio constante de cadena ligera humano, respectivamente. En una modalidad, la cadena pesada de DVD se liga adicionalmente a una región Fc. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa, o una región Fc variable. En otra modalidad, la región Fc es una región Fc humana. En otra modalidad, la región Fc incluye la región Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, o IgD.

En otra modalidad, dos polipéptidos de DVD de cadena pesada y dos polipéptidos de DVD de cadena ligera se combinan para formar una molécula de DVD-Ig. La tabla 2 enumera las secuencias de aminoácido de las regiones de VH y VL de los anticuerpos ejemplares para los objetivos útiles para tratar la enfermedad, por ejemplo, para tratar el cáncer. En una modalidad, la invención proporciona un DVD que comprende por lo menos dos de las regiones de VH y/o VL enumeradas

en la tabla 2, en cualquier orientación.

***Tabla 2: Lista de secuencias de aminoácido de las regiones de VH y VL de los anticuerpos para generar las DVD-Igs***

| SEC ID NO. | ID. UNICA ABT | Región de Proteína | Secuencia<br>12345678901234567890123456789012345678901234567890 |
|---|---|---|---|
| 27 | AB002VH | VH CD3 | QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQR<br>PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAY<br>MQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS |

| SEC ID NO. | ID. UNICA ABT | Región de Proteína | Secuencia<br>12345678901234567890123456789012345678901234567890 |
|---|---|---|---|
| 28 | AB002VL | VL CD3 | QIVLTQSPAIMSASPGEKVIMTCRASSSVSYMNWYQQKSG<br>TSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAE<br>DAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEINR |
| 29 | AB005VH | VH RON | EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQA<br>PGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY<br>LQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGMDVWGQGTTV<br>TVSS |
| 30 | AB005VL | VL RON | DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGFNYVDW<br>YLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI<br>SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFGQGTKVEIRR |
| 31 | AB011VH | VH IGF1R | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQA<br>PGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDNSRTTLY<br>LQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMDVWGQGTT<br>VTVSS |
| 32 | AB011VL | VL IGF1R | DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKP<br>GKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP<br>EDFATYYCLQHNSYPCSFGQGTKLEIKR |
| 33 | AB012VH | VH HGF | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQA<br>PGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY<br>LQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGILVTV<br>SS |
| 34 | AB012VL | VL HGF | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKP<br>GKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVEIKR |
| 35 | AB014VH | VH VEGF<br>(sec. 1) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQA<br>PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAY<br>LQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVT<br>VSS |
| 36 | AB014VL | VL VEGF<br>(sec. 1) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKP<br>GKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR |

| SEC ID NO. | ID. UNICA ABT | Región de Proteína | Secuencia<br>12345678901234567890123456789012345678901234567890 |
|---|---|---|---|
| 37 | AB015VH | VH DLL-4 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQA<br>PGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY<br>LQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLVTVSS |
| 38 | AB015VL | VL DLL-4 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP<br>GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKVEIKR |
| 39 | AB033VH | VH EGFR<br>(sec. 1) | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQS<br>PGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFF<br>KMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA |
| 40 | AB033VL | (sec. 1)<br>VL EGFR<br>(seq. 1) | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRT<br>NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVES<br>EDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR |
| 41 | AB047VL | VH PLGF | QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLA<br>PGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAY<br>MQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS |
| 42 | AB047VH | VL PLGF | DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMRKSFLA<br>WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLT<br>ISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR |
| 43 | AB059VH | VH-RGMa | EVQLVESGGGLVQPGSSLKLSCVASGFTFSNYGMNWIRQA<br>PKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLY<br>LEMNSLRSEDTAIYYCAKGTTPDYWGQGVMVTVSS |
| 44 | AB059VL | VL-RGMa | DVVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQSLEYSDGYTFLEW<br>FLQKPGQSPQLLIYEVSNRFSGVPDRFIGSGSGTDFTLKI<br>SRVEPEDLGVYYCFQATHDPLTFGSGTKLEIKR |
| 45 | AB062VH | (sec. 1)<br>VH ErbB3<br>(sec. 1) | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQP<br>PGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSL<br>KLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS |
| 46 | AB062VL | VL ErbB3<br>(seq. 1) | DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLA<br>WYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT<br>ISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR |

| SEC ID NO. | ID. UNICA ABT | Región de Proteína | Secuencia<br>12345678901234567890123456789012345678901234567890 |
|---|---|---|---|
| 47 | AB063VH | VH ErbB3 (sec. 2) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQA<br>PGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY<br>LQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMVTVSS |
| 48 | AB063VL | VL ErbB3 (sec. 2) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKP<br>GKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQP<br>EDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLEIKR |
| 49 | AB064VH | VH EGFR (sec. 2) | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQ<br>PPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFF<br>LKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 50 | AB064VL | VL EGFR (sec. 2) | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKP<br>GKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQP<br>EDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR |
| 51 | AB067VH | VH ErbB3 (sec. 3) | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQA<br>PGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLY<br>LQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTLVTVSS |
| 52 | AB067VL | VL ErbB3 (sec. 3) | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVVSWYQQ<br>HPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGL<br>QTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGGTKVTVLG |
| 53 | AB070VH | VH VEGF (sec. 2) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQA<br>PGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY<br>LQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSS |
| 54 | AB070VL | VL VEGF (sec. 2) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP<br>GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR |
| 55 | AB071VH | VH VEGF (sec. 3) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQA<br>PGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAY<br>LQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVS<br>S |
| 56 | AB071VL | VL VEGF (sec. 3) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAWYQQKP<br>GKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVEIKR |

| SEC ID NO. | ID. UNICA ABT | Región de Proteína | Secuencia<br>12345678901234567890123456789012345678900 |
|---|---|---|---|
| 57 | AB059VH | VH-RGMa | EVQLVESGGGLVQPGSSLKLSCVASGFTFSNYGMNWIRQA<br>PKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLY<br>LEMNSLRSEDTAIYYCAKGTTPDYWGQGVMVTVSS |
| 58 | AB059VL | VL-RGMa | DVVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQSLEYSDGYTFLEW<br>FLQKPGQSPQLLIYEVSNRFSGVPDRFIGSGSGTDFTLKI<br>SRVEPEDLGVYYCFQATHDPLTFGSGTKLEIKR |
| 323 | AB122VH | VH EGFR (sec. 3) | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIRQ<br>PPGKGLEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRITISRDTSKNQFF<br>LKLNSVTAADTATYYCATAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 324 | AB122VL | VL EGFR (sec. 3) | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKP<br>GKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQP<br>EDFATYYCVQYGQFPWTFGGGTKLEIKR |
| 325 | AB123VH | VH EGFR (sec. 4) | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIRQ<br>PPGKGLEWMGYISYSANTRYNPSLKSRITISRDTSKNQFF<br>LKLNSVTAADTATYYCATAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 326 | AB123VL | VL EGFR (sec. 4) | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDISSNIGWLQQKP<br>GKSFKGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQP<br>EDFATYYCVQYGQFPWTFGGGTKLEIKR |
| 327 | AB124VH | VH EGFR (sec. 5) | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIRQ<br>PPGKGLEWMGYISYSGNTRYNPSLRSRITISRDTSKNQFF<br>LKLNSVTAADTATYYCATAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 328 | AB124VL | VL EGFR (sec. 5) | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKP<br>GKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQP<br>EDFATYYCVQYGQFPWTFGGGTKLEIKR |

La descripción detallada de las moléculas de DVD-Ig específicas capaz de unir objetivos específicos, y los métodos para hacer las mismas, se proporciona en la sección posterior de los ejemplos.

***D. Producción de proteínas de DVD***

Las proteínas de unión de la invención se pueden producir por cualquiera de un número de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión de las células hospedadoras, en donde el vector de expresión que codifica las cadenas pesadas y ligeras de DVD es transfectado en una célula hospedadora por técnicas estándar. Varias formas del término "transfección" se piensan para comprender una gran variedad de técnicas usas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación de calcio-fosfato, transfección de DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar las proteínas de DVD de la invención en las células hospedadoras procariotas o eucariotas, las proteínas de DVD se expresan en las células eucariotas, por ejemplo, células hospedadoras mamíferas, debido a que tales células eucariotas (y particularmente las células mamíferas) tienen más posibilidad que las células procariotas de montar y secretar una proteína de DVD inmunológicamente activa correctamente plegada.

Las células hospedadoras mamíferas ejemplares para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen las células ováricas de hámster chino (células CHO) (incluyendo las células dhfr-CHO, descritas en Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, utilizadas con un marcador elegible de DHFR, por ejemplo, según lo descrito en

Kaufman, RJ. and Sharp, P.A. (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), células de mieloma NS0, células COS, células SP2 y PER.C6. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican las proteínas de DVD se introducen en las células hospedadoras mamíferas, las proteínas de DVD son producidas cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión de las proteínas de DVD en las células hospedadoras o la secreción de las proteínas de DVD en el medio de cultivo en donde se desarrollan las células hospedadoras. Las proteínas de DVD se pueden recuperar del medio de cultivo usando los 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 la cadena pesada de DVD y la cadena ligera de DVD es introducido en las células dhfr-CHO por la transfección mediada por fosfato-calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de DVD de cadena pesada y ligera están cada uno ligado operativamente a los elementos reguladores del reforzador de CMV/promotor de AdMLP para conducir los niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen de DHFR, que permite la selección de las células CHO que son transfectadas con el vector usando la selección/amplificación de metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesadas y

ligeras de DVD y la proteína intacta de DVD se recupera del medio de cultivo. Las técnicas de biología molecular estándar se utilizan para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar la proteína de DVD del medio de cultivo. La invención proporciona aún otro método para sintetizar una proteína de DVD de la invención cultivando una célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo conveniente hasta que se sintetice una proteína de DVD de la invención. El método puede comprender adicionalmente el aislamiento de la proteína de DVD del medio de cultivo.

Una característica importante de DVD-Ig es que se puede producir y purificarse de una manera similar como anticuerpo convencional. La producción de DVD-Ig da lugar a un producto importante homogéneo simple con la actividad específica dual deseada, sin ninguna modificación de la secuencia de la región constante o modificaciones químicas de la clase. Otros métodos previamente descritos para generar las proteínas de unión integrales "biespecíficas", "multiespecíficas", y "multivalentes multiespecíficas" no conducen a un solo producto primario sino, en su lugar, conducen a la producción intracelular o secretada de una mezcla de proteínas de unión integrales inactivas, monoespecíficas, multiespecíficas, multivalentes, integrales montadas, y de las proteínas de unión integrales multivalentes

con la combinación de diferentes sitios de unión. Como ejemplo, basado en el diseño descrito por Miller and Presta (Publicación PCT No. WO 2001/077342), existen 16 combinaciones posibles de cadenas pesadas y ligeras. Por lo tanto, solamente el 6.25% de la proteína es probable que esté en la forma activa deseada, y no como un solo producto importante o como un solo producto primario en comparación con las otras 15 combinaciones posibles. La separación de las formas completamente activas deseadas de la proteína de las formas inactivas y parcialmente activas de la proteína usando las técnicas de cromatografía estándar, usadas comúnmente en la fabricación a gran escala, debe aún ser demostrada.

Asombrosamente, el diseño de las "proteínas de unión integrales multivalentes específica duales" de la invención conduce a una cadena ligera de dominio variable dual y a una cadena pesada de dominio variable dual, que se montan principalmente a las "proteínas de unión integrales multivalentes específicas duales" deseadas.

Por lo menos 50%, por lo menos 75% y por lo menos 90% de las moléculas de inmunoglobulina de dominio variable dual montadas, y expresadas son la proteína tetravalente específica dual deseada. Este aspecto mejora particularmente la utilidad comercial de la invención. Por lo tanto, la invención incluye un método para expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una célula que

conduce a un solo producto primario de una "proteína de unión integral tetravalente específica dual".

La invención proporciona un método para expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una célula que conduce a un "producto primario" de una "proteína de unión integral tetravalente específica dual", donde el "producto primario" es más del 50% de toda la proteína montada, que comprende una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual.

La invención proporciona un método para expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una célula que conduce a un solo "producto primario" de una "proteína de unión integral tetravalente específica dual", donde el "producto primario" es más del 75% de toda la proteína montada, que comprende una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual.

La invención proporciona un método para expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una célula que conduce a un solo "producto primario" de una "proteína de unión integral tetravalente específica dual", donde el "producto primario" es más del 90% de toda la proteína montada, que comprende una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio

variable dual.

***II. Proteínas de unión derivadas de DVD***

Una modalidad proporciona una proteína de unión etiquetada en donde la proteína de unión de la invención se deriva o liga a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión etiquetada de la invención puede ser derivada ligando funcionalmente una proteína de unión de la invención (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más de otras entidades moleculares, tal como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido capaz de mediar la asociación de la proteína de unión con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

Los agentes detectables útiles de los cuales una proteína de unión de la invención puede ser derivada incluyen compuestos fluorescentes. Los agentes detectables fluorescentes ejemplares incluyen la fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina, y similares. Una proteína de unión se puede también derivar con las enzimas detectables, tal como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, oxidasa de glucosa y similares. Cuando una proteína de unión se deriva con una enzima detectable, es detectada agregando los reactivo adicionales cuya enzima se

utiliza 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 coloración, que es detectable. Una proteína de unión se puede también derivar con biotina, y detectar con la medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

Otra modalidad de la invención proporciona una proteína de unión cristalizada y las formulaciones y composiciones que comprenden tales cristales. En una modalidad, la proteína de unión cristalizada tiene un mayor período *in vivo* que las contrapartes solubles de la proteína de unión. En otra modalidad, la proteína de unión conserva la actividad biológica después de la cristalización.

La proteína de unión cristalizada de la invención se puede producir de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica y según lo descrito en la Publicación PCT No. WO 02/072636.

Otra modalidad de la invención proporciona 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 experimentar la transformación adicional, conocida como modificación post-traducción. Particularmente, los residuos de azúcar (glicosilo) se pueden agregar de manera enzimática, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes

que llevan cadenas laterales de oligosacárido covalentes ligadas se conocen como las 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 un efecto importante sobre la función efectora del dominio Fc, con un efecto mínimo sobre la unión a antígeno o vida media del anticuerpo (Jefferis, R. (2005) Biotechnol. Prog. 21: 11-16). En contraste, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto sobre la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debido al obstáculo estérico (Co, M.S. y colaboradores (1993) Mol. Immunol. 30: 1361-1367), o da lugar a una afinidad aumentada para el antígeno (Wallick, S.C. y colaboradores (1988) Exp. Med. 168: 1099-1109; Wright, A. y colaboradores (1991) EMBO J. 10: 2717 2723).

Un aspecto de la invención se dirige a generar los mutantes de sitio de glicosilación en los cuales el sitio de glicosilación ligado a O o N de la proteína de unión se ha transformado. El experto puede generar tales mutantes usando las tecnologías estándar bien conocidas. Los mutantes de sitio de glicosilación que conservan la actividad biológica pero tiene una han actividad de unión aumentada o disminuida son otro objeto de la invención.

En aún otra modalidad, se modifica la glicosilación del

anticuerpo o porción de unión a antígeno de la invención. Por ejemplo, un anticuerpo no glicosilado puede ser hecho (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Tales modificaciones de carbohidrato se pueden lograr mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpo. Por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácido se pueden hacer para dar lugar a la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de región variables para de tal modo eliminar la glicosilación en ese sitio. Tal ausencia de glicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Tal método se describe en detalle adicional en la Publicación PCT No. WO 2003/016466, y en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,714,350 y 6,350,861, cada una de las cuales está incorporada en la presente por referencia en su totalidad.

Adicional o alternativamente, una proteína de unión modificada de la invención se puede hacer la cual tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo (ver Kanda y colaboradores (2007) J. Biotechnol. 130(3): 300-310.) o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNAc de bisección aumentadas. Tales patrones de glicosilación alterados han demostrado aumentar la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidrato se pueden lograr mediante,

por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con la maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células hospedadoras en las cuales se expresan los anticuerpos recombinantes de la invención para de tal modo producir un anticuerpo con glicosilación alterada. Ver, por ejemplo, Shields, R.L. y colaboradores (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; Umana y colaboradores (1999) Nat. Biotech. 17: 176-1, así como, Patente Eurpea No. EP 1,176,195; Publicaciones PCT Nos. WO 03/035835 y WO 99/54342 80, cada una de las cuales está incorporada en la presente por referencia en su totalidad.

La glicosilación de la proteína depende de la secuencia de aminoácido de la proteína de interés, así como la célula hospedadora en la cual se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (por ejemplo, las 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, pueden se diferentes dependiendo del sistema anfitrión en el cual se expresa la proteína particular. Los residuos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero sin limitarse a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. En una modalidad, la proteína de unión glicosilada comprende los

residuos de glicosilo tal que el patrón de glicosilación sea humano.

Es conocido por los expertos en la técnica que la glicosilación de proteína de diferenciación puede dar lugar a las características de proteína diferenciación. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo anfitrión, tal como levadura, y glicosilada utilizando la ruta endógena de levadura, puede ser reducida en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula mamífera, tal como una línea de células CHO. Tales glicoproteínas pueden también ser inmunogénicas en humanos y mostrar una vida media *in vivo* reducido después de la administración. Los receptores específicos en humanos y otros animales pueden reconocer los residuos de glicosilo específicos y promover la eliminación rápida de la proteína de la circulación sanguínea. Otros efectos nocivos pueden incluir cambios en el plegamiento de proteína, solubilidad, susceptibilidad a las proteasas, tráfico, transporte, compartimentalización, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad, o alergenicidad. Por consiguiente, un médico puede elegir una proteína terapéutica con una composición específica y un patrón de glicosilación, por ejemplo, composición y patrón de glicosilación idénticos, o por lo menos similares, a los producidos en las células humanas o en las células específicas a la especie del sujeto animal previsto.

La expresión de las proteínas glicosilada diferentes de la de una célula hospedadora puede ser lograda modificando de manera genética la célula hospedadora para expresar las enzimas de glicosilación heterólogas. Usando los métodos conocidos en la técnica un médico puede generar los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos, que exhiben la glicosilación de proteína humana. Por ejemplo, las cepas de levadura se han modificado de manera genética para expresar las enzimas de glicosilación no naturales tal que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura exhiban la glicosilación de proteína idéntica a la de las células animales, especialmente células humanas (Solicitudes de Patentes Norteamericanas 20040018590 y 20020137134 y Publicación de Patente WO2005100584 A2).

Además de las proteínas de unión, la invención también se dirige a los anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) específicos para tales proteínas de unión de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo, que reconoce los determinantes únicos asociados generalmente a la región de unión a antígeno de otro anticuerpo. El anticuerpo anti-Id puede ser preparado inmunizando un animal con la proteína de unión o una región que contienen la CDR del mismo. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo de inmunización y producirá un anticuerpo anti-Id. Es fácilmente evidente capaz ser más fácil generar los anticuerpos anti-idiotípico para dos o más

anticuerpos madre incorporados en una molécula de DVD-Ig; y confirmar los estudios de unión por los métodos bien reconocidos en la técnica (por ejemplo, BIAcore, ELISA) para verificar que los anticuerpos anti-idiotípicos específicos para el idiotipo de cada anticuerpo madre también reconocen el idiotipo (por ejemplo, sitio de unión a antígeno) en el contexto de la DVD-Ig. Los anticuerpos anti-idiotípicos específicos para cada uno de dos o más sitios de unión a antígeno de una DVD-Ig proporcionan los reactivo ideales para medir las concentraciones de DVD-Ig de una DVD-Ig humana en suero madre; los análisis de concentración de DVD-Ig se pueden establecer usando un "formato de análisis ELISA de tipo emparedado" con un anticuerpo para una primera región de unión a antígeno recubierta en la fase sólida (por ejemplo, chip de BIAcore, placa de ELISA, etc.), enjuague con amortiguador de enjuague, incubación con la muestra de suero, nuevamente enjuague, y finalmente la incubación con otro anticuerpo anti-idiotípico para otro sitio de unión a antígeno, sí mismo etiquetado con una enzima para la cuantificación de la reacción de unión. En una modalidad, para una DVD-Ig con más de dos diferentes sitios de unión, los anticuerpos anti-idiotípicos para los dos sitios de unión exteriores (el más distal y próximo de la región constante) no sólo ayudarán a la determinación de la concentración de DVD-Ig en suero humano sino también documentarán la integridad de la molécula *in vivo*. Cada anticuerpo anti-Id se puede también utilizar como "inmunógeno" para inducir una inmunorespuesta en

aún otro animal, produciendo un llamado anticuerpo anti-anti-Id.

Además, será apreciado por el experto que una proteína de interés se pueda expresar usando una biblioteca de células hospedadoras diseñadas de manera genética para expresar varias enzimas de glicosilación, tal que las células hospedadoras que son miembros de la biblioteca produzcan la proteína de interés con los patrones de glicosilación variables. Un médico puede entonces seleccionar y aislar la proteína de interés con los nuevos patrones particulares de glicosilación. En una modalidad, la proteína que tiene un nuevo patrón de glicosilación particularmente seleccionado exhibe las características biológicas mejoradas o alteradas.

***III. Usos de DVD-Ig***

Debido a su capacidad de unir a dos o más antígenos las proteínas de unión de la invención se pueden utilizar para detectar los antígenos (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como un ELISA, radioinmunoanálisis (RIA, por sus siglas en inglés), o inmunohistoquímica de tejido. La DVD-Ig se etiqueta directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables convenientes incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes, y materiales radioactivos. Los ejemplos de enzimas convenientes incluyen peroxidasa de rábano picante,

fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, y acetilcolinesterasa; los ejemplos de los complejos de grupo prostético convenientes incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes convenientes incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo y ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; y los ejemplos de los materiales radioactivos convenientes incluyen $^{3}H$, $^{14}C$, $^{35}S$, $^{90}Y$, $^{99}Tc$, $^{111}In$, $^{125}I$, $^{131}I$, $^{177}Lu$, $^{166}Ho$, y $^{153}Sm$.

En una modalidad las proteínas de unión de la invención pueden neutralizar la actividad de los antígenos *in vitro* e *in vivo*. Por consiguiente, tales DVD-Igs se pueden utilizar para inhibir la actividad del antígeno, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene los antígenos, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen los antígenos con los cuales una proteína de unión de la invención reacciona de manera cruzada. En otra modalidad, la invención proporciona un método para reducir la actividad de antígeno en un sujeto que sufre de una enfermedad o trastorno en donde la actividad de antígeno sea perjudicial. Una proteína de unión de la invención se puede administrar a un sujeto humano para los propósitos terapéuticos.

Según lo utilizado en la presente, el término "un trastorno en el cual la actividad de antígeno sea perjudicial" se piensa para incluir las enfermedades y otros trastornos en los cuales la

presencia del antígeno en un sujeto que sufre del trastorno ha mostrado ser o se sospecha que sea responsable de la patofisiología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Por consiguiente, un trastorno en el cual la actividad de antígeno es perjudicial es un trastorno en el cual se espera que la reducción de la actividad de antígeno alivie los síntomas y/o la progresión del trastorno. Tales trastornos se pueden evidenciar, por ejemplo, por un aumento de la concentración de antígeno en un fluido biológico de un sujeto que sufre del trastorno (por ejemplo, un aumento de la concentración de antígeno en suero, plasma, fluido sinovial, etc., del tema). Los ejemplos no limitantes de los trastornos que se pueden tratar con las proteínas de unión de la invención incluyen aquellos trastornos discutidos posteriormente y en la sección referente a las composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

Las DVD-Igs de la invención pueden unir un antígeno o múltiples antígenos. Tales antígenos incluyen, pero no se limitan a, los objetivos enumerados en las siguientes bases de datos. Estas bases de datos de objetivo incluyen los listados:

Objetivos terapéuticos (xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttd/ttd.asp);

Citosinas y receptores de citosina (www.citosinawebfacts.com, www.copewithcitosinas.de/cope.cgi, y cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/citosina.medic.kum

amoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html);

Quimiocinas (citokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemocine.html);

Receptores de quimiocina y GPCRs (csp.medic.kumamoto-u.ac.jp/CSP/Receptor.html, y www.gpcr.org/7tm/);

Receptores olfativos (senselab.med.yale.edu/senselab/ORDB/default.asp);

Receptores (www.iuphar-db.org/iuphar-rd/list/index.htm);

Objetivos de cáncer (cged.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi);

Proteínas secretadas como objetivos de anticuerpo potenciales (spd.cbi.pku.edu.cn/);

Cinasas de proteína (spd.cbi.pku.edu.cn/), y

Marcadores CD humanos (content.labvelocitv.eom/tools/6/1226/CD table_final_locked.pdf) y (Zola H (2005) Blood 106: 3123-6).

Las DVD-Igs son útiles como agentes terapéuticos para bloquear simultáneamente dos diferentes objetivos para mejorar la eficacia/seguridad y/o aumentar la cobertura del paciente. Tales objetivos pueden incluir los objetivos solubles (por ejemplo, TNF) y los objetivos de receptor de superficie de célula (por ejemplo, VEGFR y EGFR). Pueden también ser utilizados para inducir la citotoxicidad dirigida nuevamente entre las células tumorales y células T (por ejemplo, Her2 y CD3) para la terapia del cáncer, o entre la célula autoreactiva y las células efectoras para la enfermedad autoinmune o trasplante, o entre cualquier

célula objetivo y la células efectoras que eliminan las células causantes de enfermedad en cualquier enfermedad dada.

Además, la DVD-Ig se puede utilizar para accionar el agrupamiento y activación del receptor cuando se diseña para dirigirse a dos diferentes epítopos en el mismo receptor. Esto puede tener ventaja en la fabricación de los terapéuticos anti-GPCR agonistas y antagonistas. En este caso, la DVD-Ig se puede utilizar para dirigirse a dos diferentes epítopos (incluyendo los epítopos en las regiones de bucle y el dominio extracelular) en una célula para el agrupamiento/señalización (dos moléculas de superficie de célula) o señalización (en una molécula). Similarmente, una molécula de DVD-Ig se puede diseñar para accionar la unión de CTLA-4, y una señal negativa localizando dos diferentes epítopos (o 2 copias del mismo epítopo) del dominio extracelular CTLA-4, lo cual conduce a la regulación de la inmunorespuesta. CTLA-4 es un objetivo clínicamente validado para el tratamiento terapéutico de un número de trastornos inmunológicos. Las interacciones de CTLA-4/B7 regulan negativamente la activación de las células T atenuando la progresión del ciclo celular, la producción de IL-2, y la proliferación de las células deT después de la activación, y el acoplamiento de CTLA-4 (CD152) puede infra-regular la activación de las células T y promover la inducción de la tolerancia inmune. Sin embargo, la estrategia de atenuar la activación de las células T por el acoplamiento de anticuerpo

agonista de CTLA-4 ha fracasado puesto que la activación de CTLA-4 requiere la unión. La interacción molecular de CTLA-4/B7 está en las matrices de "cremallera sesgada", según lo demostrado por el análisis estructural cristalino (Stamper (2001) Nature 410: 608). Sin embargo, ningunos de los reactivo de unión a CTLA-4 actualmente disponibles tienen las características de unión, que incluyen los mAbs anti-CTLA-4. Ha habido varios intentos de abordar este problema. En un caso, un anticuerpo de cadena simple de unión de miembro fue generado, e inhibió perceptiblemente el rechazo alogénico en los ratones (Hwang (2002) J. Immunol. 169: 633). En un caso separado, el anticuerpo de cadena simple ligado a superficie de APC artificial para CTLA-4 fue generado y demostró atenuar las respuestas de las células T (Griffin (2000) J. Immunol. 164: 4433). En ambos casos, la unión a CTLA-4 fue alcanzada por los anticuerpos de unión a miembro localizado estrechamente en los sistemas artificiales. Mientras que estos experimentos proporcionan la prueba de concepto para la infra-regulación inmunológica accionando la señalización negativa de CTLA-4, los reactivo usados en estos reportes no son convenientes para el uso terapéutico. Para esté propósito, la unión a CTLA-4 puede ser alcanzada usando una molécula de DVD-Ig, que localiza dos diferentes epítopos (o 2 copias del mismo epítopo) del dominio extracelular de CTLA-4. El análisis razonado es que la distancia que atraviesan dos sitios de unión de un IgG, aproximadamente 150-170Å, es demasiado

grande para la unión activa de CTLA-4 (30-50Å entre el homodímero 2 CTLA-4). Sin embargo, la distancia entre los dos sitios de unión en DVD-Ig (una ramificación) es mucho más corta, también en el intervalo de 30-50Å, permitiendo la unión apropiada de CTLA-4.

Similarmente, DVD-Ig puede localizar dos diferentes miembros de un complejo del receptor de superficie de célula (por ejemplo, IL-12R alfa y beta). Además, DVD-Ig puede localizar CR1 y una proteína/patógeno soluble para conducir la eliminación rápida de la proteína/patógeno soluble objetivo.

Además, las DVD-Igs de la invención se pueden utilizar para el suministro específico a tejido (localizar un marcador de tejido y un mediador de enfermedad para mejorar la PK local, así se eleva la eficacia y/o disminuye la toxicidad), incluyendo el suministro intracelular (localizar un receptor de internalización y una molécula intracelular) y suministro dentro del cerebro (localizar el receptor de transferrina y un mediador de enfermedad del CNS para cruzar la barrera de sangre-cerebro). La DVD-Ig puede también servir como proteína portadora para suministrar un antígeno a una localización específica vía la unión a un epítopo no neutralizante de ese antígeno y también aumentar la vida media del antígeno. Además, la DVD-Ig puede ser diseñada para ligar físicamente los dispositivos médicos implantados en los pacientes o localizar estos dispositivos médicos (ver Burke, S. E. y colaboradores (2006) Adv. Drug Deliv. Rev. 58(3): 437-446;

Hildebrand, H. F. y colaboradores (2006) Surface and Coatings Technol. 200(22-23): 6318-6324; Wu, P. y colaboradores (2006) Biomaterials 27(11): 2450-2467; Marques, A. P. y colaboradores (2005) Biodegrad. Syst. Tissue Eng .and Regen. Med. 377-397). Brevemente, la dirección de los tipos apropiados de célula al sitio del implante médico puede promover la cura y restauración de la función normal del tejido. Alternativamente, también se proporciona la inhibición de los mediadores (incluyendo, pero sin limitarse a, citosinas), liberados durante la implantación del dispositivo por un DVD acoplado o localizado en un dispositivo. Por ejemplo, los stents se han utilizado por años en la cardiología de intervención para despejar las arterias bloqueadas y mejorar el flujo de sangre hacia el músculo del corazón. Sin embargo, los stents de metal descubiertos tradicionales se han conocido por causar la restenosis (angostamiento repetido de la arteria en un área tratada) en algunos pacientes y pueden conducir a los coágulos de sangre. Recientemente, se ha descrito un stent recubierta con anticuerpo anti-CD34 que reduce la restenosis y evita que ocurran los coágulos de sangre capturando las células progenitoras endoteliales (EPC) que circulan a través de la sangre. Las células endoteliales son las células que alinean los vasos sanguíneos, permitiendo que la sangre fluya sin obstáculos. Las EPCs se adhieren a la superficie dura del stent formando una capa lisa que no sólo promueve la curación sino previene la restenosis y coágulos de sangre, complicaciones

asociadas previamente al uso de los stents (Aoji, y colaboradores (2005) J. Am. Coll. Cardiol. 45(10): 1574-9). Además de mejorar los resultados para los pacientes que requieren los stents, existen también las implicaciones para los pacientes que requieren la cirugía de derivación cardiovascular. Por ejemplo, un conducto vascular prostético (arteria artificial) recubierto con los anticuerpos anti-EPC eliminaría la necesidad de utilizar las arterias de las piernas o brazos de los pacientes para los injertos de la cirugía de derivación. Esto reduciría la duración de la cirugía y anestesia, que, a su vez, reducirá las muertes por cirugía coronaria. La DVD-Ig se diseña de una manera tal que una a un marcador de superficie de célula (tal como CD34) así como una proteína (o a un epítopo de la clase que incluye, pero sin limitarse a, proteínas, lípidos y polisacáridos) que ha estado recubierta en el dispositivo implantado para facilitar el reclutamiento celular. Tales métodos también se pueden aplicar a otros implantes médicos en general. Alternativamente, las DVD-Igs pueden estar recubiertas en los dispositivos médicos y, durante la implantación y liberación de todas los DVDs del dispositivo (o cualquier otra necesidad, que pueda requerir las DVD-Igs frescas adicionales, que incluye el envejecimiento y desnaturalización de la DVD-Ig ya cargado), el dispositivo se podría recargar por la administración sistémica de DVD-Ig fresca al paciente, donde la DVD-Ig se diseña para unir a un objetivo de interés (una citosina, marcador de superficie de célula (tal como

CD34), etc.) con un conjunto de sitios de unión y a un objetivo recubierto en el dispositivo (incluyendo una proteína y un epítopo de la clase que incluye, pero no se limita a, lípidos, polisacáridos y polímeros) con el otro. Esta tecnología tiene la ventaja de ampliar la utilidad de los implantes recubiertos.

***A. Uso de DVD-Igs en varias enfermedades***

Las moléculas de DVD-Ig de la invención son también útiles como moléculas terapéuticas para tratar varias enfermedades. Tales moléculas de DVD pueden unir uno o más objetivos implicados en una enfermedad específica. Los ejemplos de tales objetivos en varias enfermedades son descritos posteriormente.

***1. Respuesta humana autoinmune e inflamatoria***

Muchas proteínas se han implicado en las respuestas autoinmunes e inflamatorias generales, que incluyen C5, CCL1 (I-309), CCL11 (eotaxin), CCL13 (mcp-4), CCL15 (MIP-Id), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL2 (mcp-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/eotaxin-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, ILIF10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL22, IL5, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF,

SCYE1 (citosina de activación de monocito endotelial), SPP1, TNF, TNFSF5, IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RA1, IL5RA, IL9, IL9R, ABCFI, BCL6, C3, C4A, CEBPB, CRP, ICEBERG, IL1R1, IL1RN, IL8RB, LTB4R, TOLLIP, FADD, IRAK1, IRAK2, MYD88, NCK2, TNFAIP3, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, ACVRI1 ACVRIB, 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, TGFBIII, TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, THIL, TNF, TNFRSF1A,

TNFRSF1B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF1I1A, TNFRSF21, TNFSF4, TNFSF5, TNFSF6, TNFSF11, VEGF, ZFPM2, y RNF110 (ZNF144). En un aspecto, se proporciona las DVD-Igs capaz de unir uno o más de las objetivos enumerados en la presente.

***2. Asma***

El asma alérgico es caracterizado por la presencia de eosinofília, metaplasia de células caliciformes, alteraciones de células epiteliales, hiperreactividad de las vías aéreas (AHR), y expresión de citosina Th2 y Thl, así como niveles elevados de IgE en suero. Ahora se acepta ampliamente que la inflamación de las vías aéreas es el factor clave que es la base de la patogénesis del asma, que implica una interacción compleja de las células inflamatorias tal como células T, células B, eosinófilos, mastocitos y macrófagos, y sus mediadores secretados que incluyen citosinas y quimiocinas. Los corticoesteroides son el tratamiento antiinflamatorio más importante para el asma en la actualidad; sin embargo, su mecanismo de acción es no específico y las preocupaciones de seguridad existen, especialmente en la población juvenil de pacientes. El desarrollo de terapias más específicas y dirigidas, por lo tanto, se autoriza. Existe un aumento de la evidencia de que IL-13 en ratones imita muchas de las características del asma, incluyendo la AHR, hipersecreción de moco y fibrosis de las vías aéreas, independientemente de la inflamación eosinófila (Finotto, y

colaboradores (2005) Internal Immunol. 17(8): 993-1007; Padilla, y colaboradores (2005) J. Immunol. 174(12): 8097-8105).

IL-13 ha mostrado tener como una función fundamental en causar las respuestas patológicas asociadas al asma. El desarrollo de la terapia de mAb anti-IL-13 para reducir los efectos de IL-13 en el pulmón es un nuevo método emocionante que ofrece una promesa considerable como nuevo tratamiento para el asma. Sin embargo, otros mediadores de las rutas inmunológicas diferenciadas también están implicados en la patogénesis del asma, y bloquean estos mediadores, además IL-13, puede ofrecer la ventaja terapéutica adicional. Tales pares de objetivos incluyen, pero no se limitan a, IL-13 y una citosina pro-inflamatoria, tal como el factor α de necrosis tumoral (TNF-α). TNF-α puede amplificar la respuesta inflamatoria en el asma y se puede ligar a la severidad de la enfermedad (McDonnell, y colaboradores (2001) Progr. Respir. Res. 31: 247-250). Esto sugiere que el bloqueo de IL-13 y TNF-α puede tener efectos beneficiosos, particularmente en enfermedades severas de las vías aéreas. En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención une las objetivos IL-13 y TNFα y se utiliza para tratar el asma.

Los modelos animales tal como el modelo ratón de asma inducido por OVA, donde la inflamación y AHR pueden ser determinadas, se conocen en la técnica y se pueden utilizar para determinar la capacidad de varias moléculas de DVD-Ig para tratar el asma. Los modelos animales para estudiar el asma se

describen en Coffman, y colaboradores (2005) J. Exp. Med. 201(12): 1875-1879; Lloyd y colaboradores (2001) Adv. Immunol. 77: 263-295; Boyce y colaboradores (2005) J. Exp. Med. 201(12): 1869-1873; y Snibson y colaboradores (2005) J. Brit. Soc. Allerg. Clin. Immunol. 35(2): 146-52. Además de las valoraciones de seguridad rutinarias de este par de objetivos, las pruebas específicas para determinar el grado de inmunosupresión pueden ser autorizadas y provechosas en la selección del mejor par de objetivos (ver Luster y colaboradores (1994) Toxicology 92(1-3): 229-43; Descotes, y colaboradores (1992) Devel. Biol. Stand. 77: 99-102; Hart y colaboradores (2001) J. Allerg. Clin. Immunol. 108(2): 250-257).

De acuerdo con el análisis razonado descrito en la presente, y con el mismo modelo de evaluación para la eficacia y seguridad, otros pares de objetivos cuyas moléculas de DVD-Ig se pueden unir y capaz de ser útiles para tratar el asma, pueden ser determinados. En una modalidad, tales objetivos incluyen, pero no se limitan a, IL-13 e IL-1beta, puesto que implican a IL-1beta también en la respuesta inflamatoria en el asma; IL-13 y citosinas y quimiocinas están implicadas en la inflamación, tal 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 FIM; IL-13 y TGF-β; agonista de IL-13 y LHR; IL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; IL-13 y ADAM8. La invención también proporciona las DVD-Igs capaz de unir uno o más objetivos implicados en el asma seleccionadas del grupo que

consiste de CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFNA1, IFNB1, IFNG, receptores de histamina y 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, XCRI, FOS, GATA3, JAKI, JAK3, STAT6, TBX21, TGFBI, TNF, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCERIA, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, y Chitinasa.

*3. Artritis reumatoide*

La artritis reumatoide (RA por sus siglas en inglés), una enfermedad sistémica, es caracterizada por una reacción inflamatoria crónica en el sinovio de las articulaciones y está asociada a la degeneración del cartílago y erosión del hueso yuxta-articular. Muchas citosinas pro-inflamatorias que incluyen TNF, quimiocinas, y factores de crecimiento, se expresan en las articulaciones enfermas. La administración sistémica del anticuerpo anti-TNF o proteína de fusión de sTNFR a los modelos ratón de la RA mostró ser antiinflamatoria y protectora de articulaciones. Las investigaciones clínicas en las cuales la actividad de TNF en los pacientes con RA fue bloqueada con infliximab administrada de manera intravenosa (Harriman, G. y colaboradores (1999) Ann. Rheum. Dis. 58 (Suppl 1): 161-4), un

mAb anti-TNF quimérico, ha proporcionado la evidencia que TNF regula la producción de IL-6, IL-8, MCP-1, y VEGF, reclutamiento de células inmunes e inflamatorias en las articulaciones, angiogénesis, y reducción de los niveles en sangre de las metaloproteinasas-1 y -3. Una mejor comprensión de la ruta inflamatoria en la artritis reumatoide ha conducida a la identificación de otros objetivos terapéuticos implicados en la artritis reumatoide. Los tratamientos prometedores, tal como antagonistas de interleucina-6 (anticuerpo MRA del receptor IL-6, desarrollado por Chugai, Roche (ver Nishimoto, N. y colaboradores (2004) Arthrit. Rheum. 50(6): 1761-1769), CTLA4Ig (abatacept, Genovese, M. y colaboradores (2005) N. Engl. J. Med. 353: 1114-23.), y terapia anti-células B (rituximab; Okamoto, H. and Kamatani, N. (2004) N. Engl. J. Med. 351: 1909), se han probado ya en ensayos controlados aleatorios durante el último año. Otras citosinas se han identificado y mostrado para ser benéficos en los modelos animales, que incluyen interleucina-15 (anticuerpo terapéutico HuMax-IL_15, AMG 714 (ver Baslund, B. y colaboradores (2005) Arthrit. Rheum. 52(9): 2686-2692)), interleucina-17, e interleucina-18, y los ensayos clínicos de estos agentes están actualmente en ejecución. La terapia específica dual del anticuerpo, combinando anti-TNF y otro mediador, tiene gran potencial en el aumento de la eficacia clínica y/o cobertura del paciente. Por ejemplo, el bloqueo de TNF y VEGF puede suprimir potencialmente la inflamación y angiogénesis, que están

implicadas en la patofisiología de RA. También se contempla bloquear otros pares de objetivos implicados en la RA que incluyen, pero no se limitan a, TNF e IL-18; TNF e IL-12; TNF e IL-23; TNF e IL-1beta; TNF y FIM; TNF e IL-17; TNF e IL-15, TNF y SOST con las DVD-Igs específicas. Además de las valoraciones de seguridad rutinarias de estos pares de objetivos, las pruebas específicas para determinar el grado de inmunosupresión pueden ser autorizadas y provechosas en la selección de los mejores pares de objetivos (ver Luster y colaboradores (1994) Toxicol. 92(1-3): 229-43; Descotes y colaboradores (1992) Devel. Biol. Stand. 77: 99-102; Hart y colaboradores (2001) J. Allerg. Clin. Immunol. 108(2): 250-257). Si una molécula de DVD-Ig será útil para el tratamiento de la artritis reumatoide se puede determinar usando los modelos animales preclínicos de la RA tal como el modelo ratón de la artritis inducida por colágeno. Otros modelos útiles son también bien conocidos en la técnica (ver Brand, D.D. (2005) Comp. Med. 55(2): 114-22). De acuerdo con la reactividad cruzada de los anticuerpos madre para los estudios de validación de los ortólogos humanos y de ratón (por ejemplo, reactividad para TNF humano y de ratón, IL-15 humana y de ratón, etc.) en el modelo ratón de CIA pueden ser conducidos con las moléculas de DVD-Ig derivadas del "anticuerpo sustituto igualado"; brevemente, una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos específicos al objetivo de ratón se puede igualar a medida de lo posible a las características de los anticuerpos madre humanos o humanizados

usados para la construcción de DVD-Ig humana (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar, etc.).

*4. SLE*

La característica inmunopatogénica de SLE es la activación de las células B policlonales, que conduce a la hiperglobulinemia, producción de autoanticuerpo y formación del complejo inmunológico. La anormalidad fundamental parece ser la incapacidad de las células T de suprimir los clones de células B prohibidos debido a la alteración generalizada de las células T. Además, la interacción de las células B y T es facilitada por varias citosinas, tal como IL-10, así como las moléculas co-estimulantes, tal como CD40, CD40L, B7, CD28, y CTLA-4, que inician la segunda señal. Estas interacciones, junto con la separación fagocitaria deteriorada de los complejos inmunológicos y material apoptótico, perpetúan la inmunorespuesta con lesión de tejido resultante. Las siguientes objetivos se pueden implicar en la SLE y se pueden potencialmente utilizar para un método de DVD-Ig para la intervención terapéutica: las terapias dirigidas a las células 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, CDIC, CHSTIO, HLA-A, HLA-DRA, y NT5E; señales co-estimulantes: CTLA4 o B7.1/B7.2; inhibición de la supervivencia de las células B: BlyS o BAFF; desactivación del complemento: C5; modulación de citosina: el principio esencial es que la respuesta biológica neta en cualquier tejido es el resultado de un equilibrio entre los niveles locales de citosinas pro-inflamatorias o antiinflamatorias (ver Sfikakis, P.P. y colaboradores (2005) Curr. Opin. Rheumatol. 17: 550-7). La SLE se considera una enfermedad conducida por Th-2 con elevaciones documentadas en suero de IL-4, IL-6, e IL-10. Las DVD-Igs capaz unir uno o más objetivos seleccionados del grupo que consiste de IL-4, IL-6, IL-10, IFN-α, y TNF-α también se contemplan. La combinación de los objetivos discutidos en la presente mejorará la eficacia terapéutica para SLE, que se puede probar en un número de modelos preclínicos de lupus (ver a Peng, S.L. (2004) Methods Mol. Med. 102: 227-72). De acuerdo con la reactividad cruzada de los anticuerpos madre para los estudios de validación de los ortólogos humanos y de ratón (por ejemplo, la reactividad para CD20 humano y de ratón, interferón alfa humano y de ratón, etc.) en un modelo ratón del lupus, puede ser conducido con las moléculas de DVD-Ig derivadas del "anticuerpo sustituto igualado". Brevemente, una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos específicos al objetivo de ratón se pueden igualar en

la medida de lo posible a las características de los anticuerpos madre humanos o humanizados usados para la construcción de DVD-Ig humana (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar, etc.).

***5. Esclerosis múltiple***

La esclerosis múltiple (MS, por sus siglas en inglés) es una enfermedad de tipo autoinmune humana compleja con una etiología predominantemente desconocida. La destrucción inmunológica de la proteína básica de mielina (MBP por sus siglas en inglés), a través del sistema nervioso es la patología principal de la esclerosis múltiple. MS es una enfermedad de patologías complejas, que implica la infiltración por las células T CD4+ y de CD8+ y responde de dentro del sistema nervioso central. La expresión en el CNS de las citosinas, las especies de nitrógeno reactivas y las moléculas co-estimulantes, todos se ha reportado en la MS. De consideración. importante son los mecanismos inmunológicos que contribuyen al desarrollo de la autoinmunidad. Particularmente, la expresión de antígeno, las interacciones de citosina y leucocito, y células T reguladoras, que ayudan a equilibrar/modular otras células T, tal como las células Th1 y Th2, son partes importantes para la identificación terapéutica del objetivo.

IL-12 es una citosina pro-inflamatoria que es producida por la APC y promueve la diferenciación de las células efectoras Th1. IL-12 se produce en las lesiones en desarrollo de los pacientes

con EM así como en animales afectados con EAE. Fue mostrado previamente que la interferencia en las rutas de IL-12 previene con eficacia la EAE en roedores, y que la neutralización *in vivo* de IL-12p40 usando un mAb anti-IL-12 tiene efectos beneficiosos en el modelo de EAE inducida por mielina en monos tití comunes.

TWEAK es un miembro de la familia de TNF, expresado de manera constitutiva en el sistema nervioso central (CNS), con efectos pro-inflamatorios, proliferativos o apoptóticos dependiendo de los tipos de célula. Su receptor, Fn14, es expresado en el CNS por las células endoteliales, astrocitos reactivos y neuronas. TWEAK y la expresión de Fn14 ARNm aumentaron en la médula espinal durante la encefalomielitis autoinmune experimental. El tratamiento con anticuerpo anti-TWEAK en EAE inducida por la glicoproteína de oligodendrocito de mielina (MOG, por sus siglas en inglés) en los ratones C57BL/6, dio lugar a una reducción de la severidad de la enfermedad y a una infiltración de leucocito cuando los ratones fueron tratados después de la fase de acondicionamiento.

Un aspecto de la invención pertenece a las moléculas de DVD-Ig capaz de unir 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 modalidad incluye una DVD-Ig anti-IL-12/TWEAK específica dual como agente terapéutico beneficioso para el tratamiento de la

EM.

Varios modelos animales para determinar la utilidad de las moléculas de DVD para tratar la EM se conocen en la técnica (ver Steinman. L. y colaboradores (2005) Trends Immunol. 26(11): 565-71; Lublin, F.D. y colaboradores (1985) Springer Semin. Immunopathol. 8(3): 197-208; Genain, CP. y colaboradores (1997) J. Mol. Med. 75(3): 187-97; Tuohy, V.K. y colaboradores (1999) J. Exp. Med. 189(7): 1033-42; Owens, T. y colaboradores (1995) Neurol. Clin.13(1): 51-73; y Hart, B.A. y colaboradores (2005) J. Immunol. 175(7): 4761-8. De acuerdo con la reactividad cruzada de los anticuerpos madre para los ortólogos de la especie humana y animal (por ejemplo, reactividad para IL-12 humana y de ratón, TWEAK humano y de ratón, etc.), los estudios de validación en el modelo ratón de EAE se pueden conducir con las moléculas de DVD-Ig derivadas del "anticuerpo sustituto igualado". Brevemente, una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos específicos a objetivo de ratón se puede igualar en la medida de lo posible a las características de los anticuerpos madre humanos o humanizados usados para la construcción humana de DVD-Ig (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar, etc.). El mismo concepto se aplica a los modelos animales en otras especies distintas a roedor, donde DVD-Ig derivada del "anticuerpo sustituto igualado" sería seleccionada para los estudios anticipados de farmacología y posiblemente de seguridad. Además de las valoraciones de seguridad rutinarias de

estos pares de objetivos, las pruebas específicas para determinar el grado de inmunosupresión pueden ser autorizadas y provechosas en la selección de los mejores pares de objetivos (ver Luster y colaboradores (1994) Toxicol. 92(1-3): 229-43; Descotes y colaboradores (1992) Devel. Biol. Stand. 77: 99-102; Jones, R. (2000) IDrugs 3(4): 442-6).

***6. Sepsis***

La patofisiología de la sepsis es iniciada por los componentes de membrana externa de los organismos gram-negativos (lipopolisacárido, lípido A, endotoxina) y de los organismos gram-positivos (ácido lipoteicoico, peptidoglicano). Estos componentes de membrana externa pueden unir al receptor CD14 en la superficie de los monocitos. En virtud de lo descrito recientemente los receptores similares a toll, una señal entonces se transmite a la célula, conduciendo a la producción eventual de las citosinas pro-inflamatorias, factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa) e interleucina-1 (IL-1). Las excesivas respuestas inflamatorias e inmunológicas son características esenciales del choque séptico y desempeñan una función central en la patogénesis del daño de tejido, falla de múltiples órganos, y muerte inducida por sepsis. Las citosinas, especialmente el factor de necrosis tumoral y la interleucina (IL-1), han mostrado ser mediadores críticos del choque séptico. Estas citosinas tienen un efecto tóxico directamente en los tejidos; también activan la fosfolipasa A2. Éstos y otros efectos conducen a las

concentraciones aumentadas del factor de activación de plaqueta, promoción de la actividad de sintasa de óxido nítrico, promoción de infiltración de tejido por los neutrófilos, y promoción de la actividad de neutrófilo.

El tratamiento de la sepsis y choque séptico sigue siendo un enigma clínico, y los ensayos anticipados recientes con modificadores de respuesta biológica (es decir, anti-TNF y anti-FIM) que tuvieron como objetivo la respuesta inflamatoria, han mostrado solamente una ventaja clínica modesta. Recientemente, el interés ha cambiado hacia las terapias dirigidas invirtiendo los períodos de acompañamiento de la supresión inmunológica. Los estudios en animales de experimento y pacientes críticamente enfermos han demostrado que la apoptosis aumentada de los órganos linfoides y algunos tejidos parenquimales contribuyen a esta supresión inmunológica, anergia, y disfunción del sistema de órganos. Durante los síndromes de sepsis, la apoptosis de linfocito se puede accionar por la ausencia de IL-2 o por la liberación de glucocorticoides, granzimas, o las llamadas citosinas de "muerte": factor alfa de necrosis tumoral o ligando Fas. La apoptosis procede vía la auto-activación de las caspasas citosólicas y/o mitocondriales, que se pueden influenciar por los miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2. En animales de experimento, no sólo el tratamiento con los inhibidores de apoptosis puede prevenir la apoptosis de células linfoides; sino puede también mejorar el resultado. Aunque los ensayos clínicos

con los agentes anti-apoptóticos sigan permanezcan distantes debido en parte grande a las dificultades técnicas asociadas a su administración y localización de tejido, la inhibición de la apoptosis de linfocito representa un objetivo terapéutico atractivo para el paciente séptico. Asimismo, un agente específico dual que se dirige al mediador inflamatorio y a un mediador apoptótico, puede agregar un beneficio. Un aspecto de la invención pertenece a las DVD-Igs capaz de unir uno o más objetivos implicados en la sepsis, en una modalidad dos objetivos, seleccionados del grupo que consiste de TNF, IL-1, FIM, IL-6, IL-8, IL-18, IL-12, IL-23, FasL, LPS, receptores similares a toll, TLR-4, factor de tejido, MIP-2, ADORA2A, CASP1, CASP4, IL-10, IL-1B, NFKB1, PROC, TNFRSFIA, CSF3, CCR3, ILIRN, FIM, NFKB1, PTAFR, TLR2, TLR4, GPR44, HMOX1, midcina, IRAK1, NFKB2, SERPINA1, SERPINE1, y TREM1. La eficacia de tales DVD-Igs para la sepsis se puede determinar en los modelos animales preclínicos conocidos en la técnica (ver Buras, J.A. y colaboradores (2005) Nat. Rev. Drug Discov. 4(10): 854-65; and Calandra, T. y colaboradores (2000) Nat. Med. 6(2): 164-70).

***7. Trastornos neurológicos***

***7.1 Enfermedades neurodegenerativas***

Las enfermedades neurodegenerativas crónicas son generalmente enfermedades dependientes de la edad caracterizadas por la pérdida progresiva de las funciones neuronales (muerte celular neuronal, desmielinización), pérdida

de la movilidad y pérdida de la memoria. El conocimiento emergente de los mecanismos subyacentes de las enfermedades neurodegenerativas crónicas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) muestran una etiología compleja, y se han reconocido una variedad de factores que contribuyen a su desarrollo y progresión por ejemplo, edad, estado glucémico, producción amiloidea y multimerización, acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGE), que unen a su receptor RAGE (receptor para AGE), tensión oxidativa de cerebro aumentada, flujo de sangre cerebral disminuido, neuroinflamación incluyendo la liberación de citosinas y quimiocinas inflamatorias, disfunción neuronal y activación microglial. Así, estas enfermedades neurodegenerativas crónicas representan una interacción compleja entre los múltiples tipos de células y mediadores. Las estrategias de tratamiento para tales enfermedades son limitadas y constituyen principalmente el bloqueo de procesos inflamatorios con los agentes antiinflamatorios no específicos (por ejemplo, corticosteroides, inhibidores de COX) o agentes para prevenir la pérdida de neuronas y/o funciones sinápticas. Estos tratamientos no pueden detener la progresión de la enfermedad. Los estudios recientes sugieren que las terapias dirigidas, tal como anticuerpos al péptido A-b soluble (incluyendo las formas oligoméricas A-b) pueden no sólo ayudar a detener la progresión de la enfermedad sino también pueden ayudar a mantener la memoria. Estas observaciones preliminares sugieren que las

terapias específicas que se dirigen a más de un mediador de la enfermedad (por ejemplo, A-b y una citosina pro-inflamatoria, tal como TNF) pueden proporcionar incluso una mejor eficacia terapéutica para las enfermedades neurodegenerativas crónicas que las observadas con la localización de un solo mecanismo de enfermedad (por ejemplo, solamente Aβ soluble) (ver Nelson, R.B. (2005) Curr. Pharm. Des. 11: 3335; Klein. W. (2002) Neurochem. Int. 41: 345; Janelsins, M.C. y colaboradores (2005) J. Neuroinflamm. 2: 23; Soloman, B. (2004) Curr. Alzheimer Res. 1: 149; Klyubin, I. y colaboradores (2005) Nat. Med. 11: 556-61; Bornemann, K.D y colaboradores (2001) Am. J. Pathol. 158: 63; Deane, R. y colaboradores (2003) Nat. Med. 9: 907-13; y Masliah, E. y colaboradores (2005) Neuron. 46: 857).

Las moléculas de DVD-Ig de la invención pueden unir uno o más objetivos implicados en las enfermedades neurodegenerativas crónicas, tal como Alzheimer. Tales objetivos incluyen, pero no se limitan a, cualquier mediador, soluble o de superficie celular, implicado en la patogénesis de AD, por ejemplo, AGE (S100 A, amfoterina), citosinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IL-1), quimiocinas (por ejemplo, MCP-1), las moléculas que inhiben la regeneración del nervio (por ejemplo, Nogo, RGM A), y las moléculas que mejoran el crecimiento del neurito (neurotrofinas). La eficacia de las moléculas de DVD-Ig se puede validar en los modelos animales preclínicos, tal como los ratones transgénicos que sobre-expresan la proteína de precursor

amiloide o RAGE y que desarrollan síntomas similares a la enfermedad de Alzheimer. Además, las moléculas de DVD-Ig se pueden construir y probar para determinar la eficacia en los modelos animales, y la mejor DVD-Ig terapéutica se puede seleccionar para el análisis en los pacientes humanos. Las moléculas de DVD-Ig también se pueden utilizar para el tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas, tal como enfermedad de Parkinson. La alfa-sinucleína está implicada en la patología del Parkinson. Una DVD-Ig capaz dirigirse a la alfa-sinucleína y a los mediadores inflamatorios, tal como TNF, IL-1, MCP-1, puede probar ser una terapia eficaz para la enfermedad de Parkinson y se contempla en la invención.

***7.2 Regeneración neuronal y lesión de médula espinal***

A pesar de un aumento en el conocimiento de los mecanismos patológicos, la lesión de médula espinal sigue siendo una condición devastadora y representa una indicación médica caracterizada por una alta necesidad médica. La mayoría de las lesiones de médula espinal son lesiones de contusión o compresión, y la lesión primaria es seguida generalmente por los mecanismos secundarios de lesión (mediadores inflamatorios, por ejemplo, citosinas y quimiocinas) que empeoran lesión inicial y dan lugar a la ampliación significativa del área de lesión, a veces más de diez veces. Estos mecanismos primarios y secundarios en SCI son muy similares a aquellos en la lesión de cerebro causada por otros medios, por ejemplo, accidente cerebrovascular. Ningún

tratamiento satisfactorio existe y la inyección del bolo de alta dosis de metilprednisolona (MP) es la única terapia usada dentro de un periodo de tiempo estrecho de la lesión después de 8 h. Este tratamiento, sin embargo, se piensa solamente para evitar la lesión secundaria sin causar ninguna recuperación funcional significativa. Se critica fuertemente la carencia de la eficacia inequívoca y efectos nocivos severos, como la inmunosupresión con infecciones subsecuentes y alteraciones musculares histopatológicas severas. No existen otros fármacos, compuestos biológicos o moléculas pequeñas, que estimulen el potencial regenerador endógeno que sean aprobados, pero los principios prometedores del tratamiento y candidatos de fármaco han mostrado eficacia en los modelos animales de SCI estos últimos años. La carencia de la recuperación funcional en la SCI humana es causada en gran parte por los factores que inhiben el crecimiento de neurito, en los sitios de lesión, en el tejido de cicatriz, en mielina así como en las células asociadas a la lesión. Tales factores son las proteínas asociadas a la mielina NogoA, OMgp y MAG, RGM A, los CSPG (proteoglicanos de sulfato de condroitina) asociados con la cicatriz y factores inhibitorios en los astrocitos reactivos (algunas semaforinas y efrinas). Sin embargo, en sitio de lesión no sólo se encuentran las moléculas inhibitorias de crecimiento sino también los factores estimulantes de crecimiento de neurito tal como neurotrofinas, laminina, L1 y otros. Este conjunto de moléculas inhibitorias de crecimiento de

neurito y estimulantes de crecimiento de neurito capaz explicar el bloqueo de los factores simples, tal como NogoA o RGM A, dio lugar a la recuperación funcional significativa en modelos roedor de SCI, debido a que una reducción de las influencias inhibitorias podría cambiar el equilibrio de la inhibición de crecimiento y la promoción de crecimiento. Sin embargo, las recuperaciones observadas con el bloqueo de una sola molécula inhibitoria de crecimiento de neurito no fueron completas. Para alcanzar las recuperaciones más rápidas y más pronunciadas puede ser deseable bloquear dos moléculas inhibitorias de crecimiento de neurito, por ejemplo, NogoA y RGM A, o bloquear una molécula inhibitoria de crecimiento de neurito y mejorar las funciones de una molécula de aumento de crecimiento de neurito, por ejemplo, Nogo, y neurotrofinas, o bloquear una molécula inhibitoria de crecimiento de neurito, por ejemplo, Nogo, y una molécula pro-inflamatoria, por ejemplo, TNF, (ver McGee, A. W. y colaboradores (2003) Trends Neurosci. 26: 193; Domeniconi, M. y colaboradores (2005) J. Neurol. Sci. 233: 43; Makwanal, M. y colaboradores (2005) FEBS J. 272: 2628; Dickson, BJ. (2002) Science 298: 1959; Yu, F. and Teng, H. y colaboradores (2005) J. Neurosci. Res. 79: 273; Karnezis, T. y colaboradores (2004) Nature Neurosci. 7: 736; Xu, G. y colaboradores (2004) J. Neurochem. 91: 1018).

En un aspecto, se proporcionan las DVD-Igs capaz de unir los pares de objetivos, tal 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; aggrecan, midcina, neurocan, versican, fosfacan, Te38 y TNF-α; y los anticuerpos específicos al globulómero Aβ combinados con los anticuerpos que promueven la renovación de dendrita y axón. La patología de dendrita 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 Abs (proteínas de mielina) candidatos para SCI. Otros objetivos de DVD-Ig pueden incluir cualquier combinación de NgR-p75, NgR-Troy, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR-Lingo, de Lingo-Troy, Lingo-p75, MAG y Omgp. Además, los objetivos pueden también incluir cualquier mediador, soluble o de superficie de célula, implicado en la inhibición de neurito, por ejemplo, Nogo, Ompg, MAG, RGM A, semaforinas, efrinas, A-b soluble, citosinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IL-1), quimiocinas (por ejemplo, MIP 1a), y las moléculas que inhiben la regeneración de nervio. La eficacia de las moléculas de DVD-Ig anti-nogo/anti-RGM A o similares se puede validar en los modelos animales preclínicos de la lesión de médula espinal. Además, estas moléculas de DVD-Ig se pueden construir y probar para determinar la eficacia en los modelos animales, y la mejor DVD-Ig terapéutica se puede seleccionar para analizar en los pacientes humanos. Además, las moléculas de DVD-Ig se pueden construir para que se dirijan a dos sitios de unión de ligando distintos en un solo receptor, por ejemplo, el receptor Nogo, que une los tres ligandos Nogo, Ompg, y MAG, y

RAGE que une A-b y S100 A. Además, los inhibidores de crecimiento de neurito, por ejemplo, el receptor Nogo-Nogo, también desempeñan una función en la prevención de la regeneración de nervio en las enfermedades inmunológicas tal como esclerosis múltiple. La inhibición de la interacción del receptor Nogo-Nogo ha mostrado mejorar la recuperación en los modelos animales de la esclerosis múltiple. Por lo tanto, las moléculas de DVD-Ig capaz de bloquear la función de un mediador inmunológico, por ejemplo, una citosina, tal como IL-12, y una molécula inhibidora de crecimiento de neurito, por ejemplo, Nogo o RGM, pueden ofrecer una eficacia más rápida y mayor que bloqueando una sola molécula inmune o una sola molécula inhibidora de crecimiento de neurito.

***8. Trastornos oncológicos***

La terapia de anticuerpo monoclonal ha emergido como una modalidad terapéutica importante para el cáncer (von Mehren M, y colaboradores (2003) Annu. Rev. Med. 54: 343-69). Los anticuerpos pueden ejercer efectos antitumorales induciendo la apoptosis, dirigiendo nuevamente la citotoxicidad, interfiriendo con las interacciones de ligando-receptor, o previniendo la expresión de las proteínas que son críticas para el fenotipo neoplásico. Además, los anticuerpos pueden dirigirse a los componentes del microambiente tumoral, alterar las estructuras vitales, tal como la formación de la vasculatura asociada al tumor. Los anticuerpos pueden también dirigirse a los receptores cuyos

ligandos son factores de crecimiento, tal como el receptor de factor de crecimiento epidérmico. El anticuerpo inhibe así los ligandos naturales que estimulan el crecimiento celular a partir de la unión a las células tumorales objetivo. Alternativamente, los anticuerpos pueden inducir una red anti-idiotipo, citotoxicidad mediada por complemento, o una citotoxicidad celular con dependencia de los anticuerpos (ADCC por sus siglas en inglés). El uso del anticuerpo específico dual que se dirige a dos mediadores tumorales separados dará probablemente la ventaja adicional en comparación con una terapia monoespecífica. Las DVD-Igs capaz de unir los siguientes pares de objetivos para tratar la enfermedad oncológica también se contemplan: 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 e IGF1.2; EGFR e IGFIR; 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; EGFR y EGFR; EGFR y DLL-4; EGFR y PLGF; EGFR y RGMa; EGFR y tetános toxoide; VEGF y tetátnos toxoide; tetátnos toxoide y tetátnos toxoide.

En otra modalidad, un DVD de la invención es capaz de unir VEGF y fosfatidilserina; VEGF y ErbB3; VEGF y PLGF; VEGF y ROBO4; VEGF y BSG2; VEGF y CDCPI ; VEGF y ANPEP; VEGF y c-MET; HER-2 y ERB3; HER-2 y BSG2; HER-2 y CDCPI; HER-2 y ANPEP; EGFR y CD64; EGFR y BSG2; EGFR y CDCPI ; EGFR y ANPEP; IGFIR y PDGFR; IGFIR y VEGF; IGFIR 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 NRPI; HGF y fosfatidilserina; ErbB3 y IGFIR; ErbB3 y IGF 1 ,2 ; c-Met y Her-2 ; c-Met y NRP 1 ; c-Met y IGF 1 R; IGF 1 ,2 y PDGFR; IGF 1 ,2 y CD20; IGF1,2 y IGFIR; IGF2 y EGFR; IGF2 y HER2; IGF2 y CD20; IGF2 y VEGF; IGF2 y IGFIR; IGFI y 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 MTSPI ; RON y MSP; RON y CDCPI ; VGFRI y PLGF; VGFRI y RON; VGFRI y EGFR; VEGFR2 y PLGF; VEGFR2 y NRPI ; VEGFR2 y RON; VEGFR2 y DLL4; VEGFR2 y EGFR; VEGFR2 y ROBO4; VEGFR2 y CD55; LPA y SIP; EPHB2 y RON; CTLA4 y VEGF; CD3 y EPCAM; CD40 y IL6; CD40 y IGF; CD40 y CD56; CD40 y CD70; CD40 y VEGFRI; 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 CDI 9; 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; CDI 38 y RANKL; CD33 y FTL3; CD33 y VEGF; CD33 y VEGFR2; CD33 y CD44; CD33 y DR4; CD33 y DR5; DR4 y CD137; DR4 y IGF1,2; DR4 y IGFIR; DR4 y DR5; DR5 y CD40; DR5 y CD137; DR5 y CD20; DR5 y EGFR; DR5 y IGF1,2; DR5 y IGFR, DR5 y HER-2, EGFR y DLL4. Otras combinaciones de objetivos incluyen a uno o más miembros de la familia EGF/erb-2/erb-3. Otros (uno o más) objetivos implicados en las enfermedades oncológicas que las DVD-Igs puede unir incluyen, pero no se limitan a, las seleccionadas 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, IGFI, IGF2, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, INHA, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, VEGF, CDK2, FGF10, FGF18, FGF2, FGF4, FGF7, IGFIR, IL2, BCL2, CD164, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, GNRH1, IGFBP6, IL1A, IL1B, ODZ1, PAWR, PLG, TGFBIII, AR, BRCA1, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, E2F1, EGFR, EN01, 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, GNRHI, IGF1, IGF2, INHA, INSL3, INSL4, PRL, KLK6, SHBG, NR1D1, NR1H3, NR1D, NR2F6, NR4A3, ESR1, ESR2, NR0B1, NR0B2, NR1D2, NR1H2, NR1H4, NR112, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR5A1, NR5A2, NR6A1, PGR, RARB, FGFI1 FGF2, FGF6, KLK3, KRTI, APOCI, BRCAI, CHGA, CHGB, CLU, COL1A1, COL6A1, EGF, ERBB2, ERK8, FGF1, FGFIO, FGF1, 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, COLI8A1, EDG1, ENG, ITGAV, ITGB3, THBS1, THBS2, BAD, BAG1, BCL2, CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CDH1 (E-cadherina), CDKN1B (p27Kipl), 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 integral), 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 lia), TP53, AZGPI (zinc-a-glicoproteína), BPAG1 (plectina), CDKN1A (p21Wap1/Cip1), CLDN7 (claudin-7), CLU (clusterina), ERBB2 (Her-2), FGF1, FLRT1 (fibronectina), GABRP (GABAa), GNAS1, ID2, ITGA6 (a6 integria), ITGB4 (integrina b 4), KLF5 (GC Box BP), KRT19 (Keratina 19), KRTHB6 (ketarina tipo II específica al cabello), MACMARCKS, MT3 (metalotionectina-III), MUCI (mucina), PTGS2 (COX-2), RAC2 (p21Rac2), S100A2, SCGB1D2 (lipofilina B), SCGB2A1 (mamaglobina 2), SCGB2A2 (mamaglobina 1), SPRR1B (Sprl), THBS1, THBS2, THBS4, y

TNFAIP2 (B94), RON, c-Met, CD64, DLL4, PLGF, CTLA4, fosfatidilserina, ROB04, CD80, CD22, CD40, CD23, CD28, CD80, CD55, CD38, CD70, CD74, CD30, CD138, CD56, CD33, CD2, CD137, DR4, DR5, RANKL, VEGFR2, PDGFR, VEGFR1, MTSPI, MSP, EPHB2, EPHA1, EPHA2, EpCAM, PGE2, NKG2D, LPA, SIP, APRIL, BCMA, MAPG, FLT3, PDGFR alfa, PDGFR beta, ROR1, PSMA, PSCA, SCD1, y CD59.

***IV. Composición farmacéutica***

La invención también proporciona las composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de unión de la invención para el uso en, pero sin limitarse a, diagnóstico, detección, o supervisión de un trastorno, en la prevención (por ejemplo, inhibición o retraso del inicio de la enfermedad, trastorno u otra condición), tratamiento, control, o mejoramiento de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, y/o en la investigación. En una modalidad específica, una composición comprende una o más proteínas de unión de la invención. En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende una o más proteínas de unión de la invención y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de las proteínas de unión de la invención para tratar un trastorno. En una modalidad, los agentes profilácticos o terapéuticos son aquellos que son conocidos como útiles o que se han utilizado o utilizan

actualmente en la prevención (por ejemplo, inhibición o retraso del inicio de la enfermedad, trastorno u otra condición), tratamiento, control, o mejoramiento de un trastorno o uno o más síntomas del mismo. De acuerdo con estas modalidades, la composición puede comprender adicionalmente un portador, diluyente o excipiente.

Las proteínas de unión de la invención se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas convenientes para la administración a un sujeto. Comúnmente, la composición farmacéutica comprende una proteína de unión de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Según lo utilizado en la presente, el "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, capas, agentes antibacterianos y antihongos, agentes isotónicos y de retraso de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de portadores 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 modalidades, los agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tal como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio, se incluyen en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades menores de las sustancias auxiliares, tal como agentes humectantes o emulsificantes, conservadores o amortiguadores,

que mejoran la vida útil o eficacia del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Varios sistemas de suministro se conocen y se pueden utilizar para administrar uno o más anticuerpos de la invención o combinación de uno o más anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevenir (por ejemplo, inhibir o retrasar el inicio de la enfermedad, trastorno u otra condición), controlar, tratar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaz de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (ver, por ejemplo, Wu y Wu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432), y construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos para administrar un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero no se limitan a, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral, y adminsitración en la mucosa (por ejemplo, rutas intranasales y orales). Además, la administración pulmonar puede ser utilizada, por ejemplo, por medio de un inhalador o nebulizador y una formulación con un agente aerosolizante. Ver, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas 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 las

Publicaciones PCT Nos. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903. En una modalidad una proteína de unión de la invención, terapia de combinación, o una composición de la invención se administra usyo la tecnología de suministro de fármaco pulmonar de Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, MA). En una modalidad específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran de manera intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar, o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar por cualquier ruta conveniente, por ejemplo por infusión o inyección de bolo, absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En una modalidad específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención localmente al área que necesita el tratamiento; esto se puede lograr mediante, por ejemplo, y sin limitarse a, infusión local, inyección, o por medio de un implante, el implante es de un material poroso o no poroso, que incluye membranas y matrices, tal como membranas silásticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel®), o matrices de colágeno. En una modalidad, una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos antagonistas de la invención se administra localmente al área afectada de un sujeto

para prevenir, tratar, controlar, y/o mejorar un trastorno o síntoma del mismo. En otra modalidad, una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la invención se administra localmente al área afectada en combinación con una cantidad eficaz de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintas de una proteína de unión de la invención en un sujeto para prevenir, tratar, controlar, y/o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

En otra modalidad, el agente profiláctico o terapéutico se puede suministrar en un sistema de liberación controlada o continua. En una modalidad, una bomba se puede utilizar para lograr la liberación controlada o continua (ver Langer, supra; Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 20; Buchwald y colaboradores (1980) Surgery 88: 507; Saudek y colaboradores (1989) N. Engl. J. Med. 321: 574). En otra modalidad, los materiales poliméricos se pueden utilizar para lograr la liberación controlada o continua de las terapias de la invención (ver por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design y Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger y Peppas (1983) J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; ver también Levy y colaboradores (1985) Science 228: 190; During y colaboradores (1989) Ann. Neurol. 25: 351; Howard y colaboradores (1989) J. Neurosurg. 71: 105); las Patentes Norteamericanas Nos.

5,679,377; 5, 916,597; 5,912,015; 5,989,463; y 5,128,326; y las Publicaciones PCT Nos. WO 99/15154; WO 99/20253. Los ejemplos de los polímeros usados en las formulaciones de liberación continua incluyen, pero no se limitan a, poli(methacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etilen-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicolidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinolpirrolidona), poli(alcohol de vinilo), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilácticos (PLA), poli(láctido-co-glicolidos) (PLGA), y poliortoésteres. En una modalidad, el polímero usado en una formulación de liberación continua es inerte, libre de impurezas susceptibles a lixiviación, estable en almacenamiento, estéril, y biodegradable. En aún otra modalidad, un sistema de liberación controlada o continua se puede poner en la proximidad del objetivo profiláctico o terapéutico, requiriendo así solamente una fracción de dosis sistémica (ver, por ejemplo, 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). Cualquier técnica conocida por un experto en la técnica se puede utilizar para producir las formulaciones de liberación continua que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Ver, por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 4,526, 938; Publicaciones PCT Nos. WO 91/05548; WO 96/20698, Ning y

colaboradores (1996) Radiotherap. Oncol. 39: 179-189; Song y colaboradores (1995) PDA J. Pharma. Sci. Tech. 50:372-397; Cleek y colaboradores (1997) Pro. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Matter. 24: 853-854, y Lam y colaboradores (1997) Proc. Intl. Symp. Control Rel. Bioact. Matter. 24:759-760, cada una de las cuales está incorporada por referencia en la presente en su totalidad.

En una modalidad específica, donde la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, construyéndola como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándola de modo que llegue a ser intracelular, por ejemplo, por medio de un vector retroviral (ver Patente Norteamericana No. 4,980,286), o por inyección directa, o por medio de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Du Pont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie de célula o agentes de transfección, o administrándose ligado al péptido de tipo homeosecuencia, que se conoce por ingresar al núcleo (ver, por ejemplo, Joliot y colaboradores (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868). Alternativo, un ácido nucleico se puede introducir de manera intracelular e incorporar dentro del ADN de célula hospedadora para la expresión por recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su ruta de administración prevista. Los ejemplos de rutas de administración incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucósica, y rectal. En una modalidad específica, la composición se formula de acuerdo con los procedimientos rutinarios como composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal, o tópica a los humanos. Comúnmente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. En caso necesario, la composición puede también incluir un agente de solubilización y un anestésico local, tal como lidocaína, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la invención son las que se administrarán de manera tópica, las composiciones se pueden formular en forma de ungüento, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, rocío, aerosol, solución, emulsión, u otra forma bien conocida por un experto en la técnica. Ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences y Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). En una modalidad para las formas de dosificación tópicas no rociables, se utilizan las formas vicosas a semisólidas o sólidas que comprenden un portador o uno o más excipientes

compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica mayor que el agua. Las formulaciones convenientes incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas, y similares, tal como los que son, si se deseada, esterilizados o mezclados con los agentes auxiliares (por ejemplo, conservadores, estabilizadores, humectantes, amortiguadores, o sales) para afectar varias características, por ejemplo, presión osmótica. Otras formas de dosificación tópicas convenientes incluyen preparaciones en aerosol rociables en donde el ingrediente activo, en una modalidad, en combinación con un portador inerte sólido o líquido, se empaqueta en una mezcla con un compuesto volátil presurizado (por ejemplo, un propulsor gaseoso, tal como freón) o en una botella comprimible. Las cremas hidratantes o humectantes también se pueden agregar a las composiciones y formas de dosificación farmacéuticas si se desea. Los ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si el método de la invención comprende la administración intranasal de una composición, la composición se puede formular en una forma de aerosol, roció, niebla o en forma de gotas. Particularmente, los agentes profilácticos o terapéuticos para el uso de acuerdo con la invención se pueden suministrar convenientemente en forma de presentación de rocío en aerosol de los paquetes presurizados o de un nebulizador, con el uso de

un propulsor conveniente (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas conveniente). En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede ser determinada proporcionyo una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos (integrados mediante, por ejemplo, gelatina) para el uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para contener una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo conveniente, tal como lactosa o almidón.

Si el método de la invención comprende la administración oral, las composiciones se pueden formular oralmente en forma de tabletas, cápsulas, prestigios, obleas, soluciones, suspensiones, y similares. Las tabletas o cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con los excipientes farmacéuticamente aceptables, tal como agentes astringentes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polividona, o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, o calcio-hidrógeno-fosfato); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de papa o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, sodio-lauril-sulfato). Las tabletas se pueden recubrir por los métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden llevar la forma de, pero sin limitarse, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden ser presentadas

como producto seco para la constitución con agua u otro vehículo conveniente antes de usarse. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con los aditivos farmacéuticamente aceptables, tal como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsificantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados); y conservadores (por ejemplo, metilo o propol-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones pueden también contener sales amortiguadoras, saborizantes, colorantes, y edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para la administración oral se pueden formular convenientemente para la liberación lenta, liberación controlada, o liberación continua de un agente profiláctico o terapéutico.

El método de la invención puede comprender la administración pulmonar, por ejemplo, por medio de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente aerosolizante. Ver, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas 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 las Publicaciones PCT Nos. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903. En una modalidad específica, una proteína de unión de la invención, terapia de combinación, y/o composición de la invención se administra usyo la tecnología de suministro de

fármaco pulmonar de Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, MA).

El método de la invención puede comprender la administración de una composición formulada para la administración parenteral por inyección (por ejemplo, por inyección de bolo o infusión continua). Las formulaciones para la inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o envases de múltiples dosis) con un conservador agregado. Las composiciones pueden tomar las formas tal como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener a agentes de formulación, tal como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo conveniente (por ejemplo, agua libre de pirógenos estériles) antes de usarse.

Los métodos de la invención pueden comprender además la administración de las composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con los materiales poliméricos o hidrofóbicos convenientes (por ejemplo, como emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles (por ejemplo, como sal poco soluble).

Los métodos de la invención comprenden la administración de las composiciones formuladas como formas neutrales o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con los aniones, tal como los derivados de los ácidos clorhídricos, fosfóricos, acéticos, oxálicos, y tartáricos, etc., y los formados con los cationes, tal como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, etanol de 2-etilamino, histidina, y procaína, etc.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones se suministran por separado o se mezclan juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un envase sellado herméticamente, tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Donde el modo de administración es infusión, la composición se puede distribuir con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Donde el modo de administración es por inyección, una ampolla de agua estéril para la inyección o solución salina se puede proporcionar de modo que los ingredientes puedan ser mezclados antes de la administración.

Particularmente, la invención también proporciona uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o una composición farmacéutica de la invención, que son empaquetados en un envase sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de agente. En una modalidad, uno o

más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o una composición farmacéutica de la invención, se suministran como un polvo liofilizado seco esterilizado o concentrado sin agua en un envase sellado herméticamente y se pueden reconstituir (por ejemplo, con agua o solución salina) a la concentración apropiada para la administración a un sujeto. En una modalidad, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención se suministran como polvo liofilizado estéril seco en un envase sellado herméticamente en una dosificación unitaria de por lo menos 5 mg, por lo menos 10 mg, por lo menos 15 mg, por lo menos 25 mg, por lo menos 35 mg, por lo menos 45 mg, por lo menos 50 mg, por lo menos 75 mg, o por lo menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados, o composiciones farmacéuticas de la invención, de deben almacenar a entre 2°C y 8°C en sus envases originales y los agentes profilácticos o terapéuticos, composiciones farmacéuticas de la invención, se deben administrar en un periodo de 1 semana, por ejemplo, en un periodo de 5 días, en un periodo de 72 horas, en un periodo de 48 horas, en un periodo de 24 horas, en un periodo de 12 horas, en un periodo de 6 horas, en un periodo de 5 horas, en un periodo de 3 horas o en un periodo de 1 hora después de reconstituirse. En una modalidad alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención se suministran en forma líquida en un envase sellado

herméticamente que indica la cantidad y concentración del agente. En una modalidad la forma líquida de la composición administrada se suministra en un envase sellado herméticamente a una concentración de por lo menos 0.25 mg/ml, por lo menos 0.5 mg/ml, por lo menos 1 mg/ml, por lo menos 2.5 mg/ml, por lo menos 5 mg/ml, por lo menos 8 mg/ml, por lo menos 10 mg/ml, por lo menos 15 mg/kg, por lo menos 25 mg/ml, por lo menos 50 mg/ml, por lo menos 75 mg/ml o por lo menos 100 mg/ml. La forma líquida se debe almacenar a entre 2°C. y 8°C. en su envase original.

Las proteínas de unión de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica conveniente para la administración parenteral. En una modalidad, el anticuerpo o porciones de anticuerpo, será preparado como solución inyectable que contiene 0.1-250 mg/ml de proteína de unión. La solución inyectable se puede componer de un líquido o forma de dosificación liofilizada en un frasco del pedernal o ámbar, ampolla o jeringa llenada previamente. El amortiguador puede L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a pH 5.0 a 7.0 (óptimamente pH 6.0). Otros amortiguadores convenientes incluyen, pero no se limitan a, succcinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. El cloruro de sodio se puede utilizar para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Los crioprotectores pueden ser incluidos para una forma

de dosificación liofilizada, principalmente 0-10% de sucrosa(óptimamente 0.5-1.0%). Otros crioprotectores convenientes incluyen trehalosa y lactosa. Los agentes volumétricos pueden ser incluidos para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 1-10% de manitol (óptimamente 2-4%). Los estabilizadores se pueden utilizar en las formas de dosificación líquidas y liofilizadas, principalmente 1-50 mM de L-Metionina (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes volumétricos convenientes incluyen glicina y arginina, cualquiera de los cuales puede ser incluido a una concentración de 0-0.05%, y polisorbato-80 (incluido óptimamente a una concentración de 0.005-0.01%). Los tensioactivos adicionales incluyen, pero no se limitan a, los tensioactivos polisorbato 20 y BRIJ. La composición farmacéutica que comprende las proteínas de unión de la invención preparada como solución inyectable para la administración parenteral puede comprender adicionalmente un agente útil como coadyuvante, tal como los usados para aumentar la absorción, o dispersión de una proteína terapéutica (por ejemplo, anticuerpo). Un adyuvante particularmente útil es hialuronidasa, tal como Hilenex® (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana después de la administración parenteral, particularmente administración subcutánea. También permite mayores volúmenes de sitio de inyección (es decir, mayor de 1 ml) con menos dolor y malestar, y la incidencia mínima de las reacciones del sitio de

inyección (ver la Publicación PCT No. WO 2004/078140, y la Publicación de Patente Norteamericana No. 2006/104968 incorporada en la presente por referencia).

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, las formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tal como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma elegida depende del modo de administración y uso terapéutico previstos. Las composiciones comunes están en forma de soluciones inyectables o infusibles, tal como composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de humanos con otros anticuerpos. El modo de administración elegido es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una modalidad, el anticuerpo es administrado por infusión o inyección intravenosa. En otra modalidad, el anticuerpo es administrado por la inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas comúnmente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura solicitada conveniente a alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables pueden ser preparadas incorporyo el compuesto activo (es decir, anticuerpo o porción de anticuerpo)

en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados en la presente, según sea necesario, seguido por la esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones son preparadas incorporyo el compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados en la presente. En el caso de los polvos estériles liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y secado por aspersión que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución estéril previamente filtrada del mismo. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede ser causada incluyendo, en la composición, un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las proteínas de unión de la invención se pueden administrar por una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, en una modalidad, la ruta/modo de administración son inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como será apreciado por el experto en la técnica, la ruta y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados

deseados. En ciertas modalidades, el compuesto activo se puede preparar con un portador que proteja el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microcapsulados. Los polímeros biodegradables, biocompatibles se pueden utilizar, tal como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones se patentan o conocen generalmente por los expertos. Ver, por ejemplo, Sustained y Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

En ciertas modalidades, una proteína de unión de la invención se puede administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se deseado) también se puede incluir en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blya, comprimido en tabletas, o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos se pueden incorporar con los excipientes y utilizar en forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto de la invención una administración distinta a la administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para prevenir su desactivación.

Los compuestos activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones. En ciertas modalidades, una proteína de unión de la invención es coformulada con y/o coadministrada con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar los trastornos con una proteína de unión de la invención. Por ejemplo, una proteína de unión de la invención se puede coformular y/o coadministrar con uno o más anticuerpos adicionales que unen otros objetivos (por ejemplo, los anticuerpos que unen otras citosinas o que unen las moléculas de superficie de célula). Además, uno o más anticuerpos de la invención se pueden utilizar en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evityo así las toxicidades o complicaciones posibles asociadas a varias monoterapias.

En ciertas modalidades, una proteína de unión se liga a un vehículo de extensión de vida media conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio Fc, polietilenglicol, y dextrano. Tales vehículos se describen, por ejemplo, en Patente Norteamericana No. 6,660,843 y Publicación PCT Publicada No. WO 99/25044, las cuales están incorporadas en la presente por referencia para cualquier propósito.

En una modalidad específica, las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de unión de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico de la invención se administran para tratar,

prevenir, controlar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo por terapia genética. La terapia genética se refiere a la terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta modalidad 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 genética disponibles en la técnica se pueden utilizar de acuerdo con la invención. Para las revisiones generales de los métodos de terapia genética, ver Goldspiel y colaboradores (1993) Clin. Pharm. 12: 488-505; Wu y Wu (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev (1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan (1993) Science 260: 926-932; y Morgan y Yerson (1993) Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; mayo (1993) TIBTECH 11(5): 155-215. Los métodos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden utilizar se describen en Ausubel y colaboradores (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer y Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990). Las descripciones detalladas de varios métodos de terapia genética se describen en la Publicación de Patente Norteamericana No. 20090297514, la cual está incorporada en la presente por referencia.

Las proteínas de unión de la presente invención son útiles para tratar varias enfermedades en donde los objetivos que son

reconocidos por las proteínas de unión son nocivos. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriática, artritis reactiva, espondiloartropatía eritematosis sistémica de lupus, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de intestino inflamatoria, diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, escleroderma de dermatitis, enfermedad del injerto contra el huésped, rechazo de trasplante de órgano, enfermedad inmuno crónica o aguda asociada al trasplante de órgano, sarcoidosis, ateroesclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome crónico de fatiga, granulomatosis de Wegener, purpurea de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveitis, shock séptico, síndrome de shock tóxico, síndrome de sepsia, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parásitas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversal aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, infarto, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, malignidades, paro cardíaco, infarto del miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglyular tipo I y deficiencia poliglyular tipo II, esporádica, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria (aguda) adulto, alopecia, areata, artropatía seronegativo, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriática, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropatica,

clamidia, artropatía asociada a la salmonella y yersinia, espondiloartopatía, enfermedad alteromatosa/arteriosclerasis, alergia atópica, enfermedad bullar autoinmune, pénfigo vulgaris, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad lineal de IgA, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica positiva de Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad de Royal Free, cyidiasis mucocutánea crónica, arteritis gigante de la célula, hepatitis esclerótica primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, Síndrome de la Enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida, Enfermedades Relacionadas con la Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogammglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, falla ovárica, falla ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosis criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial poste-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada a la enfermedad del tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada con la enfermedad del tejido conectivo mezclado, enfermedad pulmonar intersticial asociada esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada a la artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada eritematosa de lupus sistémico, enfermedad pulmonar asociada con la dermatomiositis/ polimiositis, enfermedad pulmonar asociada con la enfermedad de Sjogren, enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar difusa vasculítica,

enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial fármaco-inducida, fibrosis, fibrosis de radiación, bronquilitis obliterante, pulmonía eosinófila crónica, enfermedad pulmonar infiltrativa linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial post-infecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo 1 (hepatitis lupoide o autoinmune clásica), hepatitis autoinmune tipo-2 (hepatitis del anticuerpo anti-LKM), hipoglucemia mediada autoinmune, resistencia a la insulina tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con el trasplante de órgano, enfermedad inmune crónica asociada con el trasplante de órgano, osteoartrosis, colangitis esclerótica primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2, leucopaenia idiopático, neutropaenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de lyme, eritematosa de lupus discoide, infertilidad idiopática masculina o NOS, autoinmunidad del esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpatética, hipertensión pulmonar secundaria a la enfermedad del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjórgren, enfermedad de Takayasu/ arteritis, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopático, enfermedad de tiroides autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixoedema primario, uveitis

facogénica, vasculitis primaria, enfermedad del hígado aguda de vitiligo, enfermedades del hígado crónicas, cirrosis alcohólica, lesión del hígado inducida por alcohol, coleosatatis, enfermedad del hígado idiosincrásica, hepatitis fármaco-inducida, Esteatohepatitis sin alcohol, alergia y asma, infección por estreptococos grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediantes tipo Th2 y tipo Th1, dolor crónico y agudo (diferentes formas de dolor), y cánceres tales como pulmonar, mama, estómago, vejiga, biliar, páncreas, ovárica, cáncer de próstata y rectal y malignidades hematopoyéticas (leucemia y linfoma), Abetalipoprotemia, Acrocianosis, procesos parásito o infecciosos agudos y crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, deficiencia renal aguda, adenocarcinomas, ritmos ectópico acrial, demencia compleja por SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis por contacto alérgico, rinitis alérgica, rechazo aloinjerto, deficiencia antitripsina alfa-1, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de la célula del cuerno anterior de la médula, terapia anti cd3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, ancurismas periféricos, desección aórtica, hipertensión arterial, arteriosclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación atrial (continua o paroxismal), aleteo atrial, bloqueo auriculoventricular, linfoma de la célula B, rechazo de injerto de hueso, rechazo de

trasplante de médula (BMT), bloqueo de rama, linfoma de Burkitt, quemaduras, arritmias cardiacas, síndrome de parálisis cardiaco, tumores cardiacos, cardiomiopatía, respuesta por inflamación de bypass cardiopulmonar, rechazo al trasplante de cartílago, degeneraciones corticales cerebelosas, trastornos cerebelosos, taquicardia atrial multifocal o caótica, trastornos asociados con la quimioterapia, leucemia mielocítica crómica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructora crónica (COPD), intoxicación crónica de salicilato, carcinoma colorrectal, paro cardíaco congestivo, conjuntivitis, dermatitis de contacto, cor pulmonale, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, cultivo de sepsia negativo, fibrosis cistíca, trastornos asociados con la terapia de citocinas, Demencia pugilistica, enfermedades desmielizantes, fiebre hemorrágica de dengue, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad aterosclerosis diabética, enfermedad difusa corporal de Lewy, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos de los ganglios básicos, Síndrome Down en edad media, trastornos de movimiento inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina CNS, sensibilidad al fármaco, eczema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección del virus Epstein-Barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y cerebelosos, limfohistiocitosis hematofagocítica familiar, rechazo al implante timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos arteriales periféricos

funcionales, sepsia fungicida, gangrena de gas, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, sepsia gramnegativa, sepsia grampositiva, granulomas debido a los organismos intracelulares, leucemia de célula melenuda, enfermedad de Hallerrorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre de heno, rechazo de trasplante de corazón, hemacromatosis, hemodialisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias vasculares por haz de His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimiento hipercinéticos, reacciones hipersensitivas, neumonitis hipersensitiva, hipertensión, trastornos de movimiento hipocinéticos, evaluación del eje suprarrenal hipotalámico-pituitario, enfermedad idiopática de Addison, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpo, Astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza, exposición de radiación por ionización, iridociclitis/uveitis/neuritis óptica, lesión por isquemia-reperfusión, accidente cerebrovascular isquémico, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo de trasplante de riñón, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticospinal, lipedema, rechazo de trasplante de hígado, linfedema, malaria, linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococcemia, metabólico/idiopático, migraña, trastorno multisistema mitocondrial, enfermedad del tejido conectivo mezclada, gamopatía monoclonal,

mieloma múltiple, degeneraciones de los sistemas múltiples (Mencel Dejerine - Thomas Shi-Drager y Machado - Joseph), miastenia gravis, mycobacterium intracellulare aviaria, tuberculosis mycobacterium, síndrome mielodisplástico, infarto del miocardio, trastornos isquémicos del miocardio, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofias musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma non-Hodgkins, obstrucción de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos arteriales oclusivas, terapia okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos reversivos de orquitis/vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo del trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad, rechazo de trasplante paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad pericardial, enfermedad arterioesclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía por pneumocystis carinii, síndrome de POEMS (síndrome de polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y cambios de piel), síndrome de post-perfusión, síndrome de complicación de derivación cardiopulmonar, síndrome de cardiotomía post-MI, preeclampsia, parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, radioterapia, fenómeno y enfermedad, enfermedad y fenómeno de Raynoud, enfermedad de Refsum, taquicardia estrecho regular QRS, hipertensión renovascular, lesión

de reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, Demencia Senil tipos Cuerpos de Lewy, artropatías seronegativas, choque, anemia de células falciformes, rechazo aloinjerto de piel, síndrome de cambios de piel, rechazo al trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelosas, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerótica subaguda, Síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxis sistémica, síndrome de la respuesta sistémica inflamatoria, artritis reumatoide de inicio sistémico juvenil, T-celular o FAB ALL, Telangiectasia, tromboangitis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, trauma/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades cardíacas valvulares, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fungicidas, encefalitis vital/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico asociado-vital, Síndrome de Wernicke-Korsakoff, enfermedad de Wilson, y rechazo del xenoinjerto de cualquier órgano o tejido (ver la Publicación PCT Nos. WO 2002/097048; WO 95/24918, y WO 00/56772).

Las proteínas de unión de la presente invención se pueden utilizar para tratar a humanos que sufren de enfermedades autoinmunes, particularmente las asociadas con la inflamación, incluyendo, artritis reumatoide, espondilitis, alergia, diabetes

autoinmune, uveitis autoinmune. En una modalidad las proteínas de unión de la presente invención, o porciones de unión de antígeno del mismo, se utilizan para tratar artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de insulina, y psoriasis.

En una modalidad las enfermedades capaz de tratarse o diagnosticadas con las composiciones y métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a cánceres primarios y metastáticos que incluyen carcinomas de mama, colon, recto, pulmón, orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula biliar y conductos biliares, intestino delgado, tracto urinario (que incluye riñón, vejiga y urotelio), tracto genital femenino (que incluye cerviz, útero, y ovarios así como enfermedad de coriocarcinoma y trofoblástica gestacional), tracto genital masculino (que incluye tumores de próstata, vesículas seminales, testículos y célula de germen), glándulas endocrinas (que incluyen tiroides, glándulas suprarrenales, y glándulas pituitarias), y piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (que incluyen los que se originan del hueso y tejidos suaves así como el sarcoma de Kaposi), tumores cerebrales, nervios, ojos, y meninges (que incluyen astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, Schwannomas, y meningiomas), tumores sólidos que se originan de malignidades hematopoyéticas tales como leucemias, y linfomas (linfomas de Hodgkin y non-Hodgkin).

En una modalidad los anticuerpos de la presente invención, o porciones de unión de antígeno de los mismos, se utilizan para tratar el cáncer o inhibir metástasis de los tumores descritos en la presente, ya sea cuyo se utilizan solos o en combinación con la radioterapia y/o otros agentes quimioterapéuticos.

Los anticuerpos de la presente invención, o porciones de unión de antígeno de los mismos, se pueden combinar con los agentes que incluyen, pero no se limitan a, agentes antineoplásticos, radioterapia, quimioterapia, tal como agentes de alquilación de ADN, cisplatino, carboplatino, agentes anti-tubulina, paclitaxel, docetaxel, taxol, doxorubicina, gemcitabina, gemzar, antraciclinas, adriamicina, inhibidores de topoisomerasa I, inhibidores del topoisomerasa II, 5-fluorouracil (5-FU), leucovorina, irinotecán, inhibidores del receptor de tirosina cinasa (por ejemplo, erlotinib, gefitinib), inhibidores COX-2 (por ejemplo, celecoxib), inhibidores de la cinasa, y siARNs.

Una proteína de unión de la presente invención también puede administrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles en el tratamiento de varias enfermedades.

Una proteína de unión de la presente invención se puede utilizar sola o en combinación para tratar tales enfermedades. Deberá entenderse que las proteínas de unión pueden utilizarse solas o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, agente terapéutico, el agente adicional que es seleccionado por el experto para su propósito deseado. Por ejemplo, el agente adicional

puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica que es útil para tratar la enfermedad o condición que se trata por el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que imparte una cualidad beneficiosa a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que afecte a la viscosidad de la composición.

Deberá entenderse adicionalmente que las combinaciones, que deberán incluirse dentro de la presente invención, son las combinaciones útiles para su propósito deseado. Los agentes establecidos más abajo son ilustrativos y no se desean para ser limitados. Las combinaciones, que son parte de esta presente invención, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y por lo menos un agente adicional seleccionado de las listas más abajo. La combinación puede también incluir más de un agente adicional, por ejemplo, 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 fármacos antiinflamatorios no-esteroidales, también se refieren a NSAIDS, que incluyen los fármacos como ibuprofeno. Otras combinaciones son corticoesteroides que incluyen prednisolona; los efectos secundarios bien conocidos del uso de esteroides puede reducirse o incluso eliminarse disminuyendo la dosis de esteroide requerida al tratar a pacientes en combinación con el DVD Igs de esta presente invención. Sin limitar los ejemplos

de los agentes terapéuticos para la artritis reumatoide con la cual un anticuerpo, o porción del anticuerpo, de la presente invención puede combinarse incluye lo siguiente: fármacos antiinflamatorias supresivos de citocinas; anticuerpos para o antagonistas de otras citocinas o factores de crecimiento humanos, 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, de interferonas, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Las proteínas de unión de la presente invención, o las porciones de unión de antígeno de las mismas, pueden combinarse con anticuerpos en moléculas de células superficiales, tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, y CTLA, o sus ligandos incluyendo CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones de agentes terapéuticos pueden interferir en diferentes puntos en la cascada inflamatoria autoinmune y subsecuente; los ejemplos incluyen antagonistas TNF como anticuerpos TNF humanizados o humanos, quiméricos, ADALIMUMAB, (Publicación de PCT No. WO 97/29131), CA2 (Remicade™), CDP 571, y receptores TNF p55 o p75 solubles, derivados, de los mismos, (p75TNFR1gG (Enbrel™) o p55TNFRIgG (Lenercept), y también los inhibidores de enzima de conversión de TNFα (TACE); similarmente los inhibidores de enzima de conversión IL-1 (inhibidores de conversión Interleucina-1, IL-1RA etc.) pueden ser eficaces por la misma razón. Otras combinaciones incluyen Interleucina 11. Incluso otra combinación incluye protagonistas

clave de la respuesta autoinmune, los cuales pueden actuar paralelos a, dependientes de, o en concierto con, la función IL 12, especialmente los antagonistas IL-18 que incluyen anticuerpos IL-18, receptores IL-18 solubles, y proteínas de unión IL-18. Se ha mostrado que IL-12 e IL-18 tienen traslape pero distintas funciones y una combinación de antagonistas para ambos puede ser más eficiente. Incluso otra combinación es los inhibidores anti-CD4 no agotados. Incluso otras combinaciones incluyen antagonistas de la trayectoria co-estimulatoria CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) que incluye anticuerpos, receptores solubles, y ligandos antagónicos.

Las proteínas de unión de la presente invención también pueden combinarse con agentes, tales como metotrexato, 6-MP, sulfasalazina de azatioprina, mesalazina, olsalazina cloroquinina/hidroxicloroquina, pencilamina, aurotiomalato (intramuscular y oral), azatioprina, colcichina, corticoesteroides (inyección oral, inhalada y local), agonistas beta-2-adrenorreceptores (salbutamol, terbutalina, salmeteral), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromil, ketotifeno, ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, mofetil de micofenolato, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticoesteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adensosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por, citocinas antiinflamatorias, tales como TNF-αor-IL-1 (por ejemplo,

inhibidores de cinasa IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP), inhibidores de enzima de conversión IL-1β, inhibidores de enzima de conversión TNFα (TACE), inhibidores de señalización de célula-T, tales como los inhibidores de cinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima de conversión a angiotensina, receptores de citocinas solubles y derivados de los mismos (por ejemplo receptores TNF p75 o p55 solubles y los derivativos p75TNFRIgG (Enbrel™ y p55TNFRIOgG (Lenercept), sIL-1RI, sIL-1RII, y sIL-6R), citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ), celecoxib, ácido fólico, sulfato de hidroxicloroquina, rofecoxib, etanercept, infliximab, naproxeno, valdecoxib, sulfasalazina, metilprednisolona, meloxicam, acetato de metilprednisolona, tiomalato sódico de oro, aspirina, acetónido de triamcinolona, propoxifeno napsilato/apap, folato, nabumetona, diclofenaco, piroxicam, etodolac, diclofenaco sódico, oxaprozina, hcl de oxicodona, hidrocodona bitartrato /apap, diclofenaco sódico/misoprostol, fentanilo, anakinra, recombinante humano, hcl de tramadol, salsalato, sulindac, cianocobalamina/fa/piridoxina, acetaminofen, alendronato sódico, prednisolona, sulfato de morfina, clorhidrato de lidocaína, indometacina, sulf/condroitina de glucosamina, hcl de amitriptilina, sulfadiazina, oxicodona/acetaminofen, hcl de olopatadina, misoprostol, naproxeno sódico, 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 reumatoide moderados o severos, ciclosporina.

Agentes adicionales no limitantes, los cuales también pueden utilizarse en combinación con una proteína de unión para tratar artritis reumatoide incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: fármacos antiinflamatorios no esteroidales (NSAIDs); fármacos antiinflamatorios supresivos de citocinas (CSAIDs); CDP-571/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNFα humanizado; Celltech/Bayer); cA2/infliximab (anticuerpo anti-TNFα quimérico; Centocor); 75 kdTNFR-IgG/etanercept (proteína de fusión del receptor-IgG 75 kD TNF; Immunex; ver por ejemplo, (1994) Arthr. Rheum. 37: S295; (1996) J. Invest. Med. 44:235A); 55 kdTNF-IgG (proteína de fusión del receptor-IgG 55 kD TNF; Hoffmann-La Roche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (anticuerpo anti-CD4 primatizado sin agotar; IDEC/SmitKline; ver por ejemplo, (1995) Arthr. Rheum. 38: S185); DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteínas de fusión IL-2; Seragen; ver por ejemplo, (1993) Arthrit. Rheum. 36:1223); Anti-Tac (anti-IL-2Rα humanizado; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (citocina antiinflamatoria; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante, citocinas antiinflamatoria; DNAX/Schering); IL-4; agonistas; IL-10 y/o agonistas IL-4 (por ejemplo, anticuerpos agonistas); IL-1RA (antagonista receptor IL-1; Synergen/Amgen); anakinra (Kineret®/Amgen); TNF-bp/s-TNF

(proteína de unión TNF soluble; ver por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento)): S284; (1995) Amer. J. Phisiol. – Heart and Circ. Physiol. 268:37-42); R973401 (inhibidor Tipo IV fosfodiesterasa; ver por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S282); MK-966 (inhibidor COX-2; ver por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S81); Iloprost (ver por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S82); metotrexato; talidomida (ver por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39 (9 (suplemento): S282) y fármacos relacionados con la talidomida (por ejemplo, Celgen); leflunomida (inhibidor de citocinas y antiinflamatorio; ver por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S131; (1996) Inflamm. Res. 45:103 - 107); ácido tranexámico (inhibidor de la activación plasminógena; ver por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S284); T-614 (inhibidor de citocinas; ver por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S282); prostaglandina E1 (ver por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S282); Tenidap (fármaco antiinflamatorio no esteroidal; ver por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S280); Naproxeno (fármaco antiinflamatorio no esteroidal; ver por ejemplo, (1996) Neuro. Report 7:1209 - 1213); Meloxicam (fármaco antiinflamatorio no esteroidal); Ibuprofeno (fármaco antiinflamatorio no esteroidal); Piroxicam (fármaco antiinflamatorio no esteroidal); Diclofenaco (fármaco antiinflamatorio no esteroidal); Indometacina (fármaco antiinflamatorio no esteroidal); Sulfasalazina (ver por ejemplo,

(1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S281); Azatioprina (ver por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S281); inhibidor ICE (enzima de conversión inhibidora de la enzima interleucina-1β); inhibidor zap-70 y/o 1ck (inhibidor de la cinasa de tirosina zap-70 o lck); inhibidor VEGF y/o inhibidor VEGF-R (inhibidores del factor de crecimiento celular endotelial vascular o del receptor del factor de crecimiento celular endotelial vascular; inhibidores de angiogénesis); fármacos antiinflamatorios corticoesteroides (por ejemplo, SB203580); inhibidores convertasa-TNF; anticuerpos anti-IL-12; anticuerpos anti-IL-18; interleucina-11 (véase por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S296); interleucina-13 (ver por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S308); inhibidores de interleucina-17 (ver por ejemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S120); oro; penicilamina; cloroquina; clorambucil; hidroxicloroquina; ciclosporina; ciclofosfamida; irradiación linfoide total; globulina anti-timocito; anticuerpos anti-CD4; toxinas-CD5; péptidos y colágenos administrados oralmente; disodio lobenzarit; Agentes de Regulación de Citocinas (CRAs) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); oligo-deoxinucleotidos fosforotioato antisentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor de complemento soluble 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteina; polisulfato de glicosaminoglican; minociclina; anticuerpos anti-IL2R; lípidos marinos y botánicos (ácidos grasos de la semilla de peces y plantas; ver por ejemplo,

DeLuca y colaboradores (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); cladribine (2-clorodeoxiadenosina); metotrexato; inhibidores bcl-2 (ver Bruncko, M. y colaboradores (2007) J. Med. Chem. 50(4): 641-662); y agentes de modulación inmune y antivirales.

En una modalidad la proteína de unión, o porción de unión de antígeno de la misma, se administra en combinación con uno de los siguientes agentes para el tratamiento de artritis reumatoide: inhibidor molecular pequeño de KDR, inhibidor molecular pequeño 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 sódico de oro; aspirina; azatioprina; acetónido de triamcinolona; propxifeno napsilato/apap; folato; nabumetona; diclofenaco; piroxicam; etodolac; diclofenaco sódico; oxaprozina; hcl de oxicodona; bitartrato/apap de hidrocodona; declofenaco sódico/misoprostol; fentanilo; anakinra, recombinante humano; hcl de tramadol; salsalato; sulindac; cianocobalamina/fa/piridoxina; acetaminofeno; alendronato sódico; prednisolona; sulfato de morfina; clorhidrato de lidocaína; indometacina; sulfato de glucosamina

/condroitina; ciclosporina; hcl de amitriptilina; sulfadiazina; oxicodona/acetaminofeno; hcl de olopatadina; misoprostol; naproxeno sódico; omeprazol; mofetil micofenolato; 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.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la enfermedad inflamatoria intestinal con los cuales una proteína de unión de la presente invención puede combinarse incluyen los siguientes: budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticoesteroides; ciclosporina; sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipooxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas del receptor IL-1; mAbs anti-IL-IβmAbs anti-IL-6mAbs; factores de crecimiento; inhibidores de elastasa; compuestos de piridinIL-1midazol; y anticuerpos para, o antagonistas de, otras citocinas 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, a FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la presente invención, o porciones de unión de antígeno de los mismos, pueden combinarse con los anticuerpos a moléculas de la superficie celular, tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, y CD90 o cualquiera de sus ligandos. Los anticuerpos de la presente invención, o porciones de unión de

antígeno de los mismos, pueden también combinarse con los agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, mofetil de micofenolato, leflunomida, NSAIDs tal como ibuprofeno, corticoesteroides, tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes, los cuales interfieren con la señalización por citocinas proinflamatorias, tales como TNFα o IL-1 (por ejemplo, IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de cinasa MAP), inhibidores de enzima de conversión IL-1β, inhibidores de enzima de conversión TNFα, inhibidores de señalización de célula-T, tales como inhibidores de cinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima de conversión angiotensina, receptores de citocinas solubles y derivados de los mismos (por ejemplo receptores TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, y sIL-6R), citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ), e inhibidores bcl-2.

Los ejemplos de los agentes terapéuticos para la enfermedad de Crohn en la cual una proteína de unión puede combinarse incluyen lo siguiente: antagonistas TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, ADALIMUMAB (Publicación de PCT No. WO 97/29131; HUMIRA), CA2 (REMICADE), CDP 571, inhibidores constructos TNFR-Ig, (p75TNFRIgG (ENBREL) y p55TNFRIgG (LENERCEPT)) e inhibidores PDE4. Los anticuerpos de la

presente invención, o las porciones de unión de antígeno de los mismos, pueden combinarse con corticoesteroides, por ejemplo, budenosida y dexametasona. Las proteínas de unión de la presente invención, o porciones de unión de antígeno de los mismos, pueden también combinarse con agentes, tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico y olsalazina, y agentes, que interfieren con síntesis o acción de citocinas proinflamatorias, tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de enzima de conversión IL-Iβ e IL-1ra. Los anticuerpos de la presente invención, o la porción de unión de antígeno de los mismos, también pueden utilizarse con los inhibidores de señalización de la célula-T, por ejemplo, inhibidores de cinasa de tirosina 6-mercaptopurinas. Las proteínas de unión de la presente invención, o las porciones de unión de antígeno de los mismos, pueden combinarse con IL-11. Las proteínas de unión de la presente invención, o las porciones de unión de antígeno de los mismos, pueden combinarse con mesalamina, prednisona, azatioprina, mercaptopurina, infliximab, succcinato sódico de metilprednisolona, sulfato de difenoxilato/atrop, clorhidrato de loperamida, metotrexato, omeprazol, folato, ciprofloxacin/dextrosa-agua, bitartrato de hidrocodona/apap, clorhidrato de tetraciclina, fluocinonida, metronidazol, timerosal/ácido bórico, colestiramina/sucrosa, clorhidrato de ciprofloxacina, sulfato de hiosciamina, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de midazolam, hcl de oxicodona/acetaminofeno, clorhidrato de prometazina, fosfato

sódico, sulfametoxazol/trimetoprima, celecoxib, policarbofil, napsilato de propoxifeno, hidrocortisona, multivitaminas, balsalazida disodio, fosfato de codeína/apap, hcl de colesevelam, cianocobalamina, ácido fólico, levofloxacina, metilprednisolona, natalizumab, e interferón-gamma.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple con los cuales las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyen los siguientes: corticoesteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferon-β1a (AVONEX; Biogen); interferon-β1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferón α-n3) (Interferon Sciences/Fujimoto), interferón-α (Alfa Wassermann/J&J), interferón β1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), Peginterferon α 2b (Enzon/Schering-Plough), Copolímero 1 (Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; cladribina; anticuerpos para o antagonistas de otras citocinas 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. Las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse con los anticuerpos a las moléculas de la 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 presente invención pueden

también combinarse con los agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, mofetil de micofenolato, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticoesteroides, tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adensosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citocinas proinflamatorias, tales como TNFα o IL-1 (por ejemplo, IRAK, NIK, IKK, p38 o los inhibidores de cinasa MAP), inhibidores de enzima de conversión a IL-1β, inhibidores TACE, inhibidores de señalización de la célula-T, tales como inhibidores de cinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima de conversión angiotensina, receptores de citocinas solubles y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores TNF p55 o p75, sIL-1RI, sIL-1RII, y sIL-6R), citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-13 y TGFβ) e inhibidores bcl-2.

Los ejemplos de los agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple en los cuales las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyen interferon-β, por ejemplo, IFNβ1a e IFNβ1b; copaxona, corticoesteroides, inhibidores de caspasa, por ejemplo, inhibidores de caspase-1, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF, y anticuerpos al ligando CD40 y CD80.

Las proteínas de unión de la presente invención también pueden combinarse con los agentes, tales como alemtuzumab, dronabinol, Unimed, daclizumab, mitoxantrona, clorhidrato de

xaliproden, fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinabidol, a-imunocina NNSO3, ABR-215062, AnergiX.MS, antagonistas receptores de quemocina, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulado con liposoma), THC.CBD (agonista de cannabinoid) MBP-8298, mesopram (inhibidor PDE4), MNA-715, anticuerpo receptor anti-IL-6, neurovax, pirfenidona allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, talampanel, teriflunomida, TGF-beta2, tiplimotide, antagonistas VLA-4 (por ejemplo, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), antagonistas interferón gama, y agonistas IL-4.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la Angina con los cuales las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyen los siguientes: aspirina, nitroglicerina, mononitrato de isosorbida, succcinato de metoprolol, atenolol, tartrato de metoprolol, besilato de amlodipina, clorhidrato de diltiazem, dinitrato de isosorbida, bisulfato de clopidogrel, nifedipina, calcio de atorvastatina, cloruro de potasio, furosemida, simvastatina, hcl de verapamil, digoxina, clorhidrato de propranolol, carvedilol, lisinopril, espironolactona, hidroclorotiazida, maleato de enalapril, nadolol, ramipril, sodio de enoxaparina, sodio de heparina, valsartan, clorhidrato de sotalol, fenofibrate, ezetimiba, bumetanida, potasio de losartan, lisinopril/hidroclorotiazida, felodipina, captopril, y fumarato de bisoprolol.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para

la Espondolitis Anquilosante con los cuales las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyen los siguientes: ibuprofeno, diclofenaco y misoprostol, naproxeno, meloxicam, indometacina, diclofenaco, celecoxib, rofecoxib, Sulfasalazina, Metotrexato, azatioprina, minociclina, prednisona, etanercept, e infliximab.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para el Asma con los cuales las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyen los siguientes: albuterol, salmeterol/fluticasona, sodio de montelukast, propionato de fluticasona, budesonida, prednisona, xinafoato de salmeterol, hcl de levalbuterol, sulfato de albuterol/ipratropio, fosfato sódico de prednisolona, acetónido de triamcinolona, dipropionato de beclometasona, bromuro de ipratropio, azitromicina, acetato de pirbuterol, prednisolona, teofilina anhidra, succcinato sódico de metilprednisolona, claritromicina, zafirlukast, fumarato de formoterol, vacuna del virus de influenza, metilprednisolona, trihidrato de amoxicilina, flunisolida, inyección de alergia, cromolín sódico, clorhidrato de fexofenadina, flunisolida/mentol, amoxicilina/clavulanato, levofloxacina, dispositivo de ayuda del inhalador, guaifenesina, fosfato sódico de dexametasona, hcl de moxifloxacina, hiclato de doxiciclina, guaifenesina/d-metorfan, p-efedrina/cod/clorfenir, gatifloxacina, clorhidrato de cetirizina, furoato de mometasona, xinafoato de salmeterol, benzonatato, ceaalexina, pe/hidrocodona/clorfenir, hcl de

cetirizina/pseudoefed, fenilefrina/cod/prometazina, codeína/prometazina, cefprozil, dexametasona, guaifenesina/pseudoefedrina, clorfeniramina/hidrocodona, nedocromil sódico, sulfato de terbutalina, epinefrina, metilprednisolona, y sulfato de metaproterenol.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para COPD con los cuales las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyen los siguientes: sulfato de albuterol/ipratropio, bromuro de ipratropio, salmeterol/fluticasona, albuterol, xinafoato de salmeterol, propionato de fluticasona, prednisona, teofilina anhidra, succcinato sódico de metilprednisolona, sodio de montelukast, budesonida, fumarato de formoterol, acetónida de triamcinolona, levofloxacina, guaifenesina, azitromicina, dipropionato de beclometasona, hcl de levalbuterol, flunisolida, sodio de ceftriaxona, trihidrato de amoxicilina, gatifloxacina, zafirlukast, amoxicilina/clavulanato, flunisolida/mentol, clorfeniramina/hidrocodona, sulfato de metaproterenol, 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, y Roflumilast.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para HCV con los cuales las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyen los siguientes: Interferón-alfa-2a, Interferón-alfa-2b, Interferón-alfa con1, Interferón-alfa-

n1, Pegilato interferón-alfa-2a, Pegilato interferón-alfa-2b, ribavirin, Peginterferón alfa-2b + ribavirin, Ácido Ursodeoxicólico, Ácido Glicirrícico, Timalfasin, Maxamina, VX-497 y cualquiera de los compuestos que se utilicen para tratar HCV con la intervención a través de los objetivos siguientes: polimerasa de HCV, proteasa de HCV, helicasa de HCV, e HCV IRES (sitio interno del ribosoma interno).

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la Fibrosis Pulmonar Idiopática con los cuales las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyen los siguientes: prednisona, azatioprina, albuterol, colquicina, sulfato de albuterol, digoxina, interferón gama, succinato sódico de metilprednisolona, lorazepam, furosemida, lisinopril, nitroglicerina, espironolactona, ciclofosfamida, bromuro de ipratropio, actinomicina d, alteplase, propionato de fluticasona, levofloxacina, sulfato de metaproterenol, sulfato de morfina, hcl de oxicodona, cloruro de potasio, acetonida de triamcinolona, tacrolimus anhidro, calcio, interferón-alfa, metotrexato, mofetil de micofenolato, e interferón-gama-1β.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para el Infarto al Miocardio con los cuales las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyen los siguientes: aspirina, nitroglicerina, tartrato de metoprolol, enoxaparina sódica, heparina sódica, bisulfato de clopidogrel, carvedilol, atenolol, sulfato de morfina, succcinato de metoprolol, warfarina

sódica, lisinopril, mononitrato de isosorbida, digoxina, furosemida, simvastatina, ramipril, tenecteplasa, maleato de enalapril, torsemida, retavasa, potasio de losartan, hcl de quinapril/carb mag, bumetanida, alteplasa, enalaprilat, clorhidrato de amiodarona, hcl de tirofiban m-hidrato, clorhidrato de diltiazem, captopril, irbesartan, valsartan, clorhidrato de propranolol, sodio de fosinopril, clorhidrato de lidocaína, eptifibatida, cefazolina sódica, sulfato de atropina, ácido aminocapróico, espironolactona, interferón, clorhidrato de sotalol, cloruro de potasio, docusato sódico, hcl de dobutamina, alprazolam, pravastatina sódica, calcio de atorvastatina, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de meperidina, dinitrato de isosorbida, epinefrina, clorhidrato de dopamina, bivalirudina, rosuvastatina, ezetimiba/simvastatina, avasimiba, y cariporida.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para Psoriasis con los cuales las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyendo los siguientes: inhibidor de molécula pequeña de KDR, inhibidor de molécula pequeña de Tie-2, calcipotrieno, propionato de clobetasol, acetónido de triamcinolona, propionato de halobetasol, tazaroteno, metotrexato, fluocinonida, betametasona diprop aumentada, acetónido de fluocinolona, acitretina, champú de alquitrán, valerato de betametasona, furoato de mometasona, quetoconazol, pramoxine/fluocinolone, valerato de la hidrocortisona, flurandrenolida, urea, betametasona, propionato de

clobetasol/emoll, propionato de fluticasona, azitromicina, hidrocortisona, fórmula hidratante, ácido fólico, desonida, pimecrolimus, alquitrán de carbón, diacetato de diflorasona, folato de etanercept, ácido láctico, metoxsalen hcl/subgalato de bismuto/znox/resor, acetato de metilprednisolona, prednisona, protector solar, halcinonida, ácido salicílico, antralina, pivalato de clocortolona, extracto de carbón, alquitrán de carbón/ácido salicílico, alquitrán de carbón/ácido salicílico/azufre, desoximetasona, diazepan, emoliente, fluocinonida/emoliente, aceite mineral/aceite de ricino /na lact, aceite mineral/aceite de cacahuete, petróleo/miristato de isopropilo, psoralen, ácido salicílico, jabón/tribromsalan, timerosal/ácido bórico, celecoxib, infliximab, ciclosporina, alefacept, efalizumab, tacrolimus, pimecrolimus, PUVA, UVB, y sulfasalazina.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la Artritis Psoriática con los cuales las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyendo los siguientes: metotrexato, etanercept, rofecoxib, celecoxib, ácido fólico, sulfasalazina, naproxeno, leflunomida, acetato de metilprednisolona, indometacina, sulfato de hidroxicloroquina, prednisona, sulindac, betametasona diprop aumentada, infliximab, metotrexato, folato, acetónido de triamcinolona, diclofenaco, dimetilsolfóxido, piroxicam, diclofenaco sódico, ketoprofeno, meloxicam, metilprednisolona, nabumetona, tolmetin sódico, calcipotrieno, ciclosporina, diclofenaco sódico/misoprostol,

fluocinonida, sulfato de glucosamina, tiomalato sódico de oro, bitartrato de hidrocodona/apap, ibuprofeno, risedronato sódico, sulfadiazina, tioguanina, valdecoxib, alefacept, efalizumab, e inhibidores bcl-2.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la Restenosis con los cuales las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyen los siguientes: sirolimus, paclitaxel, everolimus, tacrolimus, Zotarolimus, y acetaminofen.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos la Ciática con los cuales las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyen los siguientes: bitartrato de hidrocodona/apap, rofecoxib, hcl de ciclobenzaprina, metilprednisolona, naproxeno, ibuprofeno, hcl de oxicodona/acetaminofeno, celecoxib, valdecoxib, acetato de metilprednisolona, prednisona, fosfato de codeína/apap, hcl de tramadol/acetaminofeno, metaxalona, meloxicam, metocarbamol, clorhidrato de lidocaína, diclofenaco sódico, gabapentina, dexametasona, carisoprodol, trometamina de ketorolaco, indometacina, acetaminofeno, diazepan, nabumetona, hcl de oxicodona, hcl de tizanidina, diclofenaco sódico/misoprostol, propoxifeno napsilato/apap, asa/oxicod/oxicodona ter, ibuprofeno/ hidrocodona bit, hcl de tramadol, etodolaco, hcl de propoxifeno, hcl de amitriptilina, carisoprodol/codeína fos/asa, sulfato de morfina, multivitaminas, naproxeno sódico, citrato de orfenadrina,

y temazepam.

Los ejemplos de los agentes terapéuticos para SLE (lupus) en donde las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse incluyen los siguientes: NSAIDS, por ejemplo, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, piroxicam, indometacina; inhibidores COX2, por ejemplo, Celecoxib, rofecoxib, valdecoxib; anti-malariales, por ejemplo, hidroxicloroquina; Esteroides, por ejemplo, prednisona, prednisolona, budenosida, dexametasona; Citotóxicos, por ejemplo, azatioprina, ciclofosfamida, mofetil de micofenolato, metotrexato; e inhibidores de PDE4 o de un inhibidor de síntesis de purina, por ejemplo, Cellcept. Las proteínas de unión de la presente invención también pueden combinarse con los agentes, tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílicos, olsalazina, Imuran y agentes, que interfieren con síntesis, producción o acción de citocinas proinflamatorias, tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de caspasa tipo inhibidores de enzima de conversión a IL-1β e IL-1ra. Las proteínas de unión de la presente invención también pueden utilizarse con los inhibidores de señalización de la célula-T, por ejemplo, inhibidores de cinasa de tirosina, o que apuntan a moléculas de activación de la célula-T, por ejemplo, anticuerpos de la familia CTLA-4-IgG o anti-B7 y anticuerpos de la familia anti-PD-1. Las proteínas de unión de la presente invención pueden combinarse con IL-11 o anticuerpos anti-citocinas, por ejemplo, fonotolizumab (anticuerpo anti-IFNg), o anticuerpos del receptor del anti-

receptor, por ejemplo, anticuerpo del receptor anti-IL-6 y anticuerpos para las moléculas de la superficie de célula-B. Los anticuerpos de la presente invención, o la porción de unión de antígeno de los mismos, también pueden utilizarse con LJP 394 (abetimus), agentes que agotan o inactivan a las células-B, por ejemplo, Rituximab (anticuerpo anti-CD20), limfostat-B (anticuerpo anti-BliS), antagonistas TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, Adalimumab (Publicación de PCT No. WO 97/29131; HUMIRA), CA2 (REMICADE), CDP 571, constructor de TNFR-Ig, (p75TNFRIgG (ENBREL) y p55TNFRIgG (LENERCEPT)) e inhibidores bcl-2, debido a que la sobreexpresión de bcl-2 en ratones transgénicos se ha demostrado que causan un lupus como fenotipo (ver Marquina, R. y colaboradores (2004) J. Immunol. 172(11):7177-7185), por lo tanto se espera que la inhibición tenga efectos terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir "una cantidad terapéuticamente efectiva" o "una cantidad profilácticamente efectiva" de una proteína de unión de la presente invención. "Una cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y por periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de unión puede determinarse por un experto en la técnica y puede variar de acuerdo a los factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la

capacidad de la proteína de unión de obtener una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en donde cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo, o porción del anticuerpo, se compensa por los efectos beneficiosos terapéuticos. "Una cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y por periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, ya que una dosis profiláctica se utiliza en sujetos antes de o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, un solo bolo puede administrarse, varias dosis divididas pueden administrarse en un cierto tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indicado en las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación según lo utilizado en la presente se refiere a las unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para que los sujetos mamíferos sean tratados; cada unidad que contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculado para producir el

efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la presente invención se dictan por y directamente dependiente en (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se logrará, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de componer un compuesto activo tal para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un intervalo no limitante, ejemplar para una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de una proteína de unión de la presente invención es 0.1-20 mg/kg, por ejemplo, 1-10 mg/kg. Deberá observarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y severidad de la condición que se aliviará. Deberá entenderse adicionalmente que para cualquier sujeto particular, régimen de dosificación específico deberá ajustarse en un cierto plazo de acuerdo a la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en la presente son únicamente ejemplares y no se desean para limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada.

Será fácilmente evidente a los expertos en la técnica que otras modificaciones y adaptaciones convenientes de los métodos descritos en la presente son obvias y pueden hacerse usando equivalentes convenientes sin apartarse del alcance de la

invención reivindicada o de las modalidades descritas en la presente. Teniendo ahora descrita la presente invención detalladamente, de la misma forma será comprendida más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que están incluidos con el único propósito de ilustrar y no se desean para limitar la invención reivindicada.

**Ejemplos**

***Ejemplo 1: Diseño, Construcción, y Ensayo de una DVD-Ig***

***Ejemplo 1.1: Ensayo Utilizado para Identificar y Caracterizar a los Anticuerpos Madre y DVD-Ig***

Los siguientes ensayos se utilizan a través de los ejemplos para identificar y caracterizar los anticuerpos madre y DVD-Ig a menos que estén indicados de otra manera.

***Ejemplo 1.1.1: Ensayo Utilizado para Determinar la Unión y Afinidad de los Anticuerpos Madre y DVD-Ig para sus Antígenos Específicos***

***Ejemplo 1.1.1.A: ELISA***

Los Ensayos Inmunoabsorbente Ligados a la Enzima para analizar a los anticuerpos que se unen a un antígeno específico deseado se realizan como sigue. Las placas de ELISA (Corning Costar, Acton, MA) están cubiertas con 50 µl/pozo de 5 µg/ml de IgG Fc específico de cabra anti-ratón (Pierce # 31170, Rockford, IL) en una solución salina amortiguada con fosfato (PBS) durante la noche a 4°C. Las placas se lavan una vez con PBS que contiene 0.05% Tween-20. Las placas se bloquean por la adición

de 200 µl/pozo que bloquean la solución diluida al 2% en PBS (BioRad #170-6404, Hércules, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan una vez después de bloquear con 0.05% de Tween-20 que contiene PBS

Cincuenta microlitros por pozo, por ejemplo, sueros de ratón, supernadantes de hibridoma, o anticuerpo o preparaciones de DVD-Ig diluidas en 0.1% albúminas del suero vacuno que contienen PBS (BSA) (Sigma, St. Louis, MES.) se agregan a la placa de ELISA preparada como se describe anteriormente e incubada durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos se lavan tres veces con 0.05% de Tween-20 que contiene PBS. Cincuenta microlitros del antígeno específico purificado recombinante biotinilado diluido en 100 mg/ml en 0.1% BSA que contiene PBS se agregan a cada pozo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan 3 veces con 0.05% de Tween-20 que contiene PBS. Estreptavidina HRP (Pierce # 21126, Rockland, IL.) se diluye 1:20.000 en 0.1% BSA que contiene PBS; se agregan 50 µl/pozo y las placas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan 3 veces con 0.05% de Tween-20 que contiene PBS. Cincuenta microlitros de solución TMB (Sigma # T0440, St. Louis, MES) se agregan a cada pozo y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene por la adición de 1N ácido sulfúrico. Las placas se leen espectrofotmétricamente en una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se muestran en la tabla 3.

***Tabla 3: ELISA de unión directa de 104 constructos de DVD con EGFR (sec. 2) combinados con otras secuencias con***

***varias orientaciones y longitudes de enlaces***

| ID de DVD-IG | ID de secuencia de VD de terminal N | EC50 de VD de terminal N (nm) | ID de Ab. Ref. de terminal N | Ab. Ref. EC50 de terminal N (nM) | Enlace de HC | Enlace de LC | ID de secuencia de CD de terminal C | EC50 de VD de terminal C (nM) | ID de Ab. Ref. de terminal C | EC50 de Ab. Ref. de terminal C (nM) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD321 | EGFR (sec. 2) | 6.83 | AB064 | 3.63 | S | S | EGFR (sec. 1) | 6.83 | AB033 | 1.8 |
| DVD322 | EGFR (sec. 1) | 1.59 | AB033 | 1.67 | S | S | EGFR (sec. 2) | 1.59 | AB064 | 3.63 |
| DVD325 | EGFR (sec. 2) | 5.96 | AB064 | 6.86 | S | S | RON | 24.99 | AB005 | 0.19 |
| DVD326 | RON | 0.18 | AB005 | 0.24 | S | S | EGFR (sec. 2) | 29.93 | AB064 | 8.83 |
| DVD327 | EGFR (sec. 2) | 3.98 | AB064 | 3.45 | S | S | ErbB3 (sec. 1) | 485.26 | AB062 | 1.19 |
| DVD328 | ErbB3 (sec 1) | 1.14 | AB062 | 1.34 | S | S | EGFR (sec. 2) | 94.89 | AB064 | 3.83 |
| DVD329 | EGFR (sec. 2) | 3.82 | AB064 | 4.37 | S | S | ErbB3 (sec. 2) | 481.28 | AB063 | 0.86 |
| DVD330 | ErbB3 (sec. 2) | 1.29 | AB063 | 1.11 | S | S | EGFR (seq. 2) | 224.44 | AB064 | 4.17 |
| DVD331 | EGFR (sec. 2) | 3.68 | AB064 | 3.89 | S | S | CD3 | N/A | AB002 | N/A |
| DVD332 | CD3 | N/A | AB002 | N/A | S | S | EGFR (sec. 2) | 62.09 | AB064 | 3.95 |
| DVD333 | EGFR (sec. 2) | 3.55 | AB064 | 4.46 | S | S | IGF1R | 78.58 | AB011 | 0.24 |
| DVD334 | IGF1R | 0.19 | AB011 | 0.26 | S | S | EGFR (sec. 2) | 137.12 | AB064 | 4.28 |
| DVD335 | EGFR (sec. 2) | 3.77 | AB064 | 5.03 | S | S | HGF | 159.04 | AB012 | 0.15 |
| DVD336 | HGF | 0.15 | AB012 | 0.19 | S | S | EGFR (sec. 2) | 332.05 | AB064 | 5.40 |
| DVD337 | EGFR (sec. 2) | 6.5 | AB064 | 6.73 | S | S | VEGF (sec. 1) | 0.57 | AB014 | 0.25 |
| DVD338 | VEGF (sec. 1) | 0.24 | AB014 | 0.26 | S | S | EGFR (sec. 2) | 205.54 | AB064 | 7.84 |
| DVD339 | EGFR (sec. 2) | 5.1 | AB064 | 3.66 | S | S | DLL-4 | 4.01 | AB015 | 0.45 |
| DVD340 | DLL-4 | 0.32 | AB015 | 0.40 | S | S | EGFR (sec. 2) | 189.14 | AB064 | 3.8 |
| DVD341 | EGFR (sec. 2) | 3.41 | AB064 | 4.39 | S | S | PLGF | 0.74 | AB047 | 0.21 |
| DVD342 | PLGF | 0.2 | AB047 | 0.25 | S | S | EGFR (sec. 2) | 119.88 | AB064 | 3.77 |
| DVD755 | EGFR (sec. 2) | 3.26 | AB064 | 4.78 | S | S | ErbB3 (sec. 3) | 27.68 | AB067 | 1.40 |
| DVD756 | ErbB3 (sec. 3) | 3.94 | AB067 | 2.03 | S | S | EGFR (sec. 2) | 48.87 | AB064 | 3.48 |
| DVD757 | EGFR (sec. 2) | 14.51 | AB064 | 10.69 | S | S | VEGF (sec. 2) | 528.26 | AB070 | 5.12 |
| DVD758 | VEGF (sec. 2) | 5.37 | AB070 | 5.91 | S | S | EGFR (sec. 2) | 561.59 | AB064 | 9.11 |
| DVD759 | EGFR (sec. 2) | 7.01 | AB064 | 10.25 | S | S | VEGF (sec. 3) | 127.91 | AB071 | 1.68 |
| DVD760 | VEGF (sec. 3) | 0.77 | AB071 | 1.57 | S | S | EGFR (sec. 2) | 328.03 | AB064 | 12.93 |
| DVD765 | EGFR (sec. 2) | 4.48 | AB064 | 3.63 | L | L | EGFR (sec. 1) | 4.48 | AB033 | 1.67 |
| DVD766 | EGFR (sec. 1) | 3.12 | AB033 | 1.8 | L | L | EGFR (sec. 2) | 3.12 | AB064 | 3.63 |
| DVD767 | EGFR (sec. 2) | 5.97 | AB064 | 6.86 | L | L | RON | 0.64 | AB005 | 0.19 |
| DVD768 | RON | 0.18 | AB005 | 0.24 | L | L | EGFR (sec. 2) | 20.67 | AB064 | 8.83 |
| DVD769 | EGFR (sec. 2) | 3.59 | AB064 | 3.45 | L | L | ErbB3 (sec. 1) | 8.23 | AB062 | 1.19 |
| DVD770 | ErbB3 (sec. 1) | 1.55 | AB062 | 1.36 | L | L | EGFR (sec. 2) | 15.24 | AB064 | 6.86 |
| DVD771 | EGFR (sec. 2) | 4.43 | AB064 | 4.37 | L | L | ErbB3 (sec. 2) | 1.38 | AB063 | 0.86 |
| DVD772 | ErbB3 (sec. 2) | 31.42 | AB063 | 1.11 | L | L | EGFR (sec. 2) | 77.19 | AB064 | 4.17 |

| ID de DVD-IG | ID de secuencia de VD de terminal N | EC50 de VD de terminal N (nm) | ID de Ab. Ref. de terminal N | Ab. Ref. EC50 de terminal N (nM) | Enlace de HC | Enlace de LC | ID de secuencia de CD de terminal C | EC50 de VD de terminal C (nM) | ID de Ab. Ref. de terminal C | EC50 de Ab. Ref. de terminal C (nM) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD773 | EGFR(sec. 2) | 4.96 | AB064 | 3.89 | L | L | CD3 | N/A | AB002 | N/A |
| DVD774 | CD3 | N/A | AB002 | N/A | L | L | EGFR (sec. 2) | 19.29 | AB064 | 3.95 |
| DVD775 | EGFR (sec. 2) | 3.59 | AB064 | 4.46 | L | L | IGF1R | 2.77 | AB011 | 0.24 |
| DVD776 | IGF1R | 0.83 | AB011 | 0.26 | L | L | EGFR (sec. 2) | 286.41 | AB064 | 4.28 |
| DVD777 | EGFR (sec. 2) | 5.13 | AB064 | 5.03 | L | L | HGF | 0.96 | AB012 | 0.15 |
| DVD778 | HGF | 0.17 | AB012 | 0.19 | L | L | EGFR (sec. 2) | 50.3 | AB064 | 5.40 |
| DVD779 | EGFR (sec. 2) | 10.57 | AB064 | 6.73 | L | L | VEGF (sec. 1) | 0.24 | AB014 | 0.25 |
| DVD780 | VEGF (sec. 1) | 2.19 | AB014 | 0.26 | L | L | EGFR (sec. 2) | 408.7 | AB064 | 7.84 |
| DVD781 | EGFR (sec. 2) | 4.19 | AB064 | 3.66 | L | L | DLL-4 | 0.42 | AB015 | 0.45 |
| DVD782 | DLL-4 | 0.37 | AB015 | 0.40 | L | L | EGFR (sec. 2) | 55.24 | AB064 | 3.8 |
| DVD783 | EGFR (sec. 2) | 3.88 | AB064 | 4.39 | L | L | PLGF | 0.36 | AB047 | 0.21 |
| DVD784 | PLGF | 0.26 | AB047 | 0.25 | L | L | EGFR (sec. 2) | 41.36 | AB064 | 3.77 |
| DVD787 | EGFR (sec. 2) | 3.78 | AB064 | 4.78 | L | L | ErbB3 (sec. 3) | 14.38 | AB067 | 1.40 |
| DVD788 | ErbB3 (sec. 2) | 3.14 | AB067 | 2.03 | L | L | EGFR (sec. 2) | 18.04 | AB064 | 3.48 |
| DVD789 | EGFR (sec. 2) | 14.61 | AB064 | 10.69 | L | L | VEGF (sec. 2) | 45.95 | AB070 | 5.12 |
| DVD790 | VEGF (sec. 2) | 15.91 | AB070 | 5.91 | L | L | EGFR (sec. 2) | 76.76 | AB064 | 9.11 |
| DVD791 | EGFR (sec. 2) | 8.24 | AB064 | 10.25 | L | L | VEGF (sec. 3) | 11.62 | AB071 | 1.68 |
| DVD792 | VEGF (sec. 3) | 0.82 | AB071 | 1.57 | L | L | EGFR (sec. 2) | 48.61 | AB064 | 12.93 |
| DVD795 | EGFR (sec. 2) | 6.21 | AB064 | 3.63 | L | S | EGFR (sec. 1) | 6.21 | AB033 | 1.67 |
| DVD796 | EGFR (sec. 1) | 1.94 | AB033 | 1.8 | L | S | EGFR (sec. 2) | 1.94 | AB064 | 3.63 |
| DVD797 | EGFR (sec. 2) | 4.56 | AB064 | 6.86 | L | S | RON | 1.16 | AB005 | 0.19 |
| DVD798 | RON | 0.18 | AB005 | 0.24 | L | S | EGFR (sec. 2) | 17.94 | AB064 | 8.83 |
| DVD799 | EGFR (sec. 2) | 5.76 | AB064 | 3.45 | L | S | ErbB3 (sec. 1) | 20.04 | AB062 | 1.19 |
| DVD800 | ErbB3 (sec. 1) | 2.06 | AB062 | 1.34 | L | S | EGFR (sec. 2) | 67.26 | AB064 | 3.83 |
| DVD801 | EGFR (sec. 2) | 3.91 | AB064 | 4.37 | L | S | ErbB3 (sec. 2) | 3.28 | AB063 | 0.86 |
| DVD802 | ErbB3 (sec. 2) | 11.13 | AB063 | 1.11 | L | S | EGFR (sec. 2) | 726.39 | AB064 | 4.17 |
| DVD803 | EGFR(sec. 2) | 0.23 | AB064 | 3.89 | L | S | CD3 | N/A | AB002 | N/A |
| DVD804 | CD3 | N/A | AB002 | N/A | L | S | EGFR(sec. 2) | 157.62 | AB064 | 3.95 |
| DVD805 | EGFR (sec. 2) | 0.48 | AB064 | 4.46 | L | S | IGF1R | 0.99 | AB011 | 0.24 |
| DVD806 | IGF1R | 0.4 | AB011 | 0.26 | L | S | EGFR (sec. 2) | 53.79 | AB064 | 4.28 |
| DVD807 | EGFR (sec. 2) | 4.85 | AB064 | 5.03 | L | S | HGF | 9.24 | AB012 | 0.15 |
| DVD808 | HGF | 0.14 | AB012 | 0.19 | L | S | EGFR (sec. 2) | 96.36 | AB064 | 5.40 |
| DVD809 | EGFR (sec. 2) | 7.34 | AB064 | 6.73 | L | S | VEGF (sec. 1) | 0.23 | AB014 | 0.25 |
| DVD810 | VEGF (sec. 1) | 0.33 | AB014 | 0.26 | L | S | EGFR (sec. 2) | 227.99 | AB064 | 7.84 |
| DVD811 | EGFR(sec. 2) | 3.45 | AB064 | 3.66 | L | S | DLL-4 | 0.99 | AB015 | 0.45 |
| DVD812 | DLL-4 | 0.39 | AB015 | 0.40 | L | S | EGFR(sec. 2) | 77.26 | AB064 | 3.8 |
| DVD813 | EGFR (sec. 2) | 3.41 | AB064 | 4.39 | L | S | PLGF | 0.44 | AB047 | 0.21 |

| ID de DVD-IG | ID de secuencia de VD de terminal N | EC50 de VD de terminal N (nm) | ID de Ab. Ref. de terminal N | Ab. Ref. EC50 de terminal N (nM) | Enlace de HC | Enlace de LC | ID de secuencia de CD de terminal C | EC50 de VD de terminal C (nM) | ID de Ab. Ref. de terminal C | EC50 de Ab. Ref. de terminal C (nM) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD814 | PLGF | 0.23 | AB047 | 0.25 | L | S | EGFR (sec. 2) | 50.43 | AB064 | 3.77 |
| DVD817 | EGFR (sec. 2) | 5.33 | AB064 | 4.78 | L | S | ErbB3 (sec. 3) | 18.82 | AB067 | 1.40 |
| DVD818 | ErbB3 (sec. 3) | 3.32 | AB067 | 2.03 | L | S | EGFR (sec. 2) | 19.32 | AB064 | 3.48 |
| DVD819 | EGFR (sec. 2) | 12.2 | AB064 | 10.69 | L | S | VEGF (sec. 2) | 36.35 | AB070 | 5.12 |
| DVD820 | VEGF (sec. 2) | 4.08 | AB070 | 5.91 | L | S | EGFR (sec. 2) | 106.81 | AB064 | 9.11 |
| DVD821 | EGFR (sec. 2) | 6.96 | AB064 | 10.25 | L | S | VEGF (sec. 3) | 11.09 | AB071 | 1.68 |
| DVD822 | VEGF (sec. 3) | 0.72 | AB071 | 1.57 | L | S | EGFR (sec. 2) | 90.03 | AB064 | 12.93 |
| DVD825 | EGFR (sec. 2) | 1.67 | AB064 | 3.63 | S | L | EGFR (sec. 1) | 1.67 | AB033 | 1.67 |
| DVD826 | EGFR (sec. 1) | 2.27 | AB033 | 1.8 | S | L | EGFR (sec. 2) | 2.27 | AB064 | 3.63 |
| DVD827 | EGFR (sec. 2) | 6.28 | AB064 | 6.86 | S | L | RON | 6.57 | AB005 | 0.19 |
| DVD828 | RON | 0.2 | AB005 | 0.24 | S | L | EGFR (sec. 2) | 19.83 | AB064 | 8.83 |
| DVD829 | EGFR (sec. 2) | 3.81 | AB064 | 3.45 | S | L | ErbB3 (sec. 1) | 41.4 | AB062 | 1.19 |
| DVD830 | ErbB3 (sec. 1) | 1.43 | AB062 | 1.34 | S | L | EGFR (sec. 2) | 42.71 | AB064 | 3.83 |
| DVD831 | EGFR (sec. 2) | 4.6 | AB064 | 4.37 | S | L | ErbB3 (sec. 2) | 1.42 | AB063 | 0.86 |
| DVD832 | ErbB3 (sec. 2) | 1.19 | AB063 | 1.11 | S | L | EGFR (sec. 2) | 62.39 | AB064 | 4.17 |
| DVD833 | EGFR (sec. 2) | 3.03 | AB064 | 3.89 | S | L | CD3 | N/A | AB002 | N/A |
| DVD834 | CD3 | N/A | AB002 | N/A | S | L | EGFR (sec. 2) | 26.7 | AB064 | 3.95 |
| DVD835 | EGFR (sec. 2) | 2.42 | AB064 | 4.46 | S | L | IGF1R | 3.47 | AB011 | 0.24 |
| DVD836 | IGF1R | 0.51 | AB011 | 0.26 | S | L | EGFR (sec. 2) | 56.83 | AB064 | 4.28 |
| DVD837 | EGFR (sec. 2) | 4.51 | AB064 | 5.03 | S | L | HGF | 1.29 | AB012 | 0.15 |
| DVD838 | HGF | 0.19 | AB012 | 0.19 | S | L | EGFR (sec. 2) | 57.66 | AB064 | 5.40 |
| DVD839 | EGFR (sec. 2) | 12.53 | AB064 | 6.73 | S | L | VEGF (sec. 1) | 0.26 | AB014 | 0.25 |
| DVD840 | VEGF (sec. 1) | 0.18 | AB014 | 0.26 | S | L | EGFR (sec. 2) | 69.77 | AB064 | 7.84 |
| DVD841 | EGFR (sec. 2) | 4.06 | AB064 | 3.66 | S | L | DLL-4 | 0.55 | AB015 | 0.45 |
| DVD842 | DLL-4 | 0.36 | AB015 | 0.40 | S | L | EGFR (sec. 2) | 51.68 | AB064 | 3.8 |
| DVD843 | EGFR (sec. 2) | 3.65 | AB064 | 4.39 | S | L | PLGF | 0.37 | AB047 | 0.21 |
| DVD844 | PLGF | 0.23 | AB047 | 0.25 | S | L | EGFR (sec. 2) | 45.51 | AB064 | 3.77 |
| DVD847 | EGFR (sec. 2) | 2.92 | AB064 | 4.78 | S | L | ErbB3 (sec. 3) | 12.93 | AB067 | 1.40 |
| DVD848 | ErbB3 (sec. 3) | 3.23 | AB067 | 2.03 | S | L | EGFR (sec. 2) | 16.74 | AB064 | 3.48 |
| DVD849 | EGFR (sec. 2) | 12.33 | AB064 | 10.69 | S | L | VEGF (sec. 2) | 59.58 | AB070 | 5.12 |
| DVD850 | VEGF (sec. 2) | 10.17 | AB070 | 5.91 | S | L | EGFR (sec. 2) | 71.83 | AB064 | 9.11 |
| DVD851 | EGFR (sec. 2) | 9.36 | AB064 | 10.25 | S | L | VEGF (sec. 3) | 28.44 | AB071 | 1.68 |
| DVD852 | VEGF (sec. 3) | 0.78 | AB071 | 1.57 | S | L | EGFR (sec. 2) | 68.11 | AB064 | 12.93 |

La unión de todos los constructos de DVD-Ig fue mantenida y comparable con los anticuerpos madre. Todos los dominios variables de terminal N unidos con una alta afinidad similar como el anticuerpo madre así como los dominios variables de terminal C de los constructos de DVD-Ig DVD322, DVD337, DVD341, DVD765, DVD766, DVD767, DVD771, DVD777, DVD779, DVD781, DVD783, DVD796, DVD803, DVD809, DVD811, DVD813, DVD825, DVD826, DVD831, DVD839, DVD841, y DVD843.

***Ejemplo 1.1.1.B: Determinación de Afinidad usando tecnología de BIACORE***

El ensayo de BIACORE (Biacore, Inc, Piscuneway, NJ) determina la afinidad de anticuerpos o de DVD-Ig con mediciones cinéticas de constantes dentro de índice y fuera de índice. La unión de anticuerpos o DVD-Ig a un antígeno específico (por ejemplo, un antígeno específico recombinante purificado) se determina por las mediciones basadas en resonancia de plasmón superficial con un instrumento de Biacore® 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia) usando el funcionamiento de HBS-EP (10 mm HEPES [pH 7.4], 150 mm de NaCl, 3 mm EDTA, y 0.005% de tensioactivo P20) a 25°C. Todos los químicos se obtuvieron de Biacore® AB (Uppsala, Suecia) o de otra manera de una diferente fuente según lo descrito en el texto. Por ejemplo, aproximadamente 5000 RU del IgG anti-ratón de cabra, (Fcγ), fragmentos del anticuerpo policlonal específico (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) diluidos en 10 mm de acetato de sodio (pH 4.5) se inmovilizaron directamente a través de un chip

biosensor grado de investigación CM5 usando un kit de acoplamiento de amina estándar de acuerdo a las instrucciones y procedimientos del fabricante en 25 µg/ml. Las fracciones sin reacción en la superficie del biosensor se bloquean con etanolamina. La superficie de dextrano de carboximetilo modificada en la célula de flujo 2 y 4 se utiliza como superficie de reacción. El dextrano de carboximetilo sin modificar sin el IgG anti-ratón de cabra en la célula de flujo 1 y 3 se utiliza como la superficie de referencia. Para el ensayo cinético, las ecuaciones del índice se derivaron de 1:1 modelo de unión de Langmuir se fijaron simultáneamente a las fases de asociación y disociación de las ocho inyecciones (usando el análisis de ajuste global) con el uso del software Biaevaluation 4.0.1. Los anticuerpos purificados o DVD-Ig se diluyeron en la solución salina amortiguada con HEPES para captura a través de superficies de reacción específicas de IgG anti-ratón de cabra. Los anticuerpos que se capturarán como ligando (25 µg/ml) se inyectan sobre las matrices de reacción en un caudal de 5 µl/min. Las constantes del índice de asociación y disociación, $k_{on}$ ($M^{-1}s^{-1}$) y $k_{off}$ ($S^{-1}$) se determinan bajo un caudal continuo de 25 µl/min. Las constantes de índice son derivadas haciendo mediciones de unión cinética en diez diferentes concentraciones de antígeno que tienen un intervalo de 10 - 200 nm. El constante de disociación de equilibrio (m) de la reacción entre los anticuerpos o DVD-Igs y del antígeno específico después se calcula de lss constantes cinéticos de índice por la fórmula siguiente: $K_D = k_{off}/k_{on}$. La unión se registra como una función de tiempo y se

calculan las constantes de índice cinético. En este ensayo, pueden medirse dentro de índice tan rápido como $10^6 M^{-1}$-s-1 y fuera de índices tan lento como $10^{-6} s^{-1}$.

***Tabla 4: Análisis BIACORE de anticuerpos madre y constructos de DVD***

| ID de Anticuerpo madre o DVD-Ig | Dominio variable (VD) de terminal N | Dominio variable (VD) de terminal C | Enlace HC | Enlace LC | Antígeno | $k_{on}$ (M-1s-1) | $k_{off}$ (s-1) | $k_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AB033 | EGFR (sec. 1) | | | | FL-hEGFR | 2.47E+05 | 1.13E-03 | 4.60E-09 |
| AB064 | EGFR (sec. 2) | | | | FL-hEGFR | ND | ND | ND |
| DVD321 | EGFR (sec. 2) | EGFR (sec. 1) | Corto | Corto | FL-hEGFR | 5.46E+04 | 7.39E-04 | 1.40E-08 |
| DVD322 | EGFR (sec. 1) | EGFR (sec. 2) | Corto | Corto | FL-hEGFR | 2.52E+05 | 1.04E-03 | 4.10E-09 |
| DVD795 | EGFR (sec. 2) | EGFR (sec. 1) | Largo | Corto | FL-hEGFR | 1.29E+04 | 2.59E-04 | 2.00E-08 |
| DVD796 | EGFR (sec. 1) | EGFR (sec. 2) | Largo | Corto | FL-hEGFR | 3.31E+05 | 1.21E-03 | 3.70E-09 |
| DVD765 | EGFR (sec. 2) | EGFR (sec. 1) | Largo | Largo | FL-hEGFR | 3.07E+04 | 2.61E-04 | 8.50E-09 |
| DVD766 | EGFR (sec. 1) | EGFR (sec. 2) | Largo | Largo | FL-hEGFR | 3.06E+05 | 1.21E-03 | 3.90E-09 |
| DVD825 | EGFR (sec. 2) | EGFR (sec. 1) | Corto | Largo | FL-hEGFR | 1.16E+04 | 2.95E-04 | 2.60E-08 |
| DVD826 | EGFR (sec. 1) | EGFR (sec. 2) | Corto | Largo | FL-hEGFR | 2.65E+05 | 1.10E-03 | 4.20E-09 |
| AB033 | EGFR (sec. 1) | | | | d2-7 trunc | 3.85E+05 | 1.06E-03 | 2.80E-09 |
| AB064 | EGFR (sec. 2) | | | | d2-7 trunc | 3.70E+04 | 6.82E-04 | 1.80E-08 |
| DVD321 | EGFR (sec. 2) | EGFR (sec. 1) | Corto | Corto | d2-7 trunc | 5.32E+04 | 4.55E-04 | 8.50E-09 |
| DVD322 | EGFR (sec. 1) | EGFR (sec. 2) | Corto | Corto | d2-7 trunc | 1.69E+05 | 5.70E-04 | 3.40E-09 |
| DVD795 | EGFR (sec. 2) | EGFR (sec. 1) | Largo | Corto | d2-7 trunc | 5.65E+04 | 2.53E-04 | 4.50E-09 |
| DVD796 | EGFR (sec. 1) | EGFR (sec. 2) | Largo | Corto | d2-7 trunc | 2.60E+05 | 5.02E-04 | 1.90E-09 |
| DVD765 | EGFR (sec. 2) | EGFR (sec. 1) | Largo | Largo | d2-7 trunc | 3.99E+04 | 2.16E-04 | 5.40E-09 |
| DVD766 | EGFR (sec. 1) | EGFR (sec. 2) | Largo | Largo | d2-7 trunc | 2.06E+05 | 4.56E-04 | 2.20E-09 |
| DVD825 | EGFR (sec. 2) | EGFR (sec. 1) | Corto | Largo | d2-7 trunc | 3.31E+04 | 2.40E-04 | 7.30E-09 |
| DVD826 | EGFR (sec. 1) | EGFR (sec. 2) | Corto | Largo | d2-7 trunc | 2.05E+05 | 4.84E-04 | 2.40E-09 |
| AB033 | EGFR (sec. 1) | | | | d-2-7 Cet | ND | ND | ND |
| AB064 | EGFR (sec. 2) | | | | d-2-7 Cet | 2.03E+04 | 6.60E-04 | 3.30E-08 |
| DVD321 | EGFR (sec. 2) | EGFR (sec. 1) | Corto | Corto | d-2-7 Cet | 2.49E+04 | 5.56E-04 | 2.20E-08 |
| DVD322 | EGFR (sec. 1) | EGFR (sec. 2) | Corto | Corto | d-2-7 Cet | 1.04E+04 | 4.34E-04 | 4.20E-08 |
| DVD795 | EGFR (sec. 2) | EGFR (sec. 1) | Largo | Corto | d-2-7 Cet | 2.42E+04 | 5.52E-04 | 2.30E-08 |
| DVD796 | EGFR (sec. 1) | EGFR (sec. 2) | Largo | Corto | d-2-7 Cet | 1.43E+04 | 4.48E-04 | 3.10E-08 |
| DVD765 | EGFR (sec. 2) | EGFR (sec. 1) | Largo | Largo | d-2-7 Cet | 2.65E+04 | 5.76E-04 | 2.20E-08 |
| DVD766 | EGFR (sec. 1) | EGFR (sec. 2) | Largo | Largo | d-2-7 Cet | 1.08E+04 | 4.45E-04 | 4.10E-08 |
| DVD825 | EGFR (sec. 2) | EGFR (sec. 1) | Corto | Largo | d-2-7 Cet | 2.56E+04 | 5.50E-04 | 2.20E-08 |
| DVD826 | EGFR (sec. 1) | EGFR (sec. 2) | Corto | Largo | d-2-7 Cet | 1.18E+04 | 4.45E-04 | 3.80E-08 |

La unión de todos los constructos de DVD-Ig caracterizada por la tecnología Biacore fue mantenida y fue comparable a la de los anticuerpos madre. Todos los dominios variables de terminal N son unidos con una alta afinidad similar a la del anticuerpo madre.

***Ejemplo 1.1.2: Análisis usado para determinar la actividad funcional de los anticuerpos madre y DVD-Ig***

***Ejemplo 1.1.2.A: Unión de célula A431***

Las células A431 en fase logarítmica fueron cosechadas de acuerdo con los métodos estándar. Cada muestra que contiene $5x10^4$ células (300 µl) fue incubada con dilución serial de las DVD-Igs en una cámara fría durante 1 hora. Las células después fueron teñidas con anticuerpo anti-humano de cabra conjugado con PE (Jackson ImmunoResearch Cat# 109-115-098) (300 µl) e incubadas en la cámara fría durante 30 minutos. Las células teñidas fueron analizadas en FACSCalibur HTS (Becton Dickinson, San Jose). Los datos fueron analizados con Prism (GraphPad Software, La Jolla). Los datos se muestran en la tabla 5.

***Ejemplo 1.1.2.B: Análisis obligatorio de competencia de unión de célula***

5 nM EGFR conjugado con FITC (sec. 2) fueron incubados con diluciones seriales de las DVD-Igs en hielo durante 15 minutos y entonces incubadas con $5x10^4$ células cosechadas de las células U87MG-de2-7 en fase logarítmica (300 µl) en la

cámara fría durante 1 hora. Las células teñidas fueron analizadas en FACSCalibur HTS (Becton Dickinson, San Jose). Los datos fueron analizados con Prism (GraphPad Software, La Jolla). Los datos se muestran en la tabla 5.

***Ejemplo 1.1.2.C: Western Blot: EGFR total (infra-regulación de receptor) y pTyr***

Las células A431 o U87MG-de2-7 en fase logarítmica fueron recubiertas en placas de 6 pozos a $1x10^6$ células por pozo (2 ml). Las células se dejaron en inanición en suero el día siguiente durante 24 horas. Las células entonces fueron tratadas con 100 nM de varios anticuerpos (30 µl) durante 1 hora y después fueron estimuladas con 15 nM EGF (0.5 µl) durante 10 minutos. Las células después fueron cosechadas y lisadas en el hielo con amortiguador de RIPA (150 µl por pozo) (Sigma). Los lisados celulares fueron separados en un gel de SDS-PAGE de acuerdo con los métodos estándar y después transferidos a la membrana de PVDF (Invitrogen). Las proteínas fueron detectadas por Western Blot usando varias sondas de anticuerpo. Los datos se muestran en la tabla 5.

***Ejemplo 1.1.2.D: Análisis de proliferación celular (Clonogenic)***

Las células A431 en fase logarítmica fueron recubiertas en placas de 96 placas a 300 células por pozo en 100 µl. Las células fueron tratadas con dilución serial de los anticuerpos el día siguiente e incubadas durante 7-10 días. Las células fueron

fijadas con 3.7% de paraformaldehído durante 20 minutos y después teñidas con 0.1% de violeta cristalina durante 1 hora. La violeta cristalina teñida fue extraída por 10% de ácido acético durante 1 hora y después cuantificada a OD590. Los datos se muestran en la tabla 5.

***Tabla 5: Análisis de DVD-Igs de EGFR***

| ID de DVD | ID de secuencia | Pos. | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio de DVD | Unión de A431 | Comp. de EGFR | Inhibición de señal de Ptyr | Infra-reg. de rec. de EGFR | Inhibición de prolif. celular |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD322 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | EGFR (sec. 1) | + | - | + | - | ND |
| DVD321 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Corto | Corto | EGFR (sec. 1) | - | + | - | + | ND |
| DVD766 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | EGFR (sec. 1) | + | + | + | - | ND |
| DVD765 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Largo | Largo | EGFR (sec. 1) | + | + | + | + | + |
| DVD796 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | EGFR (sec. 1) | + | + | - | - | ND |
| DVD795 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Largo | Corto | EGFR (sec. 1) | + | + | + | + | + |
| DVD826 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | EGFR (sec. 1) | + | + | - | - | ND |
| DVD825 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Corto | Largo | EGFR (sec. 1) | + | + | - | - | ND |

***Ejemplo 1.1.2.E: Infra-regulación de EGFR total en múltiples líneas de células de cáncer humanas por análisis de MSD***

Las células en fase logarítmica (A431, A431NS, A549 o HN5) fueron recubiertas en una placa de 96 pozos a $1x10^4$ células/pozo (100 µl) el día siguiente, las células fueron tratadas con diferentes anticuerpos (30 µl) en 100 nM durante 2 horas a 37°C. Las células entonces fueron cosechadas y los niveles de EGFR total fueron cuantificados con el análisis de EGFR total de kit de lisado celular (Meso Scale Discovery Cat# K151CKD-2) de

acuerdo con el protocolo del fabricante. Los datos se muestran en la tabla 6.

***Tabla 6: Infra-regulación de EGFR total en múltiples líneas de células de cáncer humanas por análisis de MSD***

| Porcentaje de control (100 nM) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Líneas celulares** | **EGFR (sec. 2)** | **EGFR (sec. 1)** | **DVD795** | **EGFR (sec. 2) + EGFR (sec. 1)** |
| A431 | 97 | 30 | 14 | 32 |
| A431NS | 98 | 44 | 24 | 43 |
| A549 | 91 | 29 | 7 | 29 |
| HN5 | 102 | 53 | 11 | 36 |
| NCI-H1975 | 94 | 35 | 15 | 25 |
| OVCAR5 | 94 | 34 | 12 | 36 |
| PC3 | 108 | 57 | 20 | 72 |
| U87MG | 96 | 58 | 18 | 59 |
| U87MG-EGFRwt | 86 | 57 | 13 | 39 |
| U87MG-de2-7 | 90 | 49 | 21 | 52 |

DVD795 mostró una infra-regulación de EGFR total en todas las líneas de células de cáncer humanas probadas.

***Ejemplo 1.1.2.G.: Bioensayo de Citocinas***

La capacidad de un anticuerpo madre anti-citocinas o de secuencias anti-citocinas que contienen DVD-Ig para inhibir o neutralizar una bioactividad de citocinas específica se analiza determinando el potencial inhibitorio del anticuerpo o DVD-Ig. Por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo anti-IL-4 para inhibir la producción de IgE mediada por IL-4 puede utilizarse. Por ejemplo, las células B no tratadas humanas se aíslan de la sangre periférica, respectivamente, las capas leucocitarias por centrifugación de densidad de Ficoll-paque, seguidas por la

separación magnética con micro-esferas MAC especificas (Miltenyi Biotech) para los anticuerpos (Fab)2 de cabra etiquetados con sIgD FITC humano. Las células B no tratadas clasificadas magnéticamente se ajustan a 3 x $10^5$ células por ml en XVI 5 y se colocan en placas en 100 µl por pozos de 96 placas en una serie 6 x 6 en el centro de la placa, rodeadas por los pozos llenos de PBS durante los 10 días de cultivo a 37° C en presencia de 5% de $CO_2$. Se preparara cada placa por anticuerpo para ser probada, que consiste de 3 pozos, cada uno de los controles es inducido y no inducido y se hacen repeticiones por quintuplicado de las titulaciones del anticuerpo que comienzan en 7 µg/ml y funcionan en la dilución 3 veces abajo para las concentraciones finales de 29 ng/ml agregadas en 50 µl de la pre-dilución concentrada cuatro veces. Para inducir la producción de IgE, rhIL-4 en 20 ng/ml más el anticuerpo monoclonal anti-CD40 (Novartis) en 0.5 µg/ml de concentraciones finales en 50 µl cada una se agregó a cada pozo, y las concentraciones de IgE se determinaron al final del período del cultivo por un método estándar del sándwich ELISA.

***Ejemplo 1.1.2.H: Ensayo de liberación de Citocinas***

La capacidad de un anticuerpo madre o DVD-Ig para ocasionar la liberación de citocinas se analiza. La sangre periférica se retira a partir de tres donantes sanos por punción venosa en los tubos para extracción por vacío heparinizados. La sangre entera se diluye 1:5 con el medio RPMI-1640 y se coloca

en placas de 24 pozos de cultivo de tejido en 0.5 ml por pozo. Los anticuerpos anti-citocinas (por ejemplo, anti-IL-4) se diluyen en RPMI-1640 y se colocan en las placas en 0.5 m/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 agrega LPS y PHA a los pozos separados en la concentración final de 2 µg/m y 5 µg/ml como un control positivo para la liberación de citocinas. IgG humano policlonal se utiliza como anticuerpo de control negativo. El experimento se realiza dos veces. Las placas se incuban a 37°C en 5% de $CO_2$. Veinticuatro horas después los contenidos de los pozos se transfieren en los tubos de prueba y se hacen girar durante 5 minutos a 1200 rpm. Los sobrenadantes libres de células se recolectan y se congelan para los ensayo de citocinas. Las células dejadas en las placas y en los tubos se disuelven con 0.5 ml de solución de lisis, y se colocan a -20°C y se deshielan. 0.5 ml del medio se agregan (para traer el volumen al mismo nivel que las muestras sobrenadantes libres de células) y las preparaciones de la célula se recolectan y se congelan por el ensayo de citocinas. Los sobrenadantes y lisados libres de células se analizan para los niveles de citocinas por ELISA, por ejemplo, para los niveles de IL-8, IL-6, IL-Iβ, IL-IRA, TNF-α.

***Ejemplo 1.1.2.I: Análisis de citotoxicidad dirigida nuevamente (rCTL) basado en FACS***

Las células T humanas CD3+ fueron aisladas de las PBMC

congeladas aisladas previamente por una columna de enriquecimiento de selección negativa (R&D Cat.#HTCC-525). Las células T fueron estimuladas durante 4 días en los frascos recubiertos con 10 µg/ml de anti-CD3 (OKT-3, BD) y 2 de µg/ml anti-CD28 (CD28.2, Abcam) en medio RPMI completo (L-glutamina, 55 mM β-ME, Pen/Strep, 10% de FCS). Las células T se dejaron reposar durante la noche en 30 U/ml de IL-2 (Peprotech) antes de usar en análisis. Las células objetivo DoHH2 o Raji fueron etiquetadas con PKH26 (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las células T efectoras (E) y objetivo (T) fueron recubiertas a $10^5$ y $10^4$ células/pozo en placas de 96 pozos (Costar #3799), para dar respectivamente una relación de E:T de 10:1. Las moléculas de DVD-Ig fueron diluidas apropiadamente para obtener curvas de titulación dependientes de concentración. Después de una incubación durante la noche, las células fueron granuladas y lavadas con PBS una vez antes de suspenderse nuevamente en 100 µl de PBS que contuvo 0.1% de BSA (Invitrogen) y 0.5 µg/ml de yoduro de propidio (BD). Los datos de FACS fueron recolectados en una máquina FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose) y analizados en Flowjo (Treestar). El porcentaje de objetivos vivos en las muestras tratadas con DVD-Ig dividido por el porcentaje de objetivos total (control, sin tratamiento) fue calculado para determinar el porcentaje de lisis específica. Los datos se representan gráficamente y las $CI_{50}$s se

calculan en Prism (Graphpad Software, La Jolla).

***Ejemplo 1.1. Análisis citotoxicidad dirigida nuevamente (rCTL) basado en la impedancia***

Las células T fueron preparadas como arriba. Las células objetivo de expresión de EGFR se dejaron adherirse a las placas de 96 pozos ACEA RT-CES (ACEA Bio, San Diego) durante la noche. Las células T efectoras (E) y objetivo (T) entonces fueron recubiertas a $2x10^5$ y $2x10^4$ células/pozo para dar una relación de E:T de 10:1. Las moléculas de DVD-Ig fueron diluidas apropiadamente para obtener las curvas de titulación dependientes de concentración. Los índices de objetivos en las muestras tratadas con DVD-Ig fueron divididos por los índices celulares de objetivos de control (sin tratamiento) para calcular el porcentaje de lisis específica. Los datos fueron representados gráficamente y los valores $CI_{50}$s fueron calculados en Prism (Graphpad Software, La Jolla). Los datos se muestran en el tabla 7

***Tabla 7: Actividad de rCTL de EGFR (sec. 2) que contiene las DVD-Igs***

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio de DVD | CI50 de actividad de rCTL (pM) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD774 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | CD3 | 0.2 |
| DVD773 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Largo | Largo | CD3 | 16 |
| DVD804 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | CD3 | 0.09 |
| DVD803 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Largo | Corto | CD3 | 42 |
| DVD332 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | CD3 | 0.03 |
| DVD331 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Corto | Corto | CD3 | >200 nM |
| DVD834 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | CD3 | 0.08 |
| DVD833 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Corto | Largo | CD3 | 12 |

Todas las DVD-Igs que contiene VDs de AB002 en la posición de la terminal N o terminal C mostraron eliminación en el análisis de rCTL.

***Ejemplo 1.1.2.C: Estudio de Radioactividad Cruzada de Citocinas***

La capacidad de un anticuerpo madre anti-citocinas o DVD-Ig dirigido a una citocina de interés para cruzar la reacción con otras citocinas se analizan. Los anticuerpos madre o DVD-Ig se inmovilizan en una matriz bio-sensora BIAcore. Un Fc mAb anti-humano está covalentemente ligado vía grupos amina libres en la matriz de dextrano activando primero grupos carboxilos en la matriz con 100 mm N-hidroxisuccinimida (NHS) y 400 mm de N-etil-N'(3-dimetilaminopropil)-clorhidrato de carbodiimida (EDC). Aproximadamente 50 µl de cada anticuerpo o preparación de DVD-Ig en una concentración de 25 µg/ml, diluida en acetato de sodio, pH 4.5, se inyecta a través del biosensor activado y las aminas libres en la proteína están unidas directamente en los grupos carboxilos activados. Normalmente, se inmovilizan 5000 unidades de resonancia (RU's). Los ésteres-EDC sin reaccionar de la matriz son desactivados por una inyección de etanolamina de 1 M. Una segunda célula de flujo se prepara como un estándar de referencia inmovilizando el IgG1/K humano usando el kit de acoplamiento de amina estándar. Las medidas de SPR se realizan usando el chip biosensor CM. Todos los antígenos que se analizarán en la superficie del biosensor se diluyen en el

amortiguador de función de HBS-EP que contiene 0.01% P20.

Para examinar la especificidad de unión de la citocinas, el exceso de citocinas de interés (100 nm, recombinante humano soluble, por ejemplo) se inyecta a través del anticuerpo madre anti-citocinas o de la superficie del biosensor inmovilizada por DVD-Ig (tiempo de contacto 5 minutos). Antes de la inyección de la citocinas de interés e inmediatamente después, el amortiguador HBS-EP solo fluye a través de cada célula de flujo. La diferencia neta en las señales entre la línea base y el punto que corresponde a aproximadamente 30 segundos después de completar la inyección de citocinas se toma para representar el valor de unión final. Nuevamente, la respuesta se mide en unidades de resonancia. Las matrices biosensoras se regeneran utilizando 10 mm HCl antes de la inyección de la siguiente muestra donde se observa un evento de unión, de otra manera el amortiguador en función fue inyectado sobre las matrices. Las citocinas humanas (por ejemplo, IL-Iα, IL-Iβ, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-I I, 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 inyectan simultáneamente sobre la superficie de referencia IgGI/K de ratón inmovilizada para registrar cualquier antecedente de unión no específico. Preparando una referencia y reacción superficial, Biacore puede automáticamente restar los datos de la superficie de referencia de los datos de la superficie de reacción para eliminar la mayor parte

del ruido de inyección y cambio del índice de refracción. Por lo tanto, es posible comprobar la respuesta de unión verdadera atribuida a un anticuerpo anti-citocinas o a una reacción de unión de DVD-Ig.

Cuando una citocina de interés se inyecta a través del anticuerpo anti-citocinas inmovilizado, se observa la unión significativa. La regeneración de 10 mm HCl retira completamente todas las proteínas no covalentemente asociadas. La examinación del sensograma muestra que el anticuerpo anti-citocinas inmovilizado o DVD-Ig que une a las citocinas soluble es fuerte y robusto. Después de confirmar el resultado previsto con las citocinas de interés, el panel de citocinas humanas recombinantes restantes se prueba, para cada anticuerpo o DVD-Ig por separado. La cantidad de anticuerpo anti-citocinas o unión de DVD-Ig o citocinas sin unir para cada ciclo de inyección se registra. Los resultados de tres experimentos independientes se utilizan para determinar el perfil de especificidad de cada anticuerpo o DVD-Ig. Los anticuerpos o DVD-Ig con la unión prevista a las citocinas de interés y sin unir a cualquier otra citocina se seleccionan.

***Ejemplo 1.1.2.D: Reactividad Cruzada del Tejido***

Los estudios de la reactividad cruzada del tejido se hacen en tres etapas, con la primera etapa que incluye criosecciones de 32 tejidos, la segunda etapa incluye hasta 38 tejidos, y en la 3ra etapa incluye tejidos adicionales a partir de 3 adultos sin relación

como se describe más abajo. Los estudios se hicieron normalmente en dos niveles de dosis.

**Etapa 1:** Criosecciones (aproximadamente 5 µm) de los tejidos humanos (32 tejidos (normalmente: Glándula Suprarrenal, Aparato Gastrointestinal, Próstata, Vejiga, Corazón, Músculo Esquelético, Glóbulos, Riñón, Piel, Médula, Hígado, Médula Espinal, Pecho, Pulmón, Bazo, Cerebelo, Nodo de Linfa, Testículos, Corteza Cerebral, Ovario, Timo, Colon, Páncreas, Tiroides, Endotelio, Paratiroides, Uréter, Ojo, Pituitaria, Útero, Tubo de Falopio y Placenta) de un donante humano obtenido en la autopsia o biopsia) son fijados y secados en el vidrio objeto. La coloración de peroxidasa de las secciones del tejido se realiza, usar el sistema de avidina-biotina.

**Etapa 2:** Criosecciones (aproximadamente 5 µm) de 38 tejidos, tejidos humanos (incluyendo suprarrenal, sangre, vaso sanguíneo, médula, cerebelo, cerebro, cerviz, esófago, ojo, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, nodo de linfa, glándula mamaria de seno, ovario, oviducto, páncreas, paratiroides, nervio periférico, pituitaria, placenta, próstata, glándula salival, piel, intestino delgado, médula espinal, bazo, estómago, músculo estriado, testículo, timo, tiroides, amígdala, uréter, vejiga urinaria, y útero) de 3 adultos sin relación obtenidos en la autopsia o biopsia) se fijan y secan en el vidrio objeto. La coloración de la peroxidasa de las secciones se realiza, usando el sistema de avidina-biotina.

**Etapa 3:** Criosecciones (aproximadamente 5 µm) de los tejidos de mono de cynomolgus (38 tejidos (incluyendo suprarrenal, sangre, vaso sanguíneo, médula, cerebelo, cerebro, cerviz, esófago, ojo, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, nodo de linfa, glándula mamaria del pecho, ovario, oviducto, páncreas, las paratiroides, nervio periférico, pituitaria, placenta, próstata, glándula salival, piel, pequeño intestino, médula espinal, bazo, estómago, músculo estriado, testículo, timo, tiroides, amígdala, uréter, vejiga urinaria, y útero) de 3 monos adultos sin relación obtenidos en la autopsia o biopsia) se fijaron y secaron en un vidrio objeto. La coloración de la peroxidasa de las secciones del tejido se realiza, usando el sistema de avidina-biotina.

El anticuerpo o DVD-Ig se incubó con IgG anti-humano biotinilado secundario y se desarrolló en un complejo inmune. El complejo inmune en las concentraciones finales de 2 y 10 µg/ml del anticuerpo o DVD-Ig se agregó en las secciones del tejido en el vidrio objeto y después las secciones del tejido se hicieron reaccionar durante 30 minutos con un kit de avidina-biotina-peroxidasa. Posteriormente, DAB (3,3'-diaminobencidina), un sustrato para la reacción de peroxidasa, se aplica durante 4 minutos para la coloración del tejido. Los granos del Antígeno-Sefarosa se utilizan como secciones de tejido de control positivas. El antígeno y los estudios de bloqueo del suero humano específicos sirven como controles adicionales. El complejo

inmune en las concentraciones finales de 2 y 10 µg/ml del anticuerpo o DVD-Ig se pre-incuba con el antígeno específico (concentración final de 100 µg/ml) o el suero humano (concentración final de 10%) durante 30 minutos, y después se agrega en las secciones del tejido en el vidrio objeto y después las secciones del tejido se hacen reaccionar durante 30 minutos con un kit de avidina-biotina-peroxidasa. Posteriormente, DAB (3,3'-diaminobencidina), un sustrato para la reacción de peroxidasa, se aplican durante 4 minutos para la coloración del tejido.

Cualquier coloración específica se juzga para ser una reactividad esperada o no esperada (por ejemplo, consistente con la expresión del antígeno) basada en la expresión conocida del antígeno específico en cuestión. Cualquier coloración específica juzgado se anota por intensidad y frecuencia. El tejido de coloración entre la etapa 2 (tejido humano) y la etapa 3 (tejido de mono cynomolgus) se juzga por ser similar o diferente.

***Ejemplo 1.1.2.E: Efecto de Tumoricidad de un Anticuerpo Madre o DVD-Ig in vitro***

Los anticuerpos madre o DVD-Ig que se unen a antígenos específicos en las células tumorales pueden analizarse por la actividad tumoral. Brevemente, los anticuerpos madre o DVD-Ig se diluyen en D-PBS-BSA (Solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco con 0.1% BSA) y agregan a las células tumorales humanas en las concentraciones finales de 0.01 µg/ml

a 100 µg/ml. Las placas se incuban a 37°C en una atmósfera de 5% $CO_2$, humedecida durante 3 días. El número de células vivas en cada pozo se cuantifica usando reactivos MTS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI) para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor. Los pozos sin el tratamiento del anticuerpo se utilizan como controles de inhibición del 0% mientras que los pozos sin células se consideran para mostrar 100% de inhibición.

Para la evaluación de apoptosis, la activación de caspasa-3 se determina por el protocolo siguiente: las células tratadas por anticuerpo en placas de 96 pozos se lisiaron en 120 µl de amortiguador lisis 1x (1.67 mm Hepes, pH 7.4, 7 mm de KCl, 0.83 mm $MgCl_2$, EDTA, 0.11 mm, 0.11 mm EGTA, 0.57% CHAPS, 1 mm DTT, 1x tableta coctel inhibidor de proteasa; EDTA-libre; Roche Pharmaceuticals, Nutly, NJ) a temperatura ambiente con agitación durante 20 minutos. Después del lisis de la célula, 80 µl de un amortiguador de reacción de caspasa-3 (48 mm Hepes, pH 7.5, 252 mm de sucrosa, 0.1% CHAPS, 4 mm DTT, y 20 µm de sustrato Ac-DEVD-AMC; Biomol Research Labs, Inc., Plymout Meeting, PA) se agregaron y las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C. Las placas se leyeron en un contador 1420 VICTOR Multilabel Counter (Perkin Elmer Life Sciences, Downer Grove, Il) usando los ajustes siguientes: excitación = 360/40, emisión = 460/40. Un aumento de las unidades de la fluorescencia de las células tratadas con anticuerpo con relación a las células tratadas por

control del anticuerpo de isotipo se considera, lo cual es indicativo de apoptosis.

***Ejemplo 1.1.2.F: Inhibición de la Activación del Receptor por Anticuerpos o DVD-Ig in Vitro***

Los anticuerpos madre o DVD-Ig que se unen a los receptores celulares o a sus ligandos pueden probarse para la inhibición de la activación del receptor. Los anticuerpos madre o DVD-Ig diluidos en D-PBS-BSA (Solución salina amortiguada de fosfato Dulbecco con 0.1% BSA) se agregan a las células carcinoma humanas en las concentraciones finales de 0.01 µg/ml a 100 µg/ml. Las placas se incuban a 37°C en una atmósfera de 5% de $CO_2$, humedecida durante 1h. Los factores de crecimiento (por ejemplo, IGFI o IGF2) en la concentración de 1-100 ng/ml se agregan a las células durante 5-15 minutos para estimular el receptor de autofosforilación (por ejemplo, IGFIR). Los pozos sin tratamiento del anticuerpo se utilizan como controles de 0% de inhibición mientras que los pozos sin el estímulo del factor de crecimiento se consideran para mostrar el 100% de inhibición. El lisado de las células se hacen por incubación con el amortiguador de extracción de la célula (10 mm Tris, pH 7.4, 100 mm NaCl, 1 mm EDTA, 1 mm EGTA, 1 mm NaF, 1 mm de ortovanadato de sodio, 1% Tritón X-100, 10% glicerol, 0.1% SDS, y coctel del inhibidor de proteasa). Fosfo-IGFIR en estos lisados de la célula se determina usando los kits específicos de ELISA comprados de R&D Systems (Minneapolis, MN).

***Ejemplo 1.1.2.G: Eficacia de un Anticuerpo Antígeno Celular Anti-Tumor o DVD-Ig por sí mismo o en Combinación con Quimioterapia en el Crecimiento de Xenoinjertos de Carcinoma Humano (Flanco Subcutáneo, Ortotópico, o Metástasis Espontáneas)***

Las células cancerosas humanas son crecidas in vitro en 99% de viabilidad, 85% en frascos de cultivo de tejido. Los ratones hembras o machos SCID (Charles Rivers Labs) de 19-25 gramos son afeitados y etiquetados en el oído. Los ratones después se inocularon subcutáneamente en el flanco derecho con 0.2 ml de 2 x $10^6$ células tumorales humanas (1:1 matrigel) el día 0 del estudio. La Administración (IP, Q3D/semana) del vehículo (PBS), anticuerpo o DVD-Ig, y/o quimioterapia se inicia después de que los ratones se clasificaron emparejados en jaulas para ratones separadas con los volúmenes del medio tumoral de aproximadamente 150 a 200 $mm^3$. Los tumores se miden por un par de calibradores dos veces por semana iniciando aproximadamente el 10 post inoculación y los volúmenes tumorales son calculados de acuerdo a la fórmula $V = L \times W^2/2$ (V: volumen, $mm^3$; L: longitud, mm. W: anchura, mm). La reducción en volumen tumoral se considera en animales tratados con el anticuerpo o DVD-Ig solo o en combinación con quimioterapia con relación a los tumores en animales que recibieron únicamente el vehículo o un control de isotopo mAb.

***Ejemplo 1.1.2.H: Unión de Anticuerpos Monoclonales en la Superficie de las Líneas Celulares Tumorales Humanas según***

***lo Evaluado por la Citometria de Flujo***

El antígeno superficial de la célula que sobre-expresa las líneas celulares estables de interés o líneas celulares tumorales humanas se cosechó en frascos de cultivo del tejido y se suspendió nuevamente en 5% de suero de becerro fetal (PBS/FCS) que contiene una solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Antes de la coloración, las células tumorales humanas fueron incubadas en hielo con IgG humano en 200 µg/ml en PBS/FCS. Las células 1-5 x $10^5$ se incubaron con el anticuerpo o DVD-Ig (1-2 µg/ml) en PBS/FCS durante 30-60 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces y se agregaron 100 µl de IgG-ficoeritrina anti ratón de cabra (1:300 dilusión en PBS/BSA) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat. #115-115-164). Después de la incubación en hielo durante 30 minutos, las células se lavaron dos veces y re-suspendieron en PBS/FCS. La fluorescencia se midió usando un Becton Dickinson FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los datos se muestran en la tabla 8.

***Tabla 8: Unión de FACS para EGFR (sec. 2) que contiene las DVD-Igs***

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | EC50 de FACS de Jurkat (pM) | % de madre en FACS U287IΔ2-7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD774 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | CD3 | 890 | 70 |
| DVD773 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Largo | Largo | CD3 | >10 nM | 105 |
| DVD804 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | CD3 | 650 | 70 |
| DVD803 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Largo | Corto | CD3 | >10 nM | 110 |
| DVD332 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | CD3 | 775 | 40 |
| DVD331 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Corto | Corto | CD3 | >50 nM | 115 |
| DVD834 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | CD3 | 700 | 65 |
| DVD833 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Corto | Largo | CD3 | >10 nM | 110 |

Todas las DVD-Igs mostraron unión a sus objetivos de superficie de célula. Los dominios de terminal N de las DVD-Igs unieron sus objetivos en la superficie de célula así como o fueron mejorares que el anticuerpo madre. La unión puede ser restaurada o mejorada ajustando la longitud del enlace.

***Ejemplo 1.2: Generación de Anticuerpos Monoclonales Madre en un Antígeno Humano de Interés***

El ratón madre mAbs capaz de unirse a y neutralizar un antígeno humano de interés y una variante del mismo se obtiene como sigue:

***Ejemplo 1.2.A: Inmunización de Ratones con un Antígeno Humano de Interés***

Veinte microgramos del antígeno humano purificado recombinante (por ejemplo, IGF1,2) mezclado con el adyuvante Freund o adyuvante de inmunoensayo (Qiagen, Valencia, CA) se inyectan subcutáneamente en cinco ratones C57B/6, Balb/C de 6-8 semanas de edad, y cinco ratones AJ el día 1. En los días 24, 38, y 49, veinte microgramos del mezclado variante de antígeno humano purificada recombinante con el adyuvante Freund incompleto o adyuvante de imnunoensayo se inyectan subcutáneamente en los mismos ratones. El día 84 o día 112 o día 144, los ratones se inyectan intravenosamente con 1 µg de antígeno humano purificado recombinante de interés.

***Ejemplo 1.2. B: Generación de Hibridoma***

Los esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados

descritos en el ejemplo 1.2.A se fusionan con las células SP2/O-Ag-14 en una relación de 5:1 de acuerdo al método establecido descrito en Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495 para generar hibridomas. Los productos de fusión se colocan en placas en un medio de selección que contiene azaserina e hipoxantina en placas de 96 pozos en una densidad de 2.5 x $10^6$ de células del bazo por pozo. Se observan las colonias macroscópicas de hibridoma de siete a diez días post fusión. El sobrenadante de cada pozo que contiene colonias de hibridoma se prueba por ELISA por la presencia del anticuerpo en el antígeno de interés (según lo descrito en el ejemplo 1.2.A). Los sobrenadantes que exhiben actividad antígeno-específica después se prueba por la actividad (según lo descrito en los ensayo del ejemplo 1.1.2), por ejemplo, la capacidad de neutralizar el antígeno de interés en una prueba biológica tal como se describe en el ejemplo 1.1.2.A).

***Ejemplo 1.2.C: Identificación y Caracterización de Anticuerpos Monoclonales Madre en un Antígeno Específico Humano de Interés***

***Ejemplo 1.2.C.1: Análisis de la Actividad de Neutralización del Anticuerpo Monoclonal Madre***

Los sobrenadantes de hibridoma se analizaron por la presencia de anticuerpos madre que unen un antígeno de interés, generados de acuerdo a los ejemplos 1.2.A y 1.2.B, y también son los que pueden unirse a una variante del antígeno de interés ("variante de antígeno"). Los sobrenadantes con los anticuerpos

JSB

positivos en ambos ensayos se prueban después por su potencia en la neutralización de antígeno, por ejemplo, en la prueba biológica de citocinas del ejemplo 1.1.2.A. Los anticuerpos que producen hibridomas con valores $IC_{50}$ en la prueba biológica menos de 1,000 pm, en una modalidad, menos de 100 pm se hacen a escala y se clonan por dilución limitada. Las células de hibridoma se expanden en los medios que contienen 10% IgG suero fetal vacuno bajo (Hiclone #SH30151, Logan, UT.). En promedio, 250 ml de cada sobrenadante de hibridoma (derivado de una población clónica) se cosechan, concentran y purifican por cromatografía de afinidad de la proteína A, según lo descrito en Harlow, E. y Lane, D. 1988 "Antibodies: A Laboratoy Manual". La capacidad de mAbs purificado para inhibir la actividad de su antígeno objetivo se determina, por ejemplo, usando la prueba biológica de las citocinas según lo descrito en el ejemplo 1.1.2.A.

***Ejemplo 1.2.C.2: Análisis de la Reactividad Cruzada del Anticuerpo Monoclonal Madre con el Antígeno Específico de Cynomolgus de Interés***

Para determinar si los mAbs seleccionados descritos en la presente reconocen el antígeno de cynomolgus de interés, el análisis de BIACORE se conduce según lo descrito en la presente (ejemplo 1.1.1.B) usando el antígeno especifico de cynomolgus recombinante. Además, las potencias de neutralización de mAbs contra el antígeno de cynomolgus recombinante de interés también pueden medirse en la prueba biológica de citocinas

(ejemplo 1.1.2.A). MAbs con buena reactividad cruzada de cino (en una modalidad, dentro cinco veces de la reactividad para el antígeno humano) se selecciona para la caracterización futura.

***Ejemplo 1.2.D: Determinación de la Secuencia del Aminoácido de la Región Variable para cada Anticuerpo Monoclonal Anti-Humano Murino***

El aislamiento de los cADNs, expresión y caracterización de mAbs de ratón anti-humano recombinante se conduce como sigue. Para cada determinación de secuencia de aminoácido, aproximadamente 1 x $10^6$ de las células de hibridoma son aisladas por centrifugación y procesadas para aislar el ARN total con Trizol (Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se somete a la primera síntesis del filamento de ADN usando el Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA) por instrucciones del fabricante. Oligo(dT) que se utiliza para cebar la síntesis del primer-filamento para seleccionar poli(A)+ARN. El producto de cADN del primer-filamento después se amplifica por PVR con cebadores diseñados para amplificar las regiones variables de inmunoglobulina murino (Ig-Primer Sets, Novagen, Madison, WI). Los productos PCR se resuelven en un gel de agarosa, suprimidos, purificados, y después subclonados con el kit de reproducción TOPO en el vector de pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y transformados en E. Coli el componente químicamente TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La colonia PCR

se realiza en los transformantes para identificar los insertos que contienen los clones. El ADN plásmido se aísla de los insertos que contienen clones usando un kit de QIAprep Miniprep (Qiagen, Valencia, CA). Los insertos en los plásmidos se ordenan en filamentos para determinar las secuencias de ADN de cadena ligera variable o pesada variable usando cebadores inversos M13 y delanteros M13 (Fermantas Life Sciences, Hanover MD). Las secuencias de cadena ligera variable y pesada variable de los mAbs se identifican. En una modalidad, los criterios de selección para un panel de derivaciones mAbs para el desarrollo de la siguiente etapa (humanización) incluyen lo siguiente:

- El anticuerpo no contiene ningún sitio de glicosilación ligado a N (NXS), excepto del estándar en CH2
- El anticuerpo no contiene ninguna cisteína adicional en adición a las cisteínas normales en cada anticuerpo
- La secuencia del anticuerpo se alinea con las secuencias de línea germinal humanas más cercanas para VH y VL y cualquier aminoácido inusual deberá comprobarse para conocer si hay ocurrencia en otros anticuerpos humanos naturales
- La glutamina terminal N (Q) se cambia a ácido Glutámico (E) si no afecta la actividad del anticuerpo. Esto reducirá la heterogeneidad debido a la ciclización de Q

La división eficiente de la secuencia de la señal se confirma por Mass Spectrophotometry. Esto puede hacerse con la célula COS ó 293 de material celular

- La secuencia de la proteína se comprueba por el riesgo de haber des-amidación de Asn que podría resultar en la pérdida de actividad
- El anticuerpo 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 Dynamic Light Scattering (DLS)
- El anticuerpo tiene una heterogeneidad de carga baja
- El anticuerpo carece la liberación de citocinas (ver ejemplo 1.1.2. B)
- El anticuerpo tiene especificidad para el citocinas deseadas (ver ejemplo 1.1.2.C)
- El anticuerpo carece reactividad cruzada de tejido inesperada (ver ejemplo 1.1.2.D)
- El anticuerpo tiene similitud entre la reactividad cruzada del tejido de cynomolgus y humano (ver ejemplo 1.1.2. D)

***Ejemplo 1.2.2: Anticuerpos Madre Humanizados Recombinantes***

***Ejemplo 1.2.2.1: Construcción y Expresión de Anticuerpos Madre Anti-Humanos Quiméricos Recombinantes***

El ADN que codifica la región constante de cadena pesada de mAbs madre anti-humano murino se sustituye por un fragmento de cADN que codifica las mutaciones del aminoácido de región de 2 bisagras que contiene la región constante IgG por

recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de una leucina a alanina en la posición 235 (Lund y colaboradores (1991) J. Immunol., 147:2657). La región constante de cadena ligera de cada uno de estos anticuerpos se sustituye por una región constante kappa humana. Los anticuerpos quiméricos integrales se expresan transitoriamente en las células COS por la co-transfección del cADNs de cadena pesada y ligera quimérica ligada en el plásmido de expresión pBOS (Mizushima y Nagune (1990) Nucl. Acids Res. 18:5322). Los sobrenadantes celulares que contienen el anticuerpo quimérico recombinante son purificados por cromatografía de la Proteína A Sefarosa y el anticuerpo de unión se eluye por la adición del amortiguador ácido. Los anticuerpos se neutralizan y se dializan en PBS.

El cADN de cadena pesada que codifica un mAb quimérico es co-transfectado con su cADN de cadena ligera quimérico (ambos ligados en el vector pBOS) en las células COS. El anticuerpo quimérico recombinante que contiene sobrenadante de la célula se purifica por cromatografía de la Proteína A Sefarosa y el anticuerpo de unión se eluye por la adición del amortiguador ácido. Los anticuerpos se neutralizan y se dializan en PBS.

Los mAbs madre anti-humanos quiméricos purificados después se prueban por su capacidad para unir (por Biacore) y para la actividad funcional, por ejemplo, para inhibir la producción inducida de citocinas de IgE como se describe en los ejemplos

1.1.1.B y 1.1.2.B. El mAbs quimérico que mantiene la actividad de los mAbs parentales de hibridoma se selecciona para el desarrollo futuro.

***Ejemplo 1.2.2.2: Construcción y Expresión de los Anticuerpos Madre Anti-Humano Humanizados***

***Ejemplo 1.2.2.2.A: Selección de Estructuras de Anticuerpo Humanos***

Cada secuencia de gen de cadena ligera variable y pesada variable murino se alinea por separado contra 44 secuencias de cadena ligera variable de 46 de línea germinal o cadena pesada variable de 44 de línea germinal de inmunoglobulina humana (derivadas del sitio web NCBI IG Blast en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html.) usando el software del vector NTI.

La humanización se basa en la homología de la secuencia del aminoácido, análisis del grupo CDR, frecuencia del uso entre anticuerpos humanos expresados, y la información disponible en las estructuras cristalinas de anticuerpos humanos. Considerando los efectos posibles en la unión del anticuerpo, el apareamiento de VH-VL, y otros factores, los residuos murinos se transforman a residuos humanos donde los residuos estructurales murino y humanos son diferentes, con algunas excepciones. Las estrategias de humanización adicional se diseñan basadas en un análisis de las secuencias de anticuerpo de línea germinal humanas, o un subgrupo del mismo, que poseyó un alto nivel de

homología, es decir, semejanza de la secuencia, a la secuencia de aminoácido real de las regiones variables del anticuerpo murino.

La modelación de la homología se utiliza para identificar los residuos únicos en las secuencias del anticuerpo murino que se predicen por ser críticos en la estructura del sitio de combinación del anticuerpo, los CDRs. La modelación de la homología es un método de cómputo por el que las coordenadas tridimensionales aproximadas se generen para una proteína. La fuente de las coordenadas iniciales y guía para su refinamiento adicional es una segunda proteína, la proteína de referencia, para la cual se conocen las coordenadas tridimensionales y la secuencia de la cual se relaciona con la secuencia de la primera proteína. La relación entre las secuencias de las dos proteínas se utiliza para generar una correspondencia entre la proteína de referencia y la proteína para las cuales se desean las coordenadas, la proteína específica. Las secuencias primarias de las proteínas de referencia y específicas se alinean con las coordenadas de las porciones idénticas de las dos proteínas transferidas directamente de la proteína de referencia a la proteína específica. Las coordenadas para las porciones desiguales de las dos proteínas, por ejemplo, de mutaciones del residuo, insertos, o supresiones, se construyen de plantillas estructurales genéricas y energía refinada para asegurar la consistencia con las coordenadas modelo ya transferidas. Esta estructura de cómputo

de la proteína puede refinarse o usarse adicionalmente de forma directa en el modelado de estudios. La calidad de la estructura modelo se determina por la exactitud de la contención donde las proteínas de referencia y específicas se relacionan y la precisión con las cuales se construye la alineación de la secuencia.

Para los mAbs murino, una combinación de búsqueda de BLAST e inspección visual se utiliza para identificar las estructuras de referencia convenientes. La identidad de la secuencia del 25% entre la referencia y las secuencias del aminoácido específico se consideran como mínimo necesario para intentar un ejercicio de homología modelo. Las alineaciones de la secuencia se construyen manualmente y los coordenadas modelo se generan con el programa Jackal (ver Petrey D. y colaboradores, (2003) Proteins 53 (Suppl. 6): 430-435).

Las secuencias primarias de las regiones estructurales humanas y murino de los anticuerpos seleccionados comparten identidad significativa. Las posiciones del residuo que difieren son candidatos a la inclusión del residuo murino en la secuencia humanizada para conservar la potencia de unión observada del anticuerpo murino. Una lista de residuos estructurales que difiefen entre las secuencias humanas y murino se construye manualmente.

La probabilidad que un residuo estructural dado afectara las propiedades de unión del anticuerpo depende de su proximidad a los residuos CDR. Por lo tanto, usando las estructuras modelo,

los residuos que difieren entre las secuencias murino y humanas se clasifican de acuerdo a su distancia desde cualquier átomo en el CDRs. Esos residuos que se ubicaron dentro de 4.5 A de cualquier átomo CDR se identifican como lo más importante y se recomiendan para ser candidatos a la retención del residuo murino en el anticuerpo humanizado (es decir, mutación inversa).

Los anticuerpos humanizados construidos *in silico* son construidos utilizando oligonucleótidos. Para cada región variable de cADN, 6 oligonucleótidos de 60-80 nucleótidos cada uno se diseña para traslaparse por 20 nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de cada oligonucleótido. En una reacción recocida, todos los 6 oligonulceótidos se combinan, hierven, y se reconocen en presencia de dNTPs. La polimerasa I de ADN, fragmento Large (Klenow) (Nueva England Biolabs #M0210, Beverley, MA.) se agrega para llenar los orificios en aproximadamente 40 bp entre los oligonucleótidos traslapados. PCR se realiza para amplificar el gen de la región variable completa usando dos cebadores exteriores que contienen las secuencias sobresalientes complementarias en el sitio de clonación múltiple en un vector pBOS modificado (Mizushima, S. and Nagune, 1990) Nucleic Acids Res. (18:17). Los productos PCR derivados del montaje de cada cADN se separan en un gel de agarosa y la banda que corresponde al tamaño de cADN región variable prevista se extirpa y purifica. La región pesada variable se inserta en la estructura en un fragmento de cADN que codifica las mutaciones

del aminoácido región 2-bisagras que contiene la región constante IgG1 humana por 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 y colaboradores (1991) J. Immunol. 147:2657). La región de cadena ligera variable se inserta en la estructura con la región constante kappa humana por recombinación homóloga. Las colonias bacterianas se aíslan y el ADN del plásmido se extrae. Los insertos de cADN son ordenados en su totalidad. Las cadenas pesada y ligera humanizadas correctas que corresponden a cada anticuerpo son co-transfectadas en las células COS para producir transitoriamente los anticuerpos anti-humanos humanizados integrales. El anticuerpo quimérico recombinante que contiene sobrenadantes celulares son purificados por cromatografía de la Proteína A Sefarosa y el anticuerpo unido se eluyó por la adición del amortiguador ácido. Los anticuerpos se neutralizan y se dializan en PBS.

***Ejemplo 1.2.2.3: Caracterización de los Anticuerpos Humanizados***

La capacidad de anticuerpos humanizados purificados para inhibir una actividad funcional se determina, por ejemplo, usando la prueba biológica de las citocinas según lo descrito en los ejemplos 1.1.2.A. Las afinidades de unión de los anticuerpos humanizados al antígeno humano recombinante se determinan

usando la medición de la resonancia del plasmón superficial (Biacore®) según lo descrito en el ejemplo 1.1.1.B. Los valores $IC_{50}$ de las pruebas biológicas y de la afinidad de los anticuerpos humanizados se clasifican. Los mAbs humanizados que mantienen completamente la actividad de los mAbs parentales del hibridoma se seleccionan como candidatos para el desarrollo futuro. Los 2-3 mAbs superiores humanizados más favorables se caracterizan adicionalmente.

***Ejemplo 1.2.2.3.A: Análisis Farmacocinético de Anticuerpos Humanizados***

Los estudios farmacocinéticos se llevan a cabo en ratas Sprague-Dawley y monos Cynomolgus. Las ratas macho y hembra y monos cynomolgus se dosifican intravenosa o subcutánamente con una sola dósis de 4mg/kg mAb y las muestras se analizan usando el antígeno de captura ELISA, y los parámetros farmacocinéticos son determinados por el análisis no-compartimental. Brevemente, las placas de ELISA están cubiertas con el anticuerpo anti-biotina de cabra (5 mg/ml, 4°C, durante la noche), bloqueadas con Superblock (Pierce), e incubadas con el antígeno humano biotinilatado en 50 ng/ml en 10% de Superblock TTBS a temperatura ambiente durante 2 horas. Las muestras de suero se diluyen serialmente (0.5% suero, 10% Superblock en TTBS) y se incuban en la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. La detección se realiza con el anticuerpo anti humano

de cabra etiquetado HRP y las concentraciones se determinan con la ayuda de curvas estándar usando el ajuste logístico no-compartimental. Los valores para los parámetros farmacocinéticos son determinados por el modelo no compartimental usando software WinNonlin (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Se seleccionan los mAbs humanizados con buen perfil farmacinético (T1/2 es 8-13 días o mejores, con baja separación y excelente biodisponibilidad 50-100%).

***Ejemplo 1.2.2.3.B: Ensayo de Estabilidad Fisicoquímico e in vitro de Anticuerpos Monoclonales Humanizados***

***Cromatografía de Exclusión de Tamaño***

Los anticuerpos se diluyen a 2.5 mg/ml con agua y 20 ml se analizan en un sistema Shimadzu HPLC usando una columna TSK G3000 SWXL (Tosoh Bioscience, cat# k5539-05k). Las muestras se eluyen de la columna con 211 mm de sulfato sódico, 92 mm de fosfato sódico, pH 7.0, en un caudal de 0.3 ml/minuto. Las condiciones de operación del sistema HPLC son las siguientes:

Fase móvil: 211 mm $Na_2SO_4$, 92 mm $Na_2HPO_4*7H_2O$, pH 7.0

Gradiente: Isosástica

Flujo: 0.3 ml/minuto

Longitud de onda del detector: 280 nm

Temp. enfriador muestreador: 4°C

Temperatura columna del horno: Ambiente

Tiempo de funcionamiento: 50 minutos

Los datos de pureza para las DVD-Igs se muestran en la tabla 9.

***Tabla 9: Pureza de los anticuerpos madre y constructos de DVD-Ig según lo determinado por la cromatografía de exclusión de tamaño***

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | % de monómero (pureza) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD774 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | CD3 | 85 |
| DVD773 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Largo | Largo | CD3 | 97 |
| DVD804 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | CD3 | 87 |
| DVD803 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Largo | Corto | CD3 | 91 |
| DVD332 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | CD3 | 91 |
| DVD331 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Corto | Corto | CD3 | 99 |
| DVD834 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | CD3 | 82 |
| DVD833 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Corto | Largo | CD3 | 99 |
| DVD322 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | EGFR (sec. 1) | 97.8 |
| DVD321 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Corto | Corto | EGFR (sec. 1) | 94.4 |
| DVD766 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | EGFR (sec. 1) | 95.1 |
| DVD765 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Largo | Largo | EGFR (sec. 1) | 92.5 |
| DVD796 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | EGFR (sec. 1) | 97.9 |
| DVD795 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Largo | Corto | EGFR (sec. 1) | 96.2 |
| DVD826 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | EGFR (sec. 1) | 95.7 |
| DVD825 | EGFR (sec. 2) | Terminal N | Corto | Largo | EGFR (sec. 1) | 95.0 |

Las DVD-Igs mostraron un perfil de SEC excelente en donde la mayoría de las DVD-Igs mostraron el >90% de monómero. Este perfil de DVD-Ig es similar al observado para los anticuerpos madre.

***SDS-PAGE***

Los anticuerpos se analizan por electroforesis en gel de poliacrilamida – dodecilo de sulfato de sodio - (SDS-PAGE) bajo ambos condiciones de reducción y no reducción. El lote AFP04C de Adalimumab se utiliza como control. Para reducir las

condiciones, las muestras se mezclan 1:1 con el amortiguador de la muestra 2X tris glicina SDS-PAGE (Invitrogen, cat# LC2676, lot# 1323208) con 100 mm DTT, y calentado a 60°C durante 30 minutos. Para las condiciones no reductoras, las muestras se mezclan 1:1 con el amortiguador de la muestra y calentada a 100°C durante 5 minutos. Las muestras reducidas (10 mg por vía) se cargan en 12% de gel pre-moldeada tris-glicina (Invitrogen, cat# EC6005box, lot# 6111021), y las muestras no reducidas (10 mg por via) se cargan en 8%-16% gel pre-moldeada tris-glicina (Invitrogen, cat# EC6045box, lot# 6111021). SeeBlue Plus 2 (Invitrogen, cat#LC5925, lot# 1351542) se utiliza como un marcador de peso molecular. Los geles se funcionan en una caja mini de gel celular XCell SureLock (Invitrogen, cat# E10001) y las proteínas se separan aplicando primero un voltaje de 75 para apilar las muestras en el gel, seguido por un voltaje constante de 125 hasta que el frente de la matriz alcanza la parte inferior del gel. El amortiguador en función usado es el amortiguador IX tris glicina SDS, preparado de un amortiguador 10X tris glicina SDS (ABC, MPS-79-080106)). Los geles se colorean durante la noche con color azul coloidal (Invitrogen cat# 46-7015, 46-7016) y se descoloran con agua de Milli-Q hasta que el fondo esté claro. Los geles coloreados después se exploran usando un explorador de expresión Epson (modelo 1680, S/N DASX003641).

***Análisis de Velocidad de Sedimentación***

Los anticuerpos se cargan en la cámara de la muestra de

cada una de las tres piezas centrales estándar de carbón sector dos. Estas piezas centrales tienen 1.2 cm de longitud de trayectoria óptica y se construyen con las ventanas de zafiro. PBS se utiliza para un amortiguador de referencia y cada cámara contuvo 140 µl. Todas las muestras se examinan simultáneamente usando un rotor de 4-orificios (AN-60Ti) en una ultracentrifugadora analítica de Beckman ProteomeLab XLI (serie # PL106C01).

Se programan las condiciones de funcionamiento y el control centrífugo se realiza utilizando ProteomeLab (v5.6). Las muestras y el rotor se dejan para equilibrearse térmicamente durante una hora antes del ensayo (20.0 del ± 0.1°C). La confirmación del cargamento apropiado de la célula se realiza a 3000 rpm y una sola exploración se registra para cada célula. Las condiciones de velocidad de la sedimentación son las siguientes:

Volumen de la célula de muestra: 420 ml

Referencia del volumen de la célula: 420 ml

Temperatura: 20°C

Velocidad del Rotor: 35,000 rpm

Tiempo: 8 horas

Longitud de onda UV: 280 nm

Tamaño de la Etapa Radial: 0.003 cm

Colección de datos: Un punto de referencias por etapa sin promedio de señal.

Número total de exploraciones: 100

***Medición en peso molecular LC-MS de anticuerpos intactos***

Los pesos moleculares de anticuerpos intactos son analizados por LC-MS. Cada anticuerpo se diluye a aproximadamente 1 mg/ml con agua. Un sistema 1100 HPLC (Agilent) con un microtrap de proteína (Michrom Bioresources, Inc, cat# 004/25109/03) se utiliza para des-salar e introducir 5 mg de la muestra en un espectrómetro de masa API Qstar pulsar i (Applied Biosystems). Un gradiente corto se utiliza para eluir las muestras. El gradiente se funciona con la fase móvil A (0.08% FA, 0.02% TFA en HPLC agua) y la fase móvil B (0.08% FA y 0.02% TFA en acetonitrilo) en un caudal de 50 ml/minuto. El espectrómetro de masa se opera en el voltaje de rocío de 4.5 kvolts con un intervalo de exploración de 2000 a 3500 masa en la relación de carga.

***Medición en peso molecular LC-MS de cadenas ligera y pesada del anticuerpo***

La medición en peso molecular de la cadena ligera del anticuerpo (LC), cadena pesada (HC) y desglocosilado HC es analizada por LC-MS. El anticuerpo se diluye a 1 mg/ml con agua y la muestra se reduce a LC y HC con una concentración final de 10 mm DTT durante 30 minutos a 37°C. Para desglicosilar el anticuerpo, se incubaron 100 mg del anticuerpo con 2 ml de PNGase F, 5 ml de 10% de N-octilglucosida en un volumen total de 100 ml durante la noche a 37°C. Después de la desglicosilación la muestra se reduce con una concentración final

de 10 mm DTT durante 30 minutos a 37°C. Un sistema Agilent 1100 HPLC con una columna C4 (Vydac, cat# 214TP5115, S/N 060206537204069) se utiliza para des-salar e introducir la muestra (5 mg) en un espectrómetro de masa API Qstar pulsar i (Applied Biosystems). Un gradiente corto se utiliza para eluir la muestra. El gradiente se funciona con la fase móvil A (0.08% FA, 0.02% TFA en HLPC agua) y la fase móvil B (0.08% FA y 0.02% TFA en acetonitrilo) en un caudal de 50 ml/minuto. El espectrómetro de masa se opera en un voltaje de rocío de 4.5 kvolts con un intervalo de exploración a partir de 800 a 3500 masa en la relación de carga.

***Mapeo del péptido***

El anticuerpo se desnaturaliza durante 15 minutos a temperatura ambiente en una concentración final de clorhidrato de guanidina de 6 M en 75 mm de bicarbonato de amonio. Las muestras desnaturalizadas se redujeron con una concentación final de 10 mm DTT a 37°C durante 60 minutos, seuido por la alquilación con 50 mm de ácido iodoacético (IAA) en la oscuridad a 37°C durante 30 minutos. Seguido por la alquilación, la muestra se dializa durante la noche contra cuatro litros de 10 mm de bicarbonato de amonio a 4°C. La muestra dializada se diluye en 1 mg/ml con 10 mm de bicarbonato de amonio, pH 7.8, y 100 mg del anticuerpo se digiere también con tripsina (Promega, cat# V5111) o Lis-C (Roche, cat# 11 047 825 001) en una relación 1:20 (p/p) tripsina/Lis-C:anticuerpo a 37°C durante 4 horas. Las soluciones

digestivas se enfriaron rápidamente con 1 ml de 1 HCl. Para el mapeo del péptido con la detección del espectrómetro de masa, 40 ml de las soluciones digestivas se separan por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RPHPLC) en una columna C18 (Vydac, cat# 218TP51, S/N NE9606 10.3.5) con un sistema Agilent 1100 HLPC. La separación del péptido se funciona con un gradiente usando la fase móvil A (0.02% TFA y 0.08% FA en HLPC grado agua) y la fase móvil B (0.02% TFA y 0.08% FA en acetonitrilo) a un caudal de 50 ml/minutos. El espectrómetro de masa API QSTAR pulsar i se opera en modo positivo en el voltaje de rocío de 4.5 kvolts y un intervalo de exploración a partir de 800 a 2500 masa en la relación de carga.

***Mapeo de Unión del Disfuro***

Para desnaturalizar el anticuerpo, 100 ml del anticuerpo se mezcla con 300 ml de 8 M de guanidina HCl en 100 mm de bicarbonato de amonio. El pH se comprueba para asegurar que está entre 7 y 8 y las muestras se desnaturalizan durante 15 minutos a temperatura ambiente en una concentración final de 6 M guanidina HCl. Una porción de la muestra desnaturalizada (100 ml) se diluye a 600 ml con agua Milli-Q para proporcionar una concentración final de guanidina HCl de 1 M. La muestra (220 mg) se digiere también con tripsina (Promega, cat# V5111, lote# 22265901) o Lis-C (Roche, cat# 11047825001, lote# 12808000) en una relación de 1:50 tripsina o 1:50 Lis-C:anticuerpo (p/p) (4.4 mg enzima: muestra de 220 mg) a 37°C durante aproximadamente 16

horas. 5 mg adicionales de tripsina o Lis-C se agregaron a las muestras y la digestión se dejó proceder durante 2 horas adicionales a 37°C. Las soluciones digestivas se detuvieron agrendo 1 ml de TFA a cada muestra. Las muestras digeridas se separaron por RPHPLC usando la columna C18 (Vydac, cat# 218TP51 S/N NE020630-4-1A) en un sistema Agilent HPLC. La separación se funciona con el mismo gradiente usado para el mapeo del péptido usando la fase móvil A (0.02% TFA y 0.08% FA en HLPC grado agua) y la fase móvil B (0.02% TFA y 0.08% FA en acetonitrilo) a un caudal de 50 ml/minuto. Las condiciones de operación de HLPC son iguales que las usadas para el mapeo del péptido. El espectrómetro de masa API QSTAR pulsar i se opera en el modo positivo en el voltaje de rocío de 4.5 kvolts y un intervalo de exploración a partir de 800 a 2500 masa-a-relación carga. Los enlaces de disulfuro se asignan igualando el MWs de los péptidos observados con el MWs previsto de los péptidos trípticos o Lss-C ligados por los enlaces de disulfuro.

***Determinación del sulfhidrilo libre***

El método usado para cuantificar las cisteínas libres en un anticuerpo se basa en la reacción del reactivo Ellman, 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), con grupos de sulhidrilo (SH), que proporcionan un producto cromofórico característico, 5-tio-( ácido 2-nitrobenzoico) (TNB). La reacción se ilustra en la fórmula:

DTNB + RSH® RS-TNB + TNB- + H+

La absorbencia de TNB- se mide en 412 nm usando un espectrofotómetro Cary 50. Una curva de absorbencia se traza usando dilusiones de 2-mercaptoetanol (b-ME) como el estándar SH libre, y las concentraciones de los grupos sulfhidrilo libres en la proteína se determinan de la absorbencia en 412 nm de la muestra.

La solución madre b-ME estándar se prepara por una dilusión serial de 14.2 M b-MEO con HPLC grado agua en una concentración final de 0.142 mm. Los estándares en triplicado para cada concentración se preparan. El anticuerpo se concentra a 10 mg/ml utilizando un filtro centrífugo amicon ultra de 10,000 MWCO (Millipore, cat# UFC801096, lot# L3KN5251) y el amortiguador se cambia al amortiguador de la formulación usado para el adalimumab (5.57 mm de fosfato de sodio monobásico, 8.69 mm, de fosfato de sodio monobásico, 106.69 mm de NaCl, 1.07 mm de citrato sódico, 6.45 mm de ácido cítrico, 66.68 mm de manitol, pH 5.2, 0.1% (p/v) Tween). Las muestras se mezclan en una coctelera a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después se agregan 180 ml de 100 mm de amortiguador Tris, pH 8.1, a cada muestra y estándar seguidos por la adición de 300 ml de 2 mm DTNB en 10 mm del amortiguador de fosfato, pH 8.1. Después del mezclado, las muestras y estándares se miden para absorción en 412 nm en un espectrofotómetro Cary 50. La curva estándar se obtiene trazando la cantidad de SH y $OD_{412}$ nm libres de estándares b-ME. El contenido de SH libre de muestras se

calculó basado en esta curva después de la sustracción del blanco.

***Cromatografía de Intercambio catiónico débil***

El anticuerpo se diluye en 1 mg/ml con 10 mm de fosfato de sodio, pH 6.0. La heterogeneidad de la carga se analiza usando un sistema de Shimadzu HLPC con una columna analítica WCX-10 ProPac (Dionex, cat# 054993, S/N 02722). Las muestras se cargan en la columna 80% de la fase móvil A (10 mm de fosfato de sodio, pH 6.0) y 20% en la fase móvil B (10 mm de fosfato de sodio, 500 mm de NaCl, pH 6.0) y se eluyen a un caudal de 1.0 ml/minuto.

***Perfi del Oligosacárido***

Los oligosacáridos liberados después del tratamiento PNGase F del anticuerpo son dereivados con el reactivo de etiqueta 2-aminobenzamida (2-AB). Los oligosacáridos fluorescente-etiquetados se separan por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase normal y las diferentes formas de oligosacáridos se caracterizan basadas en la comparación del tiempo de retención con estándares conocidos.

El anticuerpo primero se digiere con PNGaseF para dividir los oligosacáridos ligados N de la porción Fc de la cadena pesada. El anticuerpo (200 mg) se coloca en un tubo de 500 ml de Eppendorf junto con 2 ml de PNGase F y 3 ml de 10% de N-octilglucosida. La solución salina amortiguada con fosfato se agrega para llevar el volumen final a 60 ml. La muestra se incuba

durante la noche a 37°C en un termomezclador Eppendorf fijo a 700 rpm. El lote AFP04C de Adalimumab también se digiere con PNGase F como un control.

Después del tratamiento de PNGase F, las muestras se incuban a 95°C 95 durante 5 minutos en un termomezclador Eppendorf fijo a 750 rpm para precipitar fuera las proteínas, después las muestras se colocan en una centrifugadora Eppendorf durante 2 minutos a 10,000 rpm para hacer girar abajo las proteínas precipitadas. El sobrenadante que contiene a los oligosacáridos se transfiere a un tubo Eppendorf de 500 ml y se seca a un velocidad-vac a 65°C.

Los oligosacáridos se etiquetan con 2AB usando un kit de etiquetas 2AB comprado de Prozyme (cat# GKK-404, lot# 132026). El reactivo de etiquetado se prepara de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ácido acético (150 ml, proporcionado en el kit) se agrega al matraz DMSO (proporcionado en el kit) y se mezcla por pipeta la solución arriba y abajo varias veces. La mezcla ácida acética/DMSO (100 ml) se transfiere a un matraz de la matriz 2-AB (justo antes de uso) y se mezcla hasta que el tinte se disuelva completamente. La solución del tinte después se agrega a un matraz el reductor (proporcionado en el kit) y se mezcla bien (reactivo de etiquetado). El reactivo de etiquetado (5 ml) se agrega a cada matraz de la muestra de oligosacárido seco, y se mezcla a fondo. Los matraces de reacción se colocan en un termomezclador

JFB

Eppendorf fijo a 65°C y 700-800 rpm durante 2 horas de reacción.

Después de la reacción de etiquetado, el exceso de tinte fluorescente se retira usando los cartuchos GlycoClean S de Prozyme (cat# GKI-4726). Antes de agregar las muestras, los cartuchos se lavan con 1 ml de agua milli-Q seguido con 5 lavadas de 30% de la solución de ácido acético de 1 ml. Solo antes de agregar las muestras, 1 ml de acetonitrilo (Burdick y Jackson, cat# AHO 15-4) se agrega a los cartuchos.

Después de que todo el acetonitrilo pasó a través del cartucho, la muestra se mancha en el centro del disco recientemente lavado y se deja fijar por adsorción en el disco durante 10 minutos. El disco se lava con 1 ml de acetonitrilo seguido por cinco baños de 1 ml de 96% de acetonitrilo. Los cartuchos se colocan sobre un tubo Eppendorf de 1.5 ml y los oligosacáridos etiquetados 2-AB se eluyen con 3 lavados (400 ml cada baño) de agua milli-Q.

Los oligosacáridos se separan usando una columna Glycosep N HLPC (cat# GKI-4728) conectada a un sistema Shimadzu HLPC. El sistema de Shimadzu HLPC consistió en un controlador de sistema, desgasificador, bombas binarias, muestreador automático con un enfriador de muestra, y un detector fluorescente.

***Estabilidad a Temperaturas Elevadas***

El amortiguador del anticuerpo es también 5.57 mm de fosfato de sodio monobásico, 8.69 mm de fosfato sodio dibásico, 106.69 mm de NaCl, 1.07 mm de citrato de sodio, 6.45 mm de

ácido cítrico, 66.68 mm de manitol, 0.1% (p/v) Tween, pH 5.2; o 10 mm de histidina, 10 mm de metionina, 4% de manitol, pH 5.9 usando los filtros ultra centrífugos Amicon. La concentración final de los anticuerpos se ajusta a 2 mg/ml con los amortiguadores apropiados. Las soluciones del anticuerpo después se esterilizan por filtro y 0.25 ml de alícuotas se preparan bajo condiciones estériles. Las alícuotas se dejan a ya sea -80°C, 5°C, 25°C, o 40°C durante 1, 2 ó 3 semanas. Al final del período de incubación, las muestras s analizan por cromatografía de exclusión de tamaño y SDS-PAGE.

Las muestras de estabilidad se analizan por SDS-PAGE bajo ambas condiciones de reducción y no reducción. El procedimiento usado es el mismo según lo descrito en la presente. Los geles se colorean durante la noche con el color azul coloidal (cat# 46-7015, 46-7016 de Invitrogen) y se descoloran con agua Milli-Q hasta que el fondo esté claro. Los geles coloreados después se exploran usando un explorador de expresión Epson (modelo 1680, S/N DASX003641). Para obtener más sensibilidad, los mismos geles se colorean color plata usando el kit de coloración de color plata (Owl Scientific) y se utilizan los procedimientos recomendados proporcionados 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 las Xenoinjertos de Carcinoma Humano***

Las células cancerosas humanas son crecidas in vitro en 99% de viabilidad, 85% de confluencia en frascos de cultivo de tejido. Los ratones hembras o machos SCID (Charles Rivers Labs) de 19-25 gramos, se etiquetaron en el oído y se afeitaron. Los ratones después se inoculan subcutáneamente en el flanco derecho con 0.2 ml de 2 x $10^6$ de células tomorales humanas (1:1 matrigel) en el día 0 del estudio. La administración (semana IP, Q3D/) del vehículo (PBS), del anticuerpo humanizado, y/o quimioterapia se inicia después de que los ratones sean emparejados en jaulas de ratón separadas con los volúmenes del medio tumoral de aproximadamente 150 a 200 $mm^3$. Los tumores son medidos por un par de calibradores dos veces por semana iniciando la post inoculación aproximadamente el día 10 y los volúmenes tumorales se calcularon de acuerdo a la fórmula $V = L \times W^2/2$ (V: volumen, $mm^3$; L: longitud, mm; W: anchura, mm). La reducción en el volumen del tumor se considera en los animales tratados con mAb solo o en combinación con quimioterapia con relación a los tumores en animales que recibieron únicamente el vehículo o un control mAb del isotipo.

***Ejemplo 1.4: Generación de una DVD-Ig***

Las moléculas de DVD-Ig que pueden unir dos antígenos se construyen usando los anticuerpos monoclonales biparentales, uno contra el antígeno humano A, y el otro contra el antígeno humano B, seleccionados según lo descrito en la presente.

***Ejemplo 1.4.1: Generación de una DVD-Ig que tiene dos longitudes del enlace***

Una región constante que contiene γ1 Fc con mutaciones en 234 y 235 para eliminar funciones efectoras de ADCC/CDC se utiliza. Se generan cuatro diferentes anti-A/B DVD-Ig constructos: 2 con enlace corto (SL) y 2 con enlace largo, cada uno en dos diferentes orientaciones de dominio: $V_A$-$V_B$-C y $V_B$-$V_A$-C (ver Tabla 8). Las secuencias del enlace, derivadas de la secuencia terminal N de dominio humano Cl/Ck o CHI, son como sigue:

Para los constructos DVDAB:

cadena ligera (si anti-A tiene λ): enlace corto: QPKAAP (SEC ID NO.: 15); Enlazador largo: QPKAAPSVTLFPP (SEC ID NO.: 16);

cadena ligera (si anti-A tiene k): Enlazador corto: TVAAP (SEC ID NO.: 13); Enlazador largo: TVAAPSVFIFPP (SEC ID NO.: 14);

cadena pesada (γl): Enlazador corto: ASTKGP (SEC ID NO.: 21); Enlazador largo: ASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO.: 22).

Para los constructos DVDBA:

cadena ligera (si anti-B tiene λ): Enlazador corto: QPKAAP (SEC ID NO.: 15); Enlazador largo: QPKAAPSVTLFPP (SEC ID NO.: 16);

cadena ligera (si anti-B tiene k): Enlazador corto: TVAAP (SEC ID NO.: 13); Enlazador largo: TVAAPSVFIFPP (SEC ID NO.: 14);

cadena pesada (γl): Enlazador corto: ASTKGP (SEC ID NO.: 21); Enlazador largo: ASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO.: 22).

Los constructos de cadena pesada y ligera se subclonan en el vector de expresión pBOS, y se expresan en las células COS, seguido por la purificación por cromatografía de la Protein A. Los materiales purificados se someten al análisis de SDS-PAGE y SEC.

La tabla 10 más abajo describe los constructos de cadena pesada y cadena ligera usados para expresar cada proteína anti-A/B DVD-Ig.

***Tabla 10. Constructos para expresar las proteínas anti-A/B DVD-Ig***

| Proteína 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 constructos de cadena pesada DVDABHC-LL y DVDABHC-SL, el dominio de VH del anticuerpo A es PCR amplificado usando los cebadores específicos (3' cebadores contienen secuencias de enlace largo/corto para constructos SL/LL, respectivamente); mientras que el dominio VH del anticuerpo B se amplifica usando cebadores específicos (5'

cebadores contienen secuencias de enlace largo/corto para constructos SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones PCR se realizan de acuerdo a técnicas y procedimientos PCR estándar. Los dos productos PCR se purifican en gel, y se utilizan juntos como plantilla traslapada para el traslapo posterior de la reacción PCR. Los productos traslapados PCR se subclonan en el vector de expresión mamífero z non-a, Srf I y Sal I doble digerido pBOS-hCyl, de (Abbott) usando el método de recombinación homóloga estándar.

Para generar los constructos de cadena ligera DVDABLC-LL y DVDABLC-SL, el dominio VL de un anticuerpo A es PCR amplificado usando los cebadores específicos (3' cebadores contienen secuencias de enlace largo/corto para constructos SL/LL, respectivamente); mientras que el dominio VL del anticuerpo B se amplifica usando los cebadores específicos (5' cebadores contienen secuencias de enlace largo/corto para constructos SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones PCR se realizan de acuerdo a técnicas y procedimientos PCR estándar. Los dos productos PCR se purifican en gel, y se utilizan juntos como plantilla traslapada para la reacción PCR traslapada subsiguiente utilizando las condiciones de PCR estándar. Los productos PCR traslapados se subclonan en el vector de expresión mamífera pBOS-hCK digerido doble Srfl Not I (Abbott) utilizando métodos de recombinación homóloga estándar. El método similar se ha utilizado para generar DVDBASL y DVDBALL

como se describe más abajo:

***Ejemplo 1.4.3: Clonación molecular de los constructos de ADN para DVDBASL y DVDBALL:***

Para generar constructos de cadena pesada DVDBAHC-LL y DVDBAHC-SL, el dominio VH del anticuerpo B es PCR amplicado usando cebadores específicos (3' cebadores contienen secuencias de enlace largo/corto para constructos SL/LL, respectivamente); mientras que el dominio de VH del anticuerpo A se amplifica usando los cebadores específicos (5' cebadores contienen secuencias de enlace largo/corto para constructos SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones PCR se realizan de acuerdo técnicas y procedimientos PCR estándar. Los dos productos PCR se purifican en gel, y se utilizan juntos como plantilla traslapada para la reacción de PCR traslapada posterior usando condiciones PCR estándar. Los productos PCR traslapados se subclonan en el vector de expresión mamífera pBOS-hCyl usando el método de recombinación homóloga estándar.

Para generar los constructos de cadena ligera DVDBALC-LL y DVDBALC-SL, el dominio de VL del anticuerpo B es PCR amplificado usando los cebadores específicos (contienen secuencias de enlace largo/corto para constructos SL/LL, respectivamente); mientras que el dominio VL del anticuerpo A se amplifica usando los cebadores específicos (5' cebadores contienen secuencias de enlace largo/corto para constructos

SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones PCR se realizan de acuerdo a técnicas y procedimientos de PCR estándar. Los dos productos PCR se purifican en gel, y se utilizan juntos como plantilla traslapada para la reacción PCR traslapada subsiguiente usando condiciones PCR estándar. Los productos PCR traslapados se subclonan en el vector de expresión mamífera pBOS-hCK digerido doble Srfl Not I (Abbott) usando el método homólogo de recombinación homóloga estándar.

***Ejemplo 1.4.4: Construcción y Expresión de DVD-Ig Adicional:***

***Ejemplo 1.4.4.1: Preparación de constructos del vector DVD-Ig***

Las secuencias del aminoácido del anticuerpo madre para los anticuerpos específicos, que reconocen los antígenos específicos o epítopos del mismo, por la incorporación en una DVD-Ig puede obtenerse por la preparación de hibridomas como se describe anteriormente o puede obtenerse ordenando las proteínas del anticuerpo o ácidos nucléicos conocidos. Además, las secuencias conocidas pueden obtenerse de la literatura. Las secuencias pueden utilizarse para sintetizar los ácidos nucléicos usando tecnologías de amplificación o síntesis de ADN estándar y el montaje de los fragmentos del anticuerpo deseados en vectores de expresión, usando tecnología de ADN recombinante estándar, para expresión en células.

Las secuencias de DVD-Ig se clonan en un vector pHyb-C o un vector pHyb-E (ver la Solicitud de Patente Norteamericana Número de Serie 61/021,282) de acuerdo a los métodos estándar.

El vector pHyb-C incluye un origen eucariótico SV40 de réplica, promotor de expresión eucariótico citomegalovirus (pCMV), secuencia líder tripartita (TPL), sitio donador (SD), elemento reforzador mayormente retardado de adenovirus (enh MLP), sitio aceptador (SA), región estructural de lectura abierta (ORF) para un gen de interés seguido por una señal poli A (pA), elemento de simetría díada (DS), origen eucariótico derivado del virus Barr de Epstein de réplica (OriP), región de repetición (FR), marcador de resistencia de ampillicin (AmpR) y origen bacteriano de réplica (pMBlori).

El vector pHyb-E incluye un origen eucariótico SV-40 de réplica, un promotor eucariótico EF-la, región estructural de lectura abierta para un gen de interés seguido por una señal poli A (pA), elemento de simetría díada (DS), origen eucariótico derivado del virus Barr de Epstein de réplica (OriP), región de repetición (FR), marcador de resistencia a ampillicin (AmpR) y un origen bacteriano de réplica (pMBlori). Los vectores ejemplares pHyb-E incluyen pHybE-hCk, pHybE-HCl, y pHybE-hCgl,z,non-a (ver la Solicitud de Patente Norteamericana Número de Serie 61/021,282).

***Ejemplo 1.4.4.2: Transfección y Expresión en 293 células***

Los constructos del vector DVD-Ig son tranfectados en 293 células para la producción de la proteína de DVD-Ig. El procedimiento de transfección de 293 transeúntes usado es una modificación de los métodos publicados en Dorucher y

colaboradores (2002) Nucleic Acids Res. 30(2): E9 and Pham y colaboradores (2005) Biotech. Bioengineering 90(3):332-44. Los reactivos que se utilizaron en la transfección incluyeron:

- Células HEK 293-6E (expresión EBNAl estable de la línea celular de riñón embrionario humano; obtenido del National Research Council Canada) cultivado en los frascos Erlenmeyer disponibles en una incubadora humedecida fija en 130 rpm, 37°C y 5% de $CO_2$.
- Medio de cultivo: Medio de Expresión FreeStyle 293 (Invitrogen 12338-018) más 25 µg/ml Geneticin (G418) (Invitrogen 10131-027) y 0.1% Pluronic F-68 (Invitrogen 24040-032).
- Medio de transfección: Medio de Expresión FreeStyle 293 más 10 mm HEPES (Invitrogen 15630-080).
- Solución madre de polietilenimina (PEI): 1 mg/ml de solución madre estéril, pH 7.0, preparad con 25kDa PEI lineal (Polysciences) y almacenado a menos -15°C.
- Medio de Alimentación de Triptona: 5% p/v de solución madre estéril de triptona N1 (Organotechnie, 19554) en el Medio de Expresión FreeStyle 293

**Preparación celular para transfección:** Aproximadamente 2-4 horas antes de la transfección, las células HEK 293-6E se cosecharon por centrifugación y suspendieron nuevamente en un medio de cultivo en una densidad celular de aproximadamente 1 millón de células viables por ml. Para cada transfección, 40 ml de la suspensión de la célula se transfieren en un frasco Erlenmeyer de 250-ml disponible y se incubaron durante 2-4 horas.

**Transfección:** El medio de transfección y la solución madre PEI pre-calentada a temperatura ambiente (RT). Para cada transfección, 25 µg de ADN de plásmido y 50 µg de polietilenimina (PEI) se combinan en 5 ml del medio de transfección y se incuban durante 15 - 20 minutos en el RT para dejar que los complejos ADN:PEI formar. Para las transfecciones BR3-Ig, 25 µg de plásmido de BR3-Ig se utilizaron para la transfección. Cada 5 ml de la mezcla del complejo de ADN:PEI se agregaron a un cultivo de 40 ml preparado previamente y se regreso a la incubadora humedecida fija en 130 rpm, 37°C y 5% de $CO_2$. Después de 20-28 horas, 5 ml del Medio de Alimentación de Triptona se agregan a cada transfección y los cultivos se continúan por seis días.

El perfil de expresión para las DVD-Igs se muestra en la tabla 11.

***Tabla 11: Producciones de expresión de HEK293 temporal de EGFR (sec. 2) que contiene los anticuerpos y DVD-Igs***

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | Producción de expresión (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB064 | EGFR (sec. 2) | | | - | - | 47.2 |
| AB002 | CD3 | | | - | - | 67.2 |
| AB015 | DLL-4 | | | - | - | 57.6 |

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | Producción de expresión (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB033 | EGFR (sec. 1) | | | - | - | 44.4 |
| AB116 | ErbB3 (sec. 3) | | | - | - | 61.0 |
| AB063 | ErbB3 (sec. 2) | | | - | - | 37.8 |
| AB062 | ErbB3 (sec. 1) | | | - | - | 24.6 |
| AB012 | HGF | | | - | - | 22.8 |
| AB01 1 | IGF1R | | | - | - | 57.0 |
| AB119 | MTX (4-351-178) | | | - | - | 1.6 |
| AB121 | NKG2D (KYK-2.0) | | | - | - | 32.8 |
| AB047 | P1GF (ThromboGenix) | | | - | - | 23.6 |
| AB005 | RON | | | - | - | 67.4 |
| AB014 | VEGF (sec. 1) | | | - | - | 52.4 |
| AB117 | VEGF (sec. 3) | | | - | - | 70.8 |
| AB070 | VEGF (sec. 2) | | | - | - | 1.2 |
| DVD774 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | CD3 | 3.8 |
| DVD773 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | CD3 | 0.6 |
| DVD804 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | CD3 | 2.6 |

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | Producción de expresión (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD803 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | CD3 | 40.6 |
| DVD332 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | CD3 | 1.0 |
| DVD331 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | CD3 | 31.0 |
| DVD834 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | CD3 | 3.0 |
| DVD833 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | CD3 | 1.7 |
| DVD782 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | DLL-4 | 16.6 |
| DVD781 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | DLL-4 | 55.0 |
| DVD812 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | DLL-4 | 44.4 |
| DVD811 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | DLL-4 | 43.8 |
| DVD340 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | DLL-4 | 48.4 |

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | Producción de expresión (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD339 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | DLL-4 | 23.6 |
| DVD842 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | DLL-4 | 28.6 |
| DVD841 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | DLL-4 | 48.2 |
| DVD766 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | EGFR (sec. 1) | 7.8 |
| DVD765 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | EGFR (sec. 1) | 7.0 |
| DVD796 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | EGFR (sec. 1) | 15.6 |
| DVD795 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | EGFR (sec. 1) | 26.6 |
| DVD322 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | EGFR (sec. 1) | 12.4 |
| DVD321 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | EGFR (sec. 1) | 15.6 |
| DVD826 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | EGFR (sec. 1) | 13.6 |

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | Producción de expresión (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD825 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | EGFR (sec. 1) | 12.4 |
| DVD788 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | ErbB3 (sec. 3) | 42.0 |
| DVD787 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | ErbB3 (sec. 3) | 32.8 |
| DVD818 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | ErbB3 (sec. 3) | 45.0 |
| DVD817 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | ErbB3 (sec. 3) | 29.8 |
| DVD756 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | ErbB3 (sec. 3) | 41.0 |
| DVD755 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | ErbB3 (sec. 3) | 22.4 |
| DVD848 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | ErbB3 (sec. 3) | 37.6 |
| DVD847 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | ErbB3 (sec. 3) | 34.0 |
| DVD772 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | ErbB3 (sec. 2) | 0.9 |

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | Producción de expresión (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD771 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | ErbB3 (sec. 2) | 15.2 |
| DVD802 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | ErbB3 (sec. 2) | 0.9 |
| DVD801 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | ErbB3 (sec. 2) | 22.4 |
| DVD330 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | ErbB3 (sec. 2) | 1.2 |
| DVD329 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | ErbB3 (sec. 2) | 16.6 |
| DVD832 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | ErbB3 (sec. 2) | 0.5 |
| DVD831 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | ErbB3 (sec. 2) | 15.0 |
| DVD770 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | ErbB3 (sec. 1) | 17.4 |
| DVD769 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | ErbB3 (sec. 1) | 16.2 |
| DVD800 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | ErbB3 (sec. 1) | 15.6 |

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | Producción de expresión (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD799 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | ErbB3 (sec. 1) | 26.4 |
| DVD328 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | ErbB3 (sec. 1) | 7.8 |
| DVD327 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | ErbB3 (sec. 1) | 10.2 |
| DVD830 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | ErbB3 (sec. 1) | 17.2 |
| DVD829 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | ErbB3 (sec. 1) | 17.2 |
| DVD778 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | HGF | 2.0 |
| DVD777 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | HGF | 24.8 |
| DVD808 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | HGF | 9.8 |
| DVD807 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | HGF | 33.6 |
| DVD336 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | HGF | 7.6 |

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | Producción de expresión (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD335 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | HGF | 23.8 |
| DVD838 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | HGF | 5.8 |
| DVD837 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | HGF | 23.4 |
| DVD776 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | IGF1R | 0.3 |
| DVD775 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | IGF1R | 23.4 |
| DVD806 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | IGF1R | 4.4 |
| DVD805 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | IGF1R | 44.8 |
| DVD334 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | IGF1R | 18.6 |
| DVD333 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | IGF1R | 48.0 |
| DVD836 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | IGF1R | 0.4 |

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | Producción de expresión (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD835 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | IGF1R | 27.8 |
| DVD1210 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | MTX (4-351-178) | 0.0 |
| DVD1211 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | MTX (4-351-178) | 1.9 |
| DVD1214 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | NKG2D (KYK-2.0) | 38.4 |
| DVD1215 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | NKG2D (KYK-2.0) | 19.6 |
| DVD784 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | P1GF (ThromboGenix) | 28.8 |
| DVD783 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | P1GF (ThromboGenix) | 23.2 |
| DVD814 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | P1GF (ThromboGenix) | 21.8 |
| DVD813 | EGFR (sec. 2) | Terminal | Largo | Corto | P1GF | 28.2 |

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | Producción de expresión (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | C | | | (ThromboGenix) | |
| DVD342 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | P1GF (ThromboGenix) | 38.2 |
| DVD341 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | P1GF (ThromboGenix) | 32.2 |
| DVD844 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | P1GF (ThromboGenix) | 22.0 |
| DVD843 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | P1GF (ThromboGenix) | 24.2 |
| DVD768 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | RON | 35.6 |
| DVD767 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | RON | 44.8 |
| DVD798 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | RON | 49.0 |

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | Producción de expresión (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD797 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | RON | 68.4 |
| DVD326 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | RON | 55.6 |
| DVD325 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | RON | 32.4 |
| DVD828 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | RON | 46.6 |
| DVD827 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | RON | 52.6 |
| DVD780 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | VEGF (sec. 1) | 0.1 |
| DVD779 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | VEGF (sec. 1) | 13.2 |
| DVD810 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | VEGF (sec. 1) | 1.4 |
| DVD809 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | VEGF (sec. 1) | 17.8 |
| DVD338 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | VEGF (sec. 1) | 2.0 |

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | Producción de expresión (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD337 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | VEGF (sec. 1) | 22.0 |
| DVD840 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | VEGF (sec. 1) | 1.6 |
| DVD839 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | VEGF (sec. 1) | 17.2 |
| DVD792 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | VEGF (sec. 3) | 56.4 |
| DVD791 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | VEGF (sec. 3) | 2.4 |
| DVD822 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | VEGF (sec. 3) | 83.0 |
| DVD821 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | VEGF (sec. 3) | 34.4 |
| DVD760 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | VEGF (sec. 3) | 74.4 |
| DVD759 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | VEGF (sec. 3) | 50.4 |
| DVD852 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | VEGF (sec. 3) | 71.6 |

| ID de DVD | ID de secuencia | Posición | Enlace HC | Enlace LC | Otro dominio DVD | Producción de expresión (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DVD851 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | VEGF (sec. 3) | 50.2 |
| DVD790 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | VEGF (sec. 2) | 1.3 |
| DVD789 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Largo | VEGF (sec. 2) | 46.0 |
| DVD820 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | VEGF (sec. 2) | 1.6 |
| DVD819 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Largo | Corto | VEGF (sec. 2) | 57.0 |
| DVD758 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | VEGF (sec. 2) | 1.1 |
| DVD757 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Corto | VEGF (sec. 2) | 52.4 |
| DVD850 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | VEGF (sec. 2) | 2.4 |
| DVD849 | EGFR (sec. 2) | Terminal C | Corto | Largo | VEGF (sec. 2) | 49.8 |

Todas las DVD-Igs se expresaron bien en las 293 células. Las DVD-Igs se pudieron purificar fácilmente sobre una columna de proteína A. En la mayoría de los casos >5 mg/l de DVD-Ig purificada se pudieron obtener fácilmente de los sobrenadantes de las 293 células.

***Ejemplo 1.4.5: Selección de caracterización y liderazgo de A/B DVD Igs***

Las afinidades de unión de anti-A/B DVD-Igs se analizan en Biacore contra ambas proteína A y proteína B. La característica tetravalente de DVD-Ig se examina por estudios de unión múltiples en Biacore. Mientras que, la potencia de la neutralización de las DVD-Igs para la proteína A y proteína B son determinadas por pruebas biológicas, respectivamente, según lo descrito en la presente. Las moléculas de DVD-Ig que conservan mejor la afinidad y potencia de los mAbs parentales originales se seleccionan por fisicoquímica profundizada y caracterizaciones bio-analíticas (rata PK) según lo descrito en la presente para cada mAb. De acuerdo con la colección de análisis, el liderazgo final de DVD-Ig se avanza en el desarrollo de la línea celular estable CHO, y el material derivado de CHO se usa en estabilidad, estudios farmacocinéticos y de eficacia en monos cynomolgus, y actividades de preformulación.

***Ejemplo 2: Generación y Caracterización de las Inmunoglobulinas de Dominio Variable Dual (DVD-Ig)***

Las inmunoglobulinas de dominio variable duales (DVD-Ig) que usan los anticuerpos madre con secuencias de aminoácido conocidas se generaron por la sintetización de las secuencias de cadena ligera variable de DVD-Ig y pesada variable de DVD-Ig que codifican los fragmentos polinucleótidos en un vector pHybC-D2 de acuerdo al ejemplo 1.4.4.1. Los contructos de DVD-Ig

AOL

fueron reproducidos en y expresados en 293 células según lo descrito en el ejemplo 1.4.4.2. La proteína de DVD-Ig fue purificada según métodos estándar. Las características funcionales se determinaron de acuerdo a los métodos descritos en el ejemplo 1.1.1 y 1.1.2 según lo indicado.

Cada uno de los siguientes ejemplos comprende una tabla que contiene las secuencias de las cadenas VH y VL de DVD-Ig.

***Ejemplo 2.1: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y EGFR (sec. 1) con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 12***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 59 | DVD321H | AB064VH | AB033VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPSQSL<br>SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWS<br>GGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSN<br>DTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA |
| 60 | DVD321L | AB064VL | AB033VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ<br>SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF<br>SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT<br>FGAGTKLELKR |
| 61 | DVD322H | AB033VH | AB064VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH<br>WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN<br>KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE<br>FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPS<br>QTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMG<br>YISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNS<br>VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 62 | DVD322L | AB033VL | AB064VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW<br>YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD<br>FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE<br>LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ<br>DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF<br>SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT<br>FGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.2: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y EGFR (sec. 1) con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 13***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 63 | DVD765H | AB064VH | AB033VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQSGPGL VQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFK MNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVT VSA |
| 64 | DVD765L | AB064VL | AB033VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKR |
| 65 | DVD766H | AB033VH | AB064VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESG PGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVT VSS |
| 66 | DVD766L | AB033VL | AB064VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.3: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y EGFR (sec. 1) con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 14***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 67 | DVD795H | AB064VH | AB033VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQSGPGL VQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFK MNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVT VSA |
| 68 | DVD795L | AB064VL | AB033VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKR |
| 69 | DVD796H | AB033VH | AB064VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESG PGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVT VSS |
| 70 | DVD796H | AB033VL | AB064VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.4: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y EGFR (sec. 1) con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 15***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 71 | DVD825H | AB064VH | AB033VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWS GGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSN DTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA |
| 72 | DVD825L | AB064VL | AB033VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKR |
| 73 | DVD826H | AB033VH | AB064VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPS QTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMG YISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNS VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 74 | DVD826L | AB033VL | AB064VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.5: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y RON con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 16***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 75 | DVD325H | AB064VH | AB005VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGMDVWGQGTTVTVS S |
| 76 | DVD325L | AB064VL | AB005VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQ SLLHSNGFNYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL QTPPWTFGQGTKVEIRR |
| 77 | DVD326H | AB005VH | AB064VH | EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNN YYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPG LVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKG LEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFF LKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVS S |
| 78 | DVD326L | AB005VL | AB064VL | DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKVEIRR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTI TCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.6: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y RON con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 17***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 79 | DVD767H | AB064VH | AB005VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVQSGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLE WVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGMDVWGQ GTTVTVSS |
| 80 | DVD767L | AB064VL | AB005VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPAS ISCRSSQSLLHSNGFNYVDWYLQKPGQSPHLLIYF GSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQALQTPPWTFGQGTKVEIRR |
| 81 | DVD768H | AB005VH | AB064VH | EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNN YYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQ LQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWI RQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRD TSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQ GTLVTVSS |
| 82 | DVD768L | AB005VL | AB064VL | DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKVEIRR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVS VGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIY HGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA TYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.7: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y RON con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 18***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 83 | DVD797H | AB064VH | AB005VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVQSGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLE WVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGMDVWGQ GTTVTVSS |
| 84 | DVD797L | AB064VL | AB005VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQ SLLHSNGFNYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL QTPPWTFGQGTKVEIRR |
| 85 | DVD798H | AB005VH | AB064VH | EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNN YYYYGMDVWGQGTTVTVSSA**STKGPSVFPLAP**QVQ LQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWI RQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRD TSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQ GTLVTVSS |
| 86 | DVD798L | AB005VL | AB064VL | DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKVEIRR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTI TCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.8: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y RON con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 19***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 87 | DVD827H | AB064VH | AB005VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGMDVWGQGTTVTVS S |
| 88 | DVD827L | AB064VL | AB005VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPAS ISCRSSQSLLHSNGFNYVDWYLQKPGQSPHLLIYF GSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQALQTPPWTFGQGTKVEIRR |
| 89 | DVD828H | AB005VH | AB064VH | EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNN YYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPG LVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKG LEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFF LKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVS S |
| 90 | DVD828L | AB005VL | AB064VL | DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKVEIRR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVS VGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIY HGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA TYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.9: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 20***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 91 | DVD327H | AB064VH | AB062VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQWGAGLLKPSETL SLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINH SGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS |
| 92 | DVD327L | AB064VL | AB062VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQ SVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPRTFGQGTKVEIKR |
| 93 | DVD328H | AB062VH | AB064VH | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPSQT LSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMGYI SYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVT AADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 94 | DVD328L | AB062VL | AB064VL | DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTI TCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIKR |

411

***Ejemplo 2.10: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 21***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 95 | DVD769H | AB064VH | AB062VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQWGAGL LKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVS S |
| 96 | DVD768L | AB064VL | AB062VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIEMTQSPDSLAVSLGERAT INCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR |
| 97 | DVD770H | AB062VH | AB064VH | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESGPG LVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKG LEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFF LKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVS S |
| 98 | DVD770L | AB062VL | AB064VL | DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVS VGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIY HGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA TYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.11: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 22***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 99 | DVD799H | AB064VH | AB062VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQWGAGL LKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVS S |
| 100 | DVD799L | AB064VL | AB062VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQ SVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPRTFGQGTKVEIKR |
| 101 | DVD800H | AB062VH | AB064VH | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESGPG LVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKG LEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFF LKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVS S |
| 102 | DVD800L | AB062VL | AB064VL | DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTI TCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.12: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 1) con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 23***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 103 | DVD829H | AB064VH | AB062VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQWGAGLLKPSETL SLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINH SGSTNYNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS |
| 104 | DVD829L | AB064VL | AB062VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIEMTQSPDSLAVSLGERAT INCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR |
| 105 | DVD830H | AB062VH | AB064VH | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPSQT LSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMGYI SYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVT AADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 106 | DVD830L | AB062VL | AB064VL | DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVS VGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIY HGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA TYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.13: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 2) con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 24***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 107 | DVD329H | AB064VH | AB063VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL<br>RLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISS<br>SSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRD<br>EDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMVTVSS |
| 108 | DVD329L | AB064VL | AB063VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ<br>DITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF<br>SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPIT<br>FGQGTRLEIKR |
| 109 | DVD330H | AB063VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN<br>WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI<br>SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA<br>FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPS<br>QTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMG<br>YISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNS<br>VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 110 | DVD330L | AB063VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW<br>YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD<br>FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE<br>IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ<br>DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF<br>SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT<br>FGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.14: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 2) con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 25***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 111 | DVD771H | AB064VH | AB063VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLE WVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMVT VSS |
| 112 | DVD771L | AB064VL | AB063VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE TGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQ CENFPITFGQGTRLEIKR |
| 113 | DVD772H | AB063VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESG PGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVT VSS |
| 114 | DVD772L | AB063VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.15: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 2) con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 26***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 115 | DVD801H | AB064VH | AB063VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLE WVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMVT VSS |
| 116 | DVD801L | AB064VL | AB063VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPIT FGQGTRLEIKR |
| 117 | DVD802H | AB063VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESG PGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVT VSS |
| 118 | DVD802L | AB063VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.16: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y ErbB3 (sec. 2) con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 27***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 119 | DVD831H | AB064VH | AB063VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISS SSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRD EDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMVTVSS |
| 120 | DVD831L | AB064VL | AB063VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE TGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQ CENFPITFGQGTRLEIKR |
| 121 | DVD832H | AB063VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPS QTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMG YISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNS VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 122 | DVD832L | AB063VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.17: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y CD3 con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 28***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 123 | DVD331H | AB064VH | AB002VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELARPGASV KMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINP SRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTS EDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS |
| 124 | DVD331L | AB064VL | AB002VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASS SVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFS GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTF GSGTKLEINR |
| 125 | DVD332H | AB002VH | AB064VH | QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPS QTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMG YISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNS VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 126 | DVD332L | AB002VL | AB064VL | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSY SLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEI NR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQD INSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTF GGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.18: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y CD3 con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 29***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 127 | DVD773H | AB064VH | AB002VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQSGAEL<br>ARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLE<br>WIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYM<br>QLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLT<br>VSS |
| 128 | DVD773L | AB064VL | AB002VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVT<br>MTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVAS<br>GVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQW<br>SSNPLTFGSGTKLEINR |
| 129 | DVD774H | AB002VH | AB064VH | QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH<br>WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL<br>TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC<br>LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESG<br>PGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPG<br>KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQ<br>FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVT<br>VSS |
| 130 | DVD774L | AB002VL | AB064VL | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWY<br>QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSY<br>SLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEI<br>NR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTI<br>TCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDD<br>GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY<br>AQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.19: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y CD3 con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 30***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 131 | DVD803H | AB064VH | AB002VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQSGAEL ARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLE WIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLT VSS |
| 132 | DVD803L | AB064VL | AB002VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASS SVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFS GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTF GSGTKLEINR |
| 133 | DVD804H | AB002VH | AB064VH | QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESG PGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVT VSS |
| 134 | DVD804L | AB002VL | AB064VL | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSY SLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEI NR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQD INSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTF GGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.20: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y CD3 con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 31***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 135 | DVD833H | AB064VH | AB002VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELARPGASV KMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINP SRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTS EDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS |
| 136 | DVD833L | AB064VL | AB002VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**QIVLTQSPAIMSASPGEKVT MTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVAS GVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQW SSNPLTFGSGTKLEINR |
| 137 | DVD834H | AB002VH | AB064VH | QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPS QTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMG YISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNS VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 138 | DVD834L | AB002VL | AB064VL | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSY SLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEI NR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTI TCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.21: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y IGF1R con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 32***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 139 | DVD333H | AB064VH | AB011VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISG SGGTTFYADSVKGRFTISRDNSRTTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMDVWGQGTTVTV SS |
| 140 | DVD333L | AB064VL | AB011VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCS FGQGTKLEIKR |
| 141 | DVD334H | AB011VH | AB064VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTI SRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGP GLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQF FLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTV SS |
| 142 | DVD334L | AB011VL | AB064VL | DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFGQGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.22: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y IGF1R con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 33***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 143 | DVD775H | AB064VH | AB011VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLESGGGL<br>VQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLE<br>WVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDNSRTTLYL<br>QMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMDVWG<br>QGTTVTVSS |
| 144 | DVD775L | AB064VL | AB011VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQFPSSLSASVGDRVT<br>ITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLH<br>RGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQ<br>HNSYPCSFGQGTKLEIKR |
| 145 | DVD776H | AB011VH | AB064VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN<br>WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTI<br>SRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS<br>YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QV<br>QLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNW<br>IRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISR<br>DTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWG<br>QGTLVTVSS |
| 146 | DVD776L | AB011VL | AB064VL | DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGW<br>YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTE<br>FTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFGQGTKLE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT<br>ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD<br>DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ<br>YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.23: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y IGF1R con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 34***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 147 | DVD805H | AB064VH | AB011VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDNSRTTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMDVWG QGTTVTVSS |
| 148 | DVD805L | AB064VL | AB011VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCS FGQGTKLEIKR |
| 149 | DVD806H | AB011VH | AB064VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTI SRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QV QLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNW IRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISR DTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWG QGTLVTVSS |
| 150 | DVD806L | AB011VL | AB064VL | DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFGQGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR |

Ejemplo 2.24: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y IGF1R con el conjunto de enlaces 4

Tabla 35

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 151 | DVD835H | AB064VH | AB011VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISG SGGTTFYADSVKGRFTISRDNSRTTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMDVWGQGTTVTV SS |
| 152 | DVD835L | AB064VL | AB011VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQFPSSLSASVGDRVT ITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLH RGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQ HNSYPCSFGQGTKLEIKR |
| 153 | DVD836H | AB011VH | AB064VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTI SRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGP GLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQF FLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTV SS |
| 154 | DVD836L | AB011VL | AB064VL | DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFGQGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.25: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y HGF con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 36***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 155 | DVD335H | AB064VH | AB012VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGLVKPGGSL<br>RLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISS<br>SGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA<br>EDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGTLVTVSS |
| 156 | DVD335L | AB064VL | AB012VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ<br>GISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRF<br>GGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWT<br>FGQGTKVEIKR |
| 157 | DVD336H | AB012VH | AB064VH | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS<br>WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI<br>SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW<br>YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLV<br>KPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLE<br>WMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLK<br>LNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 158 | DVD336L | AB012VL | AB064VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW<br>YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD<br>FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE<br>IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ<br>DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF<br>SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT<br>FGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.26: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y HGF con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 37***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 159 | DVD777H | AB064VH | AB012VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLVESGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLE WVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGT LVTVSS |
| 160 | DVD777L | AB064VL | AB012VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQ SGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANGFPWTFGQGTKVEIKR |
| 161 | DVD778H | AB012VH | AB064VH | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQ ESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQ PPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTS KNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGT LVTVSS |
| 162 | DVD778L | AB012VL | AB064VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.27: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y HGF con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 38***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 163 | DVD807H | AB064VH | AB012VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLVESGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLE WVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGT LVTVSS |
| 164 | DVD807L | AB064VL | AB012VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRF GGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWT FGQGTKVEIKR |
| 165 | DVD808H | AB012VH | AB064VH | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQ ESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQ PPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTS KNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGT LVTVSS |
| 166 | DVD808L | AB012VL | AB064VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.28: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y HGF con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 39***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 167 | DVD837H | AB064VH | AB012VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGLVKPGGSL<br>RLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISS<br>SGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA<br>EDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGTLVTVSS |
| 168 | DVD837L | AB064VL | AB012VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT<br>ITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQ<br>SGVPSRFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ<br>ANGFPWTFGQGTKVEIKR |
| 169 | DVD838H | AB012VH | AB064VH | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS<br>WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI<br>SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW<br>YVLFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLV<br>KPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLE<br>WMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLK<br>LNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 170 | DVD838L | AB012VL | AB064VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW<br>YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD<br>FTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT<br>ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD<br>DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ<br>YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.29: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 40***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 171 | **DVD337H** | AB064VH | AB014VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL<br>RLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINT<br>YTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRA<br>EDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSS |
| 172 | DVD337L | AB064VL | AB014VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ<br>DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF<br>SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT<br>FGQGTKVEIKR |
| 173 | **DVD338H** | AB014VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN<br>WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS<br>SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGL<br>VKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGL<br>EWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFL<br>KLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 174 | DVD338L | AB014VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW<br>YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD<br>FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE<br>IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ<br>DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF<br>SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT<br>FGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.30: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 41***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 175 | DVD779H | AB064VH | AB014VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLE WVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQG TLVTVSS |
| 176 | DVD779L | AB064VL | AB014VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR |
| 177 | DVD780H | AB014VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQL QESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIR QPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDT SKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQG TLVTVSS |
| 178 | DVD780L | AB014VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.31: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 42***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 179 | DVD809H | AB064VH | AB014VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLE WVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQG TLVTVSS |
| 180 | DVD809L | AB064VL | AB014VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR |
| 181 | DVD810H | AB014VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQL QESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIR QPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDT SKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQG TLVTVSS |
| 182 | DVD810L | AB014VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.32: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 1) con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 43***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 183 | DVD839H | AB064VH | AB014VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL<br>RLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINT<br>YTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRA<br>EDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSS |
| 184 | DVD839L | AB064VL | AB014VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT<br>ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLH<br>SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ<br>YSTVPWTFGQGTKVEIKR |
| 185 | DVD840H | AB014VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN<br>WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS<br>SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGL<br>VKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGL<br>EWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFL<br>KLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 186 | DVD840L | AB014VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW<br>YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD<br>FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT<br>ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD<br>DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ<br>YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.33: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y DLL-4 con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 44***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 187 | DVD339H | AB064VH | AB015VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGYISP NSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLVTVSS |
| 188 | DVD339L | AB064VL | AB015VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTV TFGQGTKVEIKR |
| 189 | DVD340H | AB015VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPSQ TLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMGY ISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSV TAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 190 | DVD340L | AB015VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSS QDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSR FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPW TFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.34: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y DLL-4 con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 45***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 191 | DVD781H | AB064VH | AB015VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLE WVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLVTV SS |
| 192 | DVD781L | AB064VL | AB015VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQ QSYTGTVTFGQGTKVEIKR |
| 193 | DVD782H | AB015VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESGP GLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQF FLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTV SS |
| 194 | DVD782L | AB015VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRV TITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNL DDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCV QYAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.35: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y DLL-4 con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 46***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 195 | DVD811H | AB064VH | AB015VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLE WVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLVTV SS |
| 196 | DVD811L | AB064VL | AB015VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTV TFGQGTKVEIKR |
| 197 | DVD812H | AB015VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESGP GLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQF FLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTV SS |
| 198 | DVD812L | AB015VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSS QDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSR FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPW TFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.36: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y DLL-4 con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 47***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 199 | DVD841H | AB064VH | AB015VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGYISP NSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLVTVSS |
| 200 | DVD841L | AB064VL | AB015VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATTYYCQ QSYTGTVTFGQGTKVEIKR |
| 201 | DVD842H | AB015VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPSQ TLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMGY ISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSV TAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 202 | DVD842L | AB015VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATTYYCQQSYTGTVTFGQGTKV EIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRV TITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNL DDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCV QYAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.37: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y PLGF con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 48***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 203 | DVD341H | AB064VH | AB047VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELVKPGASV<br>KISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLEWIGWIYP<br>GSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLSSLTS<br>EDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS |
| 204 | DVD341L | AB064VL | AB047VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQ<br>SLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES<br>GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQS<br>YHLFTFGSGTKLEIKR |
| 205 | DVD342H | AB047VH | AB064VH | QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN<br>WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL<br>TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY<br>WGQGTLLTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPSQTL<br>SLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMGYIS<br>YSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTA<br>ADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 206 | DVD342L | AB047VL | AB064VL | DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR<br>KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG<br>SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS<br>GTKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTIT<br>CHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDG<br>VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYA<br>QFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.38: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y PLGF con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 49***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 207 | DVD783H | AB064VH | AB047VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQSGAEL<br>VKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLE<br>WIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYM<br>QLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS |
| 208 | DVD783L | AB064VL | AB047VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVT<br>MNCKSSQSLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIY<br>WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA<br>VYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR |
| 209 | DVD784H | AB047VH | AB064Vh | QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN<br>WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL<br>TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY<br>WGQGTLLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESGPGL<br>VKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGL<br>EWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFL<br>KLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 210 | DVD784L | AB047VL | AB064VL | DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR<br>KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG<br>SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS<br>GTKLEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSV<br>GDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYH<br>GTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT<br>YYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.39: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y PLGF con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 50***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 211 | DVD813H | AB064VH | AB047VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQQSGAEL<br>VKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLE<br>WIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYM<br>QLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS |
| 212 | DVD813L | AB064VL | AB047VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQ<br>SLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES<br>GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQS<br>YHLFTFGSGTKLEIKR |
| 213 | DVD814H | AB047VH | AB064VH | QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN<br>WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL<br>TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY<br>WGQGTLLTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESGPGL<br>VKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGL<br>EWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFL<br>KLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 214 | DVD814L | AB047VL | AB064VL | DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR<br>KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG<br>SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS<br>GTKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTIT<br>CHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDG<br>VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYA<br>QFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.40: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y PLGF con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 51***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 215 | DVD843H | AB064VH | AB047VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQSGAELVKPGASV<br>KISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLEWIGWIYP<br>GSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLSSLTS<br>EDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS |
| 216 | DVD843L | AB064VL | AB047VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**DIVLTQSPDSLAVSLGERVT<br>MNCKSSQSLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIY<br>WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA<br>VYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR |
| 217 | DVD844H | AB047VH | AB064VH | QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN<br>WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL<br>TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY<br>WGQGTLLTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPSQTL<br>SLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMGYIS<br>YSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTA<br>ADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 218 | DVD844L | AB047VL | AB064VL | DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR<br>KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG<br>SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS<br>GTKLEIKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSV<br>GDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYH<br>GTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT<br>YYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.41: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y ErB3 (sec. 3) con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 52***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 219 | DVD755H | AB064VH | AB067VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGGLVQPGGSL<br>RLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVSSISS<br>SGGWTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA<br>EDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTLVTVSS |
| 220 | DVD755L | AB064VL | AB067VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAP**QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS<br>DVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSN<br>RFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSS<br>IFVIFGGGTKVTVLG |
| 221 | DVD756H | AB067VH | AB064VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA<br>WVRQAPGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI<br>FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPS<br>QTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMG<br>YISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNS<br>VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 222 | DVD756L | AB067VL | AB064VL | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVV<br>SWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSGSKSG<br>NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG<br>TKVTVLG**QPKAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTIT<br>CHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDG<br>VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYA<br>QFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.42: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y ErB3 (sec. 3) con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 53***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 223 | DVD787H | AB064VH | AB067VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLE WVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTLVT VSS |
| 224 | DVD787L | AB064VL | AB067VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQ RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYC CSYAGSSIFVIFGGGTKVTVLG |
| 225 | DVD788H | AB067VH | AB064VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESG PGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVT VSS |
| 226 | DVD788L | AB067VL | AB064VL | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVV SWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG TKVTVLG**QPKAAPSVTLFPP**DIQMTQSPSSMSVSV GDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYH GTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT YYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.43: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y ErB3 (sec. 3) con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 54***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 227 | DVD817H | AB064VH | AB067VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLE WVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTLVT VSS |
| 228 | DVD817L | AB064VL | AB067VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS DVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSN RFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSS IFVIFGGGTKVTVLG |
| 229 | DVD818H | AB067VH | AB064VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQESG PGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVT VSS |
| 230 | DVD818L | AB067VL | AB064VL | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVV SWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG TKVTVLG**QPKAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTIT CHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYA QFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.44: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y ErB3 (sec. 3) con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 55***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 231 | DVD847H | AB064VH | AB067VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGGLVQPGGSL<br>RLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVSSISS<br>SGGWTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA<br>EDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTLVTVSS |
| 232 | DVD847L | AB064VL | AB067VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**QSALTQPASVSGSPGQSITI<br>SCTGTSSDVGSYNVVSWYQQHPGKAPKLIIYEVSQ<br>RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYC<br>CSYAGSSIFVIFGGGTKVTVLG |
| 233 | DVD848H | AB067VH | AB064VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA<br>WVRQAPGKGLEWVSSISSSGGWTLYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI<br>FDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKPS<br>QTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMG<br>YISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNS<br>VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 234 | DVD848L | AB067VL | AB064VL | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVV<br>SWYQQHPGKAPKLIIYEVSQRPSGVSNRFSGSKSG<br>NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG<br>TKVTVLG**QPKAAPSVTLFPP**DIQMTQSPSSMSVSV<br>GDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYH<br>GTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT<br>YYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.45: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 56***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 235 | DVD757H | AB064VH | AB070VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITP AGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSS |
| 236 | DVD757L | AB064VL | AB070VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPT FGQGTKVEIKR |
| 237 | DVD758H | AB070VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWM GYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLN SVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 238 | DVD758L | AB070VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.46: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 57***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 239 | DVD789H | AB064VH | AB070VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLE WVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLV TVSS |
| 240 | DVD789L | AB064VL | AB070VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYTTPPTFGQGTKVEIKR |
| 241 | DVD790H | AB070VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQES GPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPP GKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKN QFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLV TVSS |
| 242 | DVD790L | AB070VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.47: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 58***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 243 | DVD819H | AB064VH | AB070VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLE WVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLV TVSS |
| 244 | DVD819L | AB064VL | AB070VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPT FGQGTKVEIKR |
| 245 | DVD820H | AB070VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQES GPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPP GKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKN QFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLV TVSS |
| 246 | DVD820L | AB070VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.48: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 2) con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 59***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 247 | DVD849H | AB064VH | AB070VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL<br>RLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITP<br>AGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA<br>EDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSS |
| 248 | DVD849L | AB064VL | AB070VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT<br>ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY<br>SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ<br>SYTTPPTFGQGTKVEIKR |
| 249 | DVD850H | AB070VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH<br>WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI<br>SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY<br>AMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVKP<br>SQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWM<br>GYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLN<br>SVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 250 | DVD850L | AB070VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW<br>YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD<br>FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT<br>ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD<br>DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ<br>YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.49: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 60***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 251 | DVD759H | AB064VH | AB071VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAIYP YSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVSS |
| 252 | DVD759L | AB064VL | AB071VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ VIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLT FGQGTKVEIKR |
| 253 | DVD760H | AB071VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVK PSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKL NSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 254 | DVD760L | AB071VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.50: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 61***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 255 | DVD791H | AB064VH | AB071VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLE WVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTL VTVSS |
| 256 | DVD791L | AB064VL | AB071VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKVEIKR |
| 257 | DVD792H | AB071VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQE SGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQP PGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSK NQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTL VTVSS |
| 258 | DVD792L | AB071VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.51: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 62***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 259 | DVD821H | AB064VH | AB071VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLE WVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTL VTVSS |
| 260 | DVD821L | AB064VL | AB071VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ VIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLT FGQGTKVEIKR |
| 261 | DVD822H | AB071VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLQE SGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQP PGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSK NQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTL VTVSS |
| 262 | DVD822L | AB071VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.52: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y VEGF (sec. 3) con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 63***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 263 | DVD851H | AB064VH | AB071VH | QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI<br>SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSL<br>RLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAIYP<br>YSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA<br>EDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLVTVSS |
| 264 | DVD851L | AB064VL | AB071VL | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT<br>ITCRASQVIRRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLA<br>SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ<br>SNTSPLTFGQGTKVEIKR |
| 265 | DVD852H | AB071VH | AB064VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH<br>WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI<br>SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP<br>WAMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLVK<br>PSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEW<br>MGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKL<br>NSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS |
| 266 | DVD852L | AB071VL | AB064VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRSLAW<br>YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD<br>FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVE<br>IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT<br>ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD<br>DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ<br>YAQFPWTFGGGTKLEIKR |

***Ejemplo 2.53: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y RGMa con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 64***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 267 | DVD713H | AB033VH | AB059VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG SSLKLSCVASGFTFSNYGMNWIRQAPKKGLEWIGM IYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLEMNS LRSEDTAIYYCAKGTTPDYWGQGVMVTVSS |
| 268 | DVD713L | AB033VL | AB059VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DVVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQ SLEYSDGYTFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVSNRFSG VPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQAT HDPLTFGSGTKLEIKR |
| 269 | DVD714H | AB059VH | AB033VH | EVQLVESGGGLVQPGSSLKLSCVASGFTFSNYGMN WIRQAPKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLEMNSLRSEDTAIYYCAKGTTPDYW GQGVMVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPSQSLS ITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSG GNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSND TAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA |
| 270 | DVD714L | AB059VL | AB033VL | DVVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQSLEYSDGY TFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVSNRFSGVPDRFIGS GSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQATHDPLTFGS GTKLEIKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFS CRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISG IPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNN NWPTTFGAGTKLELKR |

***Ejemplo 2.54: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y RGMa con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 65***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 271 | DVD871H | AB033VH | AB059VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGSSLKLSCVASGFTFSNYGMNWIRQAPKK GLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLEMNSLRSEDTAIYYCAKGTTPDYWGQGVMVTV SS |
| 272 | DVD871L | AB033VL | AB059VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DVVLTQTPVSLSVTLGDQAS MSCRSSQSLEYSDGYTFLEWFLQKPGQSPQLLIYE VSNRFSGVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGV YYCFQATHDPLTFGSGTKLEIKR |
| 273 | DVD872H | AB059VH | AB033VH | EVQLVESGGGLVQPGSSLKLSCVASGFTFSNYGMN WIRQAPKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLEMNSLRSEDTAIYYCAKGTTPDYW GQGVMVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQSGPGLV QPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEW LGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKM NSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTV SA |
| 274 | DVD872L | AB059VL | AB033VL | DVVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQSLEYSDGY TFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVSNRFSGVPDRFIGS GSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQATHDPLTFGS GTKLEIKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVSP GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKY ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIAD YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR |

***Ejemplo 2.55: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y RGMa con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 66***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 275 | DVD877H | AB033VH | AB059VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVESG GGLVQPGSSLKLSCVASGFTFSNYGMNWIRQAPKK GLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLEMNSLRSEDTAIYYCAKGTTPDYWGQGVMVTV SS |
| 276 | DVD877L | AV033VL | AB059VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DVVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQ SLEYSDGYTFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVSNRFSG VPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQAT HDPLTFGSGTKLEIKR |
| 277 | DVD878H | AB059VH | AB033VH | EVQLVESGGGLVQPGSSLKLSCVASGFTFSNYGMN WIRQAPKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLEMNSLRSEDTAIYYCAKGTTPDYW GQGVMVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQSGPGLV QPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEW LGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKM NSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTV SA |
| 278 | DVD878L | AB059VL | AV033VL | DVVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQSLEYSDGY TFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVSNRFSGVPDRFIGS GSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQATHDPLTFGS GTKLEIKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFS CRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISG IPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNN NWPTTFGAGTKLELKR |

***Ejemplo 2.56: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y RGMa con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 67***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 279 | DVD883H | AB033VH | AB059VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPG SSLKLSCVASGFTFSNYGMNWIRQAPKKGLEWIGM IYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLEMNS LRSEDTAIYYCAKGTTPDYWGQGVMVTVSS |
| 280 | DVD883L | AB033VL | AB059VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DVVLTQTPVSLSVTLGDQAS MSCRSSQSLEYSDGYTFLEWFLQKPGQSPQLLIYE VSNRFSGVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGV YYCFQATHDPLTFGSGTKLEIKR |
| 281 | DVD884H | AB059VH | AB033VH | EVQLVESGGGLVQPGSSLKLSCVASGFTFSNYGMN WIRQAPKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLEMNSLRSEDTAIYYCAKGTTPDYW GQGVMVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQPSQSLS ITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSG GNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSND TAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA |
| 282 | DVD884L | AB059VL | AB033VL | DVVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQSLEYSDGY TFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVSNRFSGVPDRFIGS GSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQATHDPLTFGS GTKLEIKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVSP GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKY ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIAD YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR |

***Ejemplo 2.57: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y Toxoide de Tétanos con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 68***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 283 | DVD763H | AB033VH | AB095VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLLESGGDLVRPG GSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAPGKGLDWVAH ISASAGATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNN LRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPWGQGTLVTVS S |
| 284 | DVD763L | AB033VL | AB095VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQ DISDRLAWYQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLT FGGGTKVEMKR |
| 285 | DVD764H | AB095VH | AB033VH | EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQ PSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWL GVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMN SLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVS A |
| 286 | DVD764L | AB095VL | AB033VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKR |

***Ejemplo 2.58: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y Toxoide de Tétanos con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 69***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 287 | DVD873H | AB033VH | AB095VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLESG GDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAPGK GLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDNSKNT LFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPWGQ GTLVTVSS |
| 288 | DVD873L | AB033VL | AB095VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT IACRASQDISDRLAWYQQKPGKVPKVLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTKVEMKR |
| 289 | DVD874H | AB095VH | AB033VH | EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQ SGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP GKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQ GTLVTVSA |
| 290 | DVD874L | AB095VL | AB033VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKR |

***Ejemplo 2.59: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y Toxoide de Tétanos con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 70***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 291 | DVD879H | AB033VH | AB095VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLESG GDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAPGK GLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDNSKNT LFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPWGQ GTLVTVSS |
| 292 | DVD879L | AV033VL | AB095VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQ DISDRLAWYQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLT FGGGTKVEMKR |
| 293 | DVD880H | AB095VH | AB033VH | EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**QVQLKQ SGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP GKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQ GTLVTVSA |
| 294 | DVD880L | AB095VL | AV033VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKR |

***Ejemplo 2.60: Generación de DVD-Igs de EGFR (sec. 2) y Toxoide de Tétanos con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 71***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 295 | DVD885H | AB033VH | AB095VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLLESGGDLVRPG GSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAPGKGLDWVAH ISASAGATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNN LRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPWGQGTLVTVS S |
| 296 | DVD885L | AB033VL | AB095VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT IACRASQDISDRLAWYQQKPGKVPKVLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTKVEMKR |
| 297 | DVD886H | AB095VH | AB033VH | EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGPGLVQ PSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWL GVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMN SLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVS A |
| 298 | DVD886L | AB095VL | AB033VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR**TVAAPSVFIFPP**DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKR |

***Ejemplo 2.61: Generación de DVD-Igs de VEGF (sec. 1) y Toxoide de Tétanos con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 72***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 299 | DVD869H | AB014VH | AB095VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGDL VRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAPGKGLD WVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFL QMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPWGQGTL VTVSS |
| 300 | DVD869L | AB014VL | AB095VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQ DISDRLAWYQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLT FGGGTKVEMKR |
| 301 | DVD870H | AB095VH | AB014VH | EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWV GWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTL VTVSS |
| 302 | DVD870L | AB095VL | AB014VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR |

***Ejemplo 2.62: Generación de DVD-Igs de VEGF (sec. 1) y Toxoide de Tétanos con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 73***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 303 | DVD875H | AB014VH | AB095VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQL LESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQ APGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFD PWGQGTLVTVSS |
| 304 | DVD875L | AB014VL | AB095VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT IACRASQDISDRLAWYQQKPGKVPKVLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTKVEMKR |
| 305 | DVD876H | AB095VH | AB014VH | EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAP GKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSK STAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFD VWGQGTLVTVSS |
| 306 | DVD876L | AB095VL | AB014VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR |

***Ejemplo 2.63: Generación de DVD-Igs de VEGF (sec. 1) y Toxoide de Tétanos con el conjunto de enlaces 3***

***Tabla 74***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 307 | DVD881H | AB014VH | AB095VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQL LESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQ APGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFD PWGQGTLVTVSS |
| 308 | DVD881L | AB014VL | AB095VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQ DISDRLAWYQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLT FGGGTKVEMKR |
| 309 | DVD882H | AB095VH | AB014VH | EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAP GKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSK STAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFD VWGQGTLVTVSS |
| 310 | DVD882L | AB095VL | AB014VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGQGTKVEIKR |

***Ejemplo 2.64: Generación de DVD-Igs de VEGF (sec. 1) y Toxoide de Tétanos con el conjunto de enlaces 4***

***Tabla 75***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>1234567890123456789012345678901234 5 |
|---|---|---|---|---|
| 311 | DVD887H | AB014VH | AB095VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGS SHWYFDVWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGDL VRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAPGKGLD WVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFL QMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPWGQGTL VTVSS |
| 312 | DVD887L | AB014VL | AB095VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE IKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT IACRASQDISDRLAWYQQKPGKVPKVLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTKVEMKR |
| 313 | DVD888H | AB095VH | AB014VH | EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWV GWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTL VTVSS |
| 314 | DVD888L | AB095VL | AB014VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR |

***Ejemplo 2.65: Generación de DVD-Igs de Toxoide de Tétanos y Toxoide de Tétanos con el conjunto de enlaces 1***

***Tabla 76***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 315 | DVD889H | AB095VH | AB095VH | EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGDLVR PGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAPGKGLDWV AHISASAGATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQM NNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPWGQGTLVT VSS |
| 316 | DVD889L | AB095VL | AB095VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQ DISDRLAWYQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLT FGGGTKVEMKR |
| 317 | DVD890H | AB095VH | AB095VH | EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLE SGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAP GKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDNSK NTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPW GQGTLVTVSS |
| 318 | DVD890L | AB095VL | AB095VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT IACRASQDISDRLAWYQQKPGKVPKVLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTKVEMKR |

***Ejemplo 2.66: Generación de DVD-Igs de Toxoide de Tétanos y Toxoide de Tétanos con el conjunto de enlaces 2***

***Tabla 77***

| SEC ID NO | Nombre de dominio variable DVD | Nombre de dominio variable externo | Nombre de dominio variable interno | Secuencia<br><br>12345678901234567890123456789012345 |
|---|---|---|---|---|
| 319 | DVD891H | AB095VH | AB095VH | EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EVQLLE SGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAP GKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDNSK NTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPW GQGTLVTVSS |
| 320 | DVD891L | AB095VL | AB095VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR**TVAAP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQ DISDRLAWYQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLT FGGGTKVEMKR |
| 321 | DVD892H | AB095VH | AB095VH | EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGDLVR PGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAPGKGLDWV AHISASAGATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQM NNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPWGQGTLVT VSS |
| 322 | DVD892L | AB095VL | AB095VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSVSASVGDRVT IACRASQDISDRLAWYQQKPGKVPKVLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTKVEMKR |

La presente invención incorpora por referencia en su totalidad las técnicas bien conocidas en el campo de la biología molecular y suministro del fármaco. Está técnica incluye, pero no se limita a, las técnicas descritas en las publicaciones siguientes:

Ausubel, F.M. y colaboradores eds., Short 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 and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);

Giege, R. and 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, y colaboradores, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981);

Harlow y colaboradores, Antibodies: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);

Kabat y colaboradores, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991);

Kabat, E.A., y colaboradores (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;

Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001)

Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);

Lu and 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 and 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. y colaboradores 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 por referencia***

El contenido de todas las referencias citadas (incluyendo las referencias de literatura, patentes, solicitudes de patente, y sitios Web) que se pueden citar a través de esta solicitud son incorporadas expresamente por este medio por referencia en su

totalidad, al igual que las referencias citadas en las mismas. La práctica de la presente invención hará uso de, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular y biología celular, que son bien conocidas en la técnica.

***Equivalentes***

La presente invención puede incorporarse a otras formas específicas sin apartarse del espíritu o características esenciales de la misma. Las modalidades precedentes deberán por lo tanto considerarse en todos los aspectos ilustrativos, más que limitar, a la invención descrita en la presente. El alcance de la invención se indica así por las reivindicaciones anexas, más que por la descripción precedente, y todos los cambios que vienen dentro del significado e intervalo de equivalencia de las reivindicaciones por lo tanto se desean para comprenderse en la presente.

## REIVINDICACIONES

1. 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 de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo;

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

C es un dominio constante de cadena pesada;

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

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

en donde VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOS: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 323, 325, y 327.

2. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína de unión es capaz de unir un par seleccionado del grupo que consiste de EGFR y CD-3; EGFR e IGF1R; EGFR y RON; EGFR y HGF; VEGF y EGFR; EGFR y ErbB3, EGFR y DLL-4, EGFR y PLGF, EGFR y EGFR, EGFR y

RGMa, EGFR y toxoide de tétanos; VEGF y toxoide de tétanos; y toxoide de tétanos y toxoide de tétanos.

3. Una proteína de unión de la reivindicación 1, en donde (X2)n está ausente.

4. 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 de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo;

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

C es un dominio constante de cadena ligera;

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

(X2)n no comprende una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente, en donde VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOS: 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 324, 326, y 328.

5. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la proteína de unión es capaz de unir un par seleccionado del grupo que consiste de EGFR y CD-3; EGFR e IGF1R; EGFR y RON; EGFR y HGF; VEGF y EGFR; EGFR y

ErbB3, EGFR y DLL-4, EGFR y PLGF, EGFR y EGFR, EGFR y RGMa, EGFR y toxoide de tétanos; VEGF y toxoide de tétanos; y toxoide de tétanos y toxoide de tétanos.

6. Una proteína de unión de la reivindicación 4, en donde (X2)n está ausente.

7. Una proteína de unión que comprende las primeras y segundas cadenas de polipéptido, en donde,

la 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 madre o porción de unión a antígeno del mismo;

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

C es un dominio constante de cadena pesada;

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

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

en donde la 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 madre o porción de unión a antígeno del mismo;

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

C es un dominio constante de cadena ligera;

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

(X2)n no comprende una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente, en donde los dominios variables de cadena pesada VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOS: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 323, 325, y 327 y en donde los dominios variables de cadena ligera VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOS: 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 324, 326, y 328.

8. La proteína de unión de la reivindicación 7, en donde la proteína de unión es capaz de unir un par seleccionado del grupo que consiste de EGFR y CD-3; EGFR e IGF1R; EGFR y RON; EGFR y HGF; VEGF y EGFR; EGFR y ErbB3, EGFR y DLL-4, EGFR y PLGF, EGFR y EGFR, EGFR y RGMa, EGFR y toxoide de tétanos; VEGF y toxoide de tétanos; y toxoide de tétanos y toxoide de tétanos.

9. La proteína de unión de la reivindicación 8, 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 8, en donde la región Fc se selecciona del grupo que consiste de la región Fc de secuencia nativa y una región Fc de secuencia variable.

11. La proteína de unión de la reivindicación 8, en donde la región Fc se selecciona del grupo que consiste de una región Fc de un IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, y IgD.

12. La proteína de unión de la reivindicación 8, en donde VD1 de la primera cadena de polipéptido y VD1 de la segunda cadena de polipéptido se obtienen del mismo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo.

13. La proteína de unión de la reivindicación 8, en donde VD1 de la primera cadena de polipéptido y VD1 de la segunda cadena de polipéptido se obtienen de un anticuerpo madre diferente o porción de unión a antígeno del mismo.

14. La proteína de unión de la reivindicación 8, en donde los VD2s de la primera cadena de polipéptido y los VD2s de la segunda cadena de polipéptido se obtienen del mismo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo.

15. La proteína de unión de la reivindicación 8, en donde los VD2s de la primera cadena de polipéptido y los VD2s de la segunda cadena de polipéptido se obtienen de un anticuerpo madre diferente o porción de unión a antígeno del mismo.

16. La proteína de unión de la reivindicación 8, en donde los primeros y segundos anticuerpos madre unen diferentes epítopos en el antígeno.

17. La proteína de unión de la reivindicación 8, en donde el primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, une el primer antígeno con una potencia diferente de la potencia con la cual el segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, une el segundo antígeno.

18. La proteína de unión de la reivindicación 8, en donde el primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, une el primer antígeno con una afinidad diferente de la afinidad con la cual el segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, une el segundo antígeno.

19. La proteína de unión de la reivindicación 8, en donde el primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, se seleccionan del grupo que consiste de, anticuerpo humano, anticuerpo injertado en CDR, y anticuerpo humanizado.

20. La proteína de unión de la reivindicación 8, en donde el primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, se selecciona del grupo que consiste de un fragmento Fab; fragmento $F(ab')_2$; fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un enlace 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 una sola ramificación de un anticuerpo; un

fragmento dAb; una región de determinación de complementariedad (CDR) aislada; un anticuerpo de cadena simple; y un diacuerpo.

21. La proteína de unión de la reivindicación 8, en donde la proteína de unión posee por lo menos una característica deseada exhibida por el primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, o por el segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo.

22. La proteína de unión de la reivindicación 21, en donde la característica deseada se selecciona de uno o más parámetros del anticuerpo.

23. La proteína de unión de la reivindicación 22, en donde los parámetros del anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítopo, estabilidad, solubilidad, eficacia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y unión a antígeno ortólogo.

24. Una DVD-Ig capaz de unir dos antígenos que comprenden cuatro cadenas de polipéptido, en donde las primeras y terceras cadenas de polipéptido comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

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

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

C es un dominio constante de cadena pesada;

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

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

y en donde la segundas y cuartas cadenas de polipéptido comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

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

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

C es un dominio constante de cadena ligera;

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

(X2)n no comprende una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente, en donde los dominios variables de cadena pesada VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOS: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 323, 325, y 327 y en donde los dominios variables de cadena ligera VD1 y VD2

comprenden una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOS: 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 324, 326, y 328.

25. Un método para generar una inmunoglobulina de dominio variable dual capaz de unir dos antígenos que comprenden las etapas

a) obtener un primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unir un primer antígeno;

b) obtener un segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unir un segundo antígeno;

c) construir la primera y tercera cadena de polipéptido que comprenden VD1-(X1)n VD2-C-(X2)n, en donde

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

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

C es un dominio constante de cadena pesada;

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

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

d) construir la segunda y cuarta cadenas de polipéptido que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

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

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido del segundo anticuerpo o antígeno madre que une de eso;

C es un dominio constante de cadena ligera;

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

(X2)n no comprende una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente;

e) expresar las primeras, segunda, terceras y cuartas cadenas de polipéptido; tal que sea generada una inmunoglobulina de dominio variable dual capaz de unir el primer y segundo antígeno; en donde los dominios variables de cadena pesada VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOS: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 323, 325, y 327 y en donde los dominios variables de cadena ligera VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOS: 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 324, 326, y 328.

26. El método de la reivindicación 25, en donde el primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del

mismo, se seleccionan del grupo que consiste del, anticuerpo humano, anticuerpo injertado en CDR, y anticuerpo humanizado.

27. El método de la reivindicación 25, en donde el primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, se selecciona del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un enlace 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 una sola ramificación de un anticuerpo, un fragmento dAb, una región de determinación de complementariedad (CDR) aislada, un anticuerpo de cadena simple, y diacuerpos.

28. El método de la reivindicación 25, en donde el primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo posee por lo menos una característica deseada exhibida por la inmunoglobulina de dominio variable dual.

29. El método de la reivindicación 25, en donde el segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo posee por lo menos una característica deseada exhibida por la inmunoglobulina de dominio variable dual.

30. El método de la reivindicación 25, en donde la región Fc se selecciona del grupo que consiste de una región Fc de secuencia nativa y una región Fc de secuencia variable.

31. El método de la reivindicación 25, en donde la región Fc se selecciona del grupo que consiste de una región Fc de un IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, y IgD.

32. El método de la reivindicación 28, en donde la característica deseada se selecciona de uno o más parámetros del anticuerpo.

33. El método de la reivindicación 29, en donde la característica deseada se selecciona de uno o más parámetros del anticuerpo.

34. El método de la reivindicación 32, en donde los parámetros del anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítopo, estabilidad, solubilidad, eficacia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y unión a antígeno ortólogo.

35. El método de la reivindicación 33, en donde los parámetros de anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítopo, estabilidad, solubilidad, eficacia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y unión a antígeno ortólogo.

36. El método de la reivindicación 25, en donde el primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, une el

primer antígeno con una afinidad diferente que la afinidad con la cual el segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, une el segundo antígeno.

37. El método de la reivindicación 25, en donde el primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, une el primer antígeno con una potencia diferente que la potencia con la cual el segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, une el segundo antígeno.

38. Un método para generar una inmunoglobulina de dominio variable dual capaz de unir dos antígenos con las características deseadas que comprende las etapas de

a) obtener un primer anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unir un primer antígeno y poseer por lo menos una característica deseada exhibida por la inmunoglobulina de dominio variable dual;

b) obtener un segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo, capaz de unir un segundo antígeno y poseer por lo menos una característica deseada exhibida por la inmunoglobulina de dominio variable dual;

c) construir la primera y tercera cadenas de polipéptido encadena que comprende VD1-(X1)n VD2-C-(X2)n, en donde;

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

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada

obtenido del segundo anticuerpo madre o porción de unión a antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena pesada;

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

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

d) construir la segunda y cuarta cadenas de polipéptido que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde;

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

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

C es un dominio constante de cadena ligera;

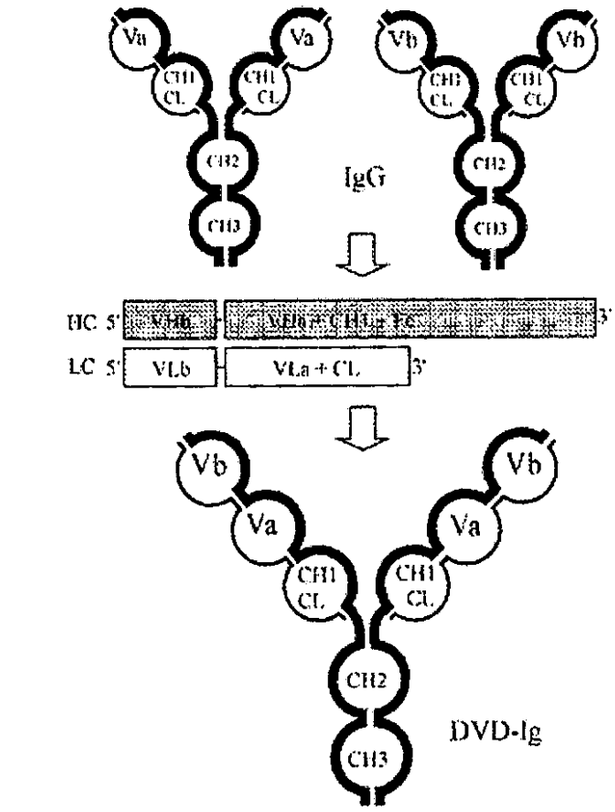
(X1)n es un enlace con la condición de que no sea CH1, en donde (X1)n está presente o ausente; y

(X2)n no comprende una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente;

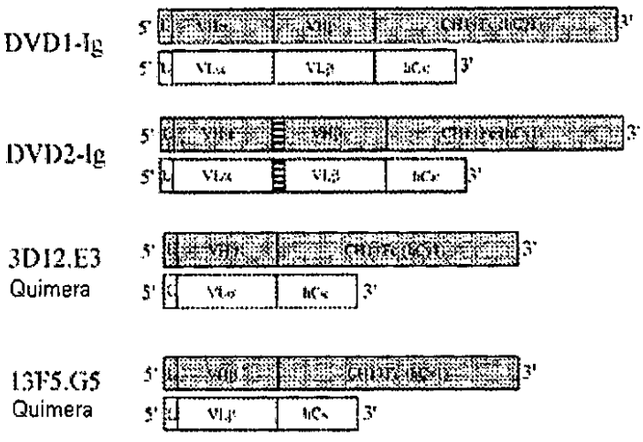
e) expresar la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas de polipéptido; tal que se genere una inmunoglobulina de dominio variable dual capaz de unir el primer y segundo antígeno con las características deseadas.

Figura 1

A




B






486

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-161641- -00000-0000
Fecha: 2011-11-24 17:31:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 486

**PATENTE DE INVENCIÓN** ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

| | |
|---|---|
| ☐ | Indicación que 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 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 |
| 36 ☒ | Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capitulo descriptivo, reivindicatorio, resume) |
| 486 ☒ | 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 TRAZADO** ☐ **(Art. 92 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 grafica de un esquema de trazado |
| ☐ | Comprobante de pago de las tasas establecidas |

Completa ☐ Incompleta ☐