Industria y C...
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-081792- -00000-0000
Fecha: 2012-05-17 16:05:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 523

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE No. _____

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

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 16/00**

71. SOLICITANTE **ABBOTT LABORATORIES**

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

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

22. BOGOTÁ, D.C. _____

(FORMA P 10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-081792- -00000-0000

Fecha: 2012-05-17 16:05:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 523

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL-PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/US2010/054521	Fecha	28/10/10
Publicación Internacional No.	WO 2011/059755 A3	Fecha	19/05/11

3 (54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: "INMUNOGLOBULINAS CON DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS"

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP

C07K 16/00

5 (71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
4.	ABBOTT LABORATORIES			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, Estados Unidos de América.	No. TELÉFONO	3264270
CIUDAD	Abbott Park	E-MAIL	jllcco@lloredacamacho.com
DEPARTAMENTO/ESTADO	Illinois	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	Estado de Illinois, Estados Unidos de América.
PAÍS DE RESIDENCIA	Estados Unidos de América		

7 (72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.	GHAYUR	Tariq	Estados Unidos de América
2.	SALFELD	Jochen, G.	Alemania
3.	MCPHERSON	Michael, J.	Reino Unido
4.	HARRIS	Maria, C.	Italia
5.	LIU	Junjian	China

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: jllcco@lloredacamacho.com

8 DATOS INVENTOR (ES)

PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Estados Unidos de América	Massachusetts	Holliston	1014 Washington Street, Holliston, Massachusetts 01746, Estados Unidos de América.
		Grafton	177 Old Westboro Road, No. Grafton, Massachusetts 01536, Estados Unidos de América.
		Ashby	287 Pillsbury Road, Ashby, Massachusetts 01431, Estados Unidos de América.
		Shrewbury	55 Trowbridge Lane, Shrewsbury, Massachusetts 01545, Estados Unidos de América.
		Shrewbury	14 Crimson Drive, Shrewsbury, Massachusetts 01545, Estados Unidos de América.

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 (74) ☒ **REPRESENTANTE** ☒ **APODERADO**

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LLOREDA RICAURTE	ALICIA	C.C 39.690.713 T.P .53.215

DIRECCIÓN	Calle 72 No 5-83 Piso 5to	No. TELÉFONO	3264270
CIUDAD	Bogotá	E-MAIL	jllcco@lloredacamacho.com
PAÍS	Colombia	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
	1. Estados Unidos de América	US	61/255,686	09/10/28

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13 REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas	Universidades públicas o privadas	Entidades sin ánimo de lucro
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar

14 AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 12-0047761	Fecha 14-05-2012

15 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante

C.C. 39.690.713 T.P. 53.215 Apoderado

16 ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 447
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 76
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 1
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poderes, si fuera el caso.
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.
14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	NUMERO DE RADICACIÓN
☐ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad		FECHA DE PRESENTACIÓN

4	(71) SOLICITANTE (S)			
	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
	2. 3. 4.			

5	DATOS DEL SOLICITANTE			
	PAÍS DE RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
	2. 3. 4.			
	TELÉFONO	FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
	2. 3. 4.			

6	(72) INVENTOR (ES)		
	APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD
	6. ISAKSON	Peter, C.	Estados Unidos de América
	7. GU	Jijie	Estados unidos de América

7	DATOS INVENTOR (ES)			
	DIRECCIÓN	CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
	14 Hillside Avenue, Southborough, Massachusetts 01772, Estados Unidos de América. 12 Tern Drive, Shrewsbury, Massachusetts 01545, Estados Unidos de América.	Southborough Shrewsbury	Massachusetts	Estados Unidos de América

9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
	PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)

INMUNOGLOBULINAS CON DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS

Referencia a Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud invoca prioridad de la Solicitud de Patente provisional de los EE.UU. N° Acta: 61/255.686, presentada el 28 de octubre, 2009, cuyos contenidos se incorporan expresamente en su totalidad en la presente a modo de referencia y para cualquier propósito.

Campo de la Invención

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

Antecedentes de la Invención

Las proteínas modificadas, tales como anticuerpos multiespecíficos con capacidad de unirse a dos o más antígenos son conocidas en el arte. Dichas proteínas de unión multiespecífica se pueden generar usando fusión celular, conjugación química, o técnicas de ADN recombinante.

Los anticuerpos biespecíficos han sido producidos usando la tecnología cuadroma (véase Milstein, C. y A.C. Cuello (1983) Nature 305(5934):537-40) en base a la fusión somática de dos líneas celulares de hibridoma diferentes que expresan anticuerpos monoclonales murinos (mAbs) con las especificidades deseadas del anticuerpo biespecífico. Debido al apareamiento al azar de dos cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas (Ig) diferentes en la línea celular híbrido–hibridoma (o cuadroma) resultante, se han generado hasta diez especies diferentes de Ig, de las cuales sólo una es el anticuerpo

biespecífico funcional. La presencia de productos secundarios desapareados, y rendimientos de producción significativamente reducidos, indica que se requieren procedimientos sofisticados de purificación.

Los anticuerpos biespecíficos también se pueden producir por conjugación química de dos mAbs diferentes (véase Staerz, U.D., et al. (1985) Nature 314(6012): 628-31). Esta metodología no genera una preparación homogénea. Otras metodologías han usado la conjugación química de dos mAbs diferentes o fragmentos de anticuerpos más pequeños (véase Brennan, M., et al. (1985) Science 229(4708): 81-3).

Otro método usado para producir anticuerpos biespecíficos es el acoplamiento de dos anticuerpos parentales con un entrecruzador heterobifuncional, pero los anticuerpos biespecíficos resultantes sufren de una heterogeneidad molecular significativa debido a que la reacción del entrecruzador con los anticuerpos parentales no es dirigida a un sitio. Para obtener preparaciones más homogéneas de anticuerpos biespecíficos, se han entrecruzado químicamente dos fragmentos Fab diferentes por sus residuos cisteína bisagra de un modo dirigido a sitio (véase Glennie, M.J., et al. (1987) J. Immunol. 139(7): 2367-75). Pero este método da como resultado fragmentos Fab'2, no la molécula IgG completa.

Se han desarrollado una gran variedad de otros formatos de anticuerpo biespecífico recombinante (véase Kriangkum, J., et al. (2001) Biomol. Eng. 18(2): 31-40). Entre ellos los más usados son las moléculas Fv de cadena única en tándem y diabodies [*anticuerpos divalentes*], y diferentes derivados de los mismos. Habitualmente, la construcción de estas moléculas comienza a partir de dos fragmentos de Fv de cadena única (scFv) que reconocen

diferentes antígenos (véase Economides, A.N., et al. (2003) Nat. Med. 9(1): 47-52). Las moléculas scFv en tándem (taFv) representan un formato simple conectando solamente las dos moléculas scFv con un conector peptídico adicional. Los dos fragmentos presentes en estas moléculas scFv en tándem forman entidades de plegado separadas. Se pueden usar diferentes conectores para conectar los dos fragmentos scFv y conectores con una longitud de hasta 63 residuos (véase Nakanishi, K., et al. (2001) Ann. Rev. Immunol. 19: 423-74). A pesar que los fragmentos scFv parentales se pueden expresar normalmente en forma soluble en bacterias, se observa con frecuencia, sin embargo, que las moléculas scFv en tándem forman agregados insolubles en bacterias. Por lo tanto, los protocolos de replegamiento el uso de sistemas de expresión mamíferos se aplican de rutina para producir moléculas scFv en tándem solubles. En un estudio reciente, se informó la expresión *in vivo* en conejos o ganado transgénicos de un scFv en tándem dirigido contra CD28 y un proteoglicano asociado a melanoma (véase Gracie, J.A., et al. (1999) J. Clin. Invest. 104(10): 1393-401). En esta construcción, las dos moléculas scFv se conectaron por medio de un conector CH1 y se encontraron concentraciones séricas del anticuerpo biespecífico de hasta 100 mg/l. Se emplearon diferentes metodologías incluyendo variaciones del orden de los dominios o usando conectores intermedios con longitud o flexibilidad variable para permitir la expresión soluble en bacterias. Unos pocos estudios han informado recientemente la expresión de moléculas scFv en tándem solubles en bacterias (véase Leung, B.P., et al. (2000) J. Immunol. 164(12): 6495-502; Ito, A., et al. (2003) J. Immunol. 170(9): 4802-9; Karni, A., et al. (2002) J. Neuroimmunol. 125(1-2): 134-40) usando tanto un conector muy corto Ala3 o conectores largos

ricos en glicina/serina. En un estudio reciente, se empleó la expresión en fago de un repertorio de scFv en tándem conteniendo conectores intermedios al azar con una longitud de 3 ó 6 residuos para enriquecer aquellas moléculas que se producen en forma soluble y activa en bacterias. Esta metodología dio como resultado el aislamiento de una molécula scFv en tándem con un conector de 6 residuos aminoácido (véase Arndt, M. y J. Krauss (2003) Methods Mol. Biol. 207: 305-21). No está claro si esta secuencia de conector representa una solución general para le expresión soluble de moléculas scFv en tándem. Nobstante, este estudio demostró que la expresión en fagos de moléculas scFv en tándem en combinación con mutagénesis dirigida es una herramienta poderosa para enriquecer estas moléculas, que se pueden expresar en bacterias en una forma activa.

Los diabodies biespecíficos (Db) utilizan el formato de diabody para la expresión. Los diabodies se producen a partir de fragmentos scFv por reducción de la longitud del conector que conecta el dominio VH y VL a aproximadamente 5 residuos (véase Peipp, M. y T. Valerius (2002) Biochem. Soc. Trans. 30(4): 507-11). Esta reducción del tamaño del conector facilita la dimerización de dos cadenas polipeptídicas por apareamiento cruzado de los dominios VH y VL. Los diabodies biespecíficos son producidos por expresión de dos cadenas polipeptídicas con, tanto la estructura VHA-VLB y VHB-VLA (configuración VH-VL), o VLA-VHB y VLB-VHA (configuración VL-VH) en la misma célula. En el pasado se han producido una gran variedad de diabodies biespecíficos diferentes y la mayor parte de ellos son expresados en forma soluble en bacterias. Sin embargo, un estudio comparativo reciente demuestra que la orientación del dominio variable puede influir en la expresión y formación

de los sitios de unión activos (véase Mack, M. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92(15): 7021-5). Nobstante, la expresión soluble en bacterias representa una ventaja importante por sobre las moléculas scFv en tándem. Sin embargo, debido a que dos cadenas polipeptídicas diferentes se expresan en una única célula, se pueden producir homodímeros inactivos junto con heterodímeros activos. Esto hace necesario la implementación de pasos de purificación adicionales con el objetivo de obtener preparaciones homogéneas de diabodies biespecíficos. Una metodología para forzar la generación de diabodies biespecíficos es la producción de diabodies "botón en ojal" (véase Holliger, P., T. Prospero, y G. Winter (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90(14): 6444-8.18). Esto se demostró para un diabody biespecífico dirigido contra HER2 y CD3. Se introdujo una gran protuberancia en el dominio VH por intercambio de Val37 por Phe y Leu45 por Trp y se produjo un hueco complementario en el dominio VL por mutación de Phe98 a Met y Tyr87 a Ala, ya sea en los dominios variables de anti-HER2 o del anti-CD3. Por uso de esta metodología, se pudo aumentar la producción de diabodies biespecíficos de 72% por el diabody parental a más de 90% por el diabody "botón en ojal". Notablemente, los rendimientos de producción solo disminuyeron levemente como resultado de estas mutaciones. Sin embargo, se observó una reducción en la actividad de unión al antígeno para muchas construcciones. De esta manera, esta metodología bastante elaborada requiere el análisis de varias construcciones con el objetivo de identificar aquellas mutaciones que producen una molécula heterodimérica con actividad de unión alterada. Adicionalmente, dicha metodología requiere la modificación por mutación de la secuencia de inmunoglobulina en la región constante, creando de este modo la forma no

nativa o no natural de la secuencia del anticuerpo, que puede dar como resultado una inmunogeneicidad aumentada, estabilidad *in vivo* pobre, así como farmacocinética no deseada.

Los diabodies de cadena única (scDb) representan una metodología alternativa para mejorar la formación de moléculas similares a diabody biespecífico (véase Holliger, P. y G. Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4): 128-30; Wu, A.M., et al. (1996) Immunotechnology 2(1): p. 21-36). Los diabodies de cadena única biespecíficos se producen por conexión de dos cadenas polipeptídicas formadoras de diabody con un conector intermedio adicional con una longitud de aproximadamente 15 residuos de aminoácidos. Consecuentemente, todas las moléculas con un peso molecular correspondiente a diabodies de cadena única monoméricos (entre 50 y 60 kDa) son biespecíficas. Muchos estudios han demostrado que los diabodies de cadena única biespecíficos se expresan en bacterias en forma soluble y activa con la mayor parte de las moléculas purificadas como monómeros (véase Holliger, P. y G. Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4): 128-30; Wu, A.M., et al. (1996) Immunotechnol. 2(1): 21-36; Pluckthun, A. y P. Pack (1997) Immunotechnol. 3(2): 83-105; Ridgway, J.B., et al. (1996) Protein Engin. 9(7): 617-21). Por lo tanto, los diabodies de cadena única combinan las ventajas de los scFvs en tándem (todos los monómeros son biespecíficos) y diabodies (expresión como solubles en bacterias).

Se han fusionado diabodies más recientes a Fc para generar más moléculas similares a Ig, llamadas di-diabodies (véase Lu, D., et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(4): 2856-65). Adicionalmente, se han descrito construcciones de anticuerpos multivalentes que comprenden dos repeticiones Fab en la

cadena pesada de una IgG y con capacidad de unir cuatro moléculas de antígeno (véase WO 0177342A1, y Miller, K., et al. (2003) J. Immunol. 170(9): 4854-61).

Existe una necesidad en el arte por proteínas de unión multiespecífica mejorada con capacidad de unir dos o más antígenos. La Patente de los EE.UU. No. 7.612.181 provee una nueva familia de proteínas de unión con capacidad de unir dos o más antígenos con alta afinidad, las cuales son llamadas inmunoglobulinas con dominio variable dual (DVD-Ig^{TM}). La presente invención provee otras nuevas proteínas de unión con capacidad de unir dos o más antígenos.

Síntesis de la invención

Esta invención está relacionada con proteínas de unión multivalentes con capacidad de unir dos o más antígenos. La presente invención provee una nueva familia de proteínas de unión con capacidad de unir dos o más antígenos con alta afinidad.

En una forma de realización, la invención provee una proteína de unión que comprende una cadena polipeptídica, en donde la cadena polipeptídica 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 polipéptido, X2 representa una región Fc y n es 0 ó 1. En una forma de realización, VD1 y VD2 en la proteína de unión son dominios variables de cadena pesada. En otra forma de realización, el dominio variable de cadena pesada se selecciona del grupo formado por un dominio variable de cadena pesada murino, un dominio variable de cadena pesada humano, un dominio variable de cadena pesada de CDR injertada, y un

dominio variable de cadena pesada humanizado. En aun otra forma de realización, VD1 y VD2 tienen la capacidad de unirse al mismo antígeno. En otra forma de realización VD1 y VD2 tienen la capacidad de unirse a diferentes antígenos. En aun otra forma de realización, C es un dominio constante de cadena pesada. Por ejemplo, X1 es un conector con la condición de que X1 no es CH1. Por ejemplo, X1 es un conector seleccionado del grupo formado por AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID N°: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID N°: 2); AKTTPKLGG (SEQ ID N°: 3); SAKTTPKLGG (SEQ ID N°: 4); SAKTTP (SEQ ID N°: 5); RADAAP (SEQ ID N°: 6); RADAAPTVS (SEQ ID N°: 7); RADAAAAGGPGS (SEQ ID N°: 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEQ ID N°: 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID N°: 10); ADAAP (SEQ ID N°: 11); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID N°: 12); TVAAP (SEQ ID N°: 13); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID N°: 14); QPKAAP (SEQ ID N°: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID N°: 16); AKTTPP (SEQ ID N°: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID N°: 18); AKTTAP (SEQ ID N°: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID N°: 20); ASTKGP (SEQ ID N°: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID N°: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID N°: 23); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID N°: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID N°: 25); y GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID N°: 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 27); y ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 28). En una forma de realización, X2 es una región Fc. En otra forma de realización, X2 es una región Fc variante.

En una forma de realización la proteína de unión descrita en la presente documentación comprende una cadena, en donde la cadena polipeptídica 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 conector con la condición de que no es CH1, y X2 es una región Fc.

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

N°: 25); y GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID N°: 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 27); y ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 28). En una forma de realización, la proteína de unión no comprende X2.

En una forma de realización, tanto la cadena pesada variable así como la liviana variable comprenden el mismo conector. En otra forma de realización, la cadena pesada variable y la liviana variable comprende diferentes conectores. En otra forma de realización, tanto la cadena pesada variable así como la liviana variable comprenden un conector corto (aproximadamente 6 aminoácidos). En otra forma de realización, tanto la cadena pesada variable así como la liviana variable comprenden un conector largo (mayor a 6 aminoácidos). En otra forma de realización, la cadena pesada variable comprende un conector corto y la cadena liviana variable comprende un conector largo. En otra forma de realización, la cadena pesada variable comprende un conector largo y la cadena liviana variable comprende un conector corto.

En una forma de realización la proteína de unión descrita en la presente documentación comprende una cadena polipeptídica, en donde dicha cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena liviana, VD2 es un segundo dominio variable de cadena liviana, C es un dominio constante de cadena liviana, X1 es un conector con la condición de que no es CH1, y X2 no comprende una región Fc.

En otra forma de realización la invención provee una proteína de unión que comprende dos cadenas polipeptídicas, en donde dicha primera cadena

polipeptídica 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 conector con la condición de que no es CH1, y X2 es una región Fc; y dicha segunda cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena liviana, VD2 es un segundo dominio variable de cadena liviana, C es un dominio constante de cadena liviana, X1 es un conector con la condición de que no es CH1, y X2 no comprende una región Fc. En una forma de realización particular, la proteína de unión con Dominio Variable Dual (DVD) comprende cuatro cadenas polipeptídicas en donde las dos primeras cadenas polipeptídicas comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, respectivamente en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, C es un dominio constante de cadena pesada, X1 es un conector con la condición de que no es CH1, y X2 es una región Fc; y las dos segundas cadenas polipeptídicas comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n respectivamente, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena liviana, VD2 es un segundo dominio variable de cadena liviana, C es un dominio constante de cadena liviana, X1 es un conector con la condición de que no es CH1, y X2 no comprende una región Fc. Dicha proteína con Dominio Variable Dual (DVD) tiene cuatro sitios de unión al antígeno.

En otra forma de realización las proteínas de unión descritas en la presente tienen la capacidad de unir uno o más blancos. En una forma de realización, el blanco se selecciona del grupo que consiste en citoquinas, proteínas de superficie celular, enzimas y receptores. En otra forma de

realización, la proteína de unión tiene la capacidad de modular una función biológica de uno o más blancos. En otra forma de realización, la proteína de unión tiene la capacidad de neutralizar uno o más blancos. La proteína de unión de la invención tiene la capacidad de unir citoquinas seleccionadas del grupo que consiste en linfoquinas, monoquinas, hormonas polipeptídicas, receptores, o marcadores tumorales. Por ejemplo, la DVD-Ig de la invención tiene la capacidad de unir dos o más de los siguientes: Factor de necrosis tumoral (TNF), Factor de crecimiento nervioso (NGF), Esclerostina (SOST), Prostaglandina E2 (PGE2), ácido lisofosfatídico (LPA) (véase también la Tabla 2). En una forma de realización específica la proteína de unión tiene la capacidad de unir pares de blancos seleccionados del grupo que consiste en TNF (seq. 2) y NGF; TNF (seq. 3) y NGF; TNF (seq. 4) y NGF; TNF (seq. 5) y NGF; TNF (seq. 6) y NGF; TNF (seq. 2) y SOST; TNF (seq. 3) y SOST; TNF (seq. 4) y SOST; TNF (seq. 5) y SOST; TNF (seq. 6) y SOST; TNF (seq. 2) y PGE2; TNF (seq. 3) y PGE2; TNF (seq. 4) y PGE2; TNF (seq. 5) y PGE2; TNF (seq. 6) y PGE2; TNF (seq. 1) y LPA; TNF (seq. 2) y LPA; TNF (seq. 3) y LPA; TNF (seq. 4) y LPA; TNF (seq. 5) y LPA; y TNF (seq. 6) y LPA.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 2) y NGF comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 54 y SEQ ID NO. 56; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 55 y SEQ ID NO. 57. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 2) y NGF comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 54 y una secuencia de aminoácidos de cadena

liviana de DVD de SEQ ID NO: 55. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 2) y NGF tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 56 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 57.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 3) y NGF comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 58 y SEQ ID NO. 60; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 59 y SEQ ID NO. 61. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 3) y NGF comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 58 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 59. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 3) y NGF tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 60 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 61.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 4) y NGF comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 62 y SEQ ID NO. 64; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 63 y SEQ ID NO. 65. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 4) y NGF comprende una secuencia de aminoácidos de cadena

pesada de DVD de SEQ ID NO. 62 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 63. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 4) y NGF tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 64 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 65.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 5) y NGF comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 66 y SEQ ID NO. 68; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 67 y SEQ ID NO. 69. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 5) y NGF comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 66 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 67. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 5) y NGF tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 68 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 69.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 6) y NGF comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 70 y SEQ ID NO. 72; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 71 y SEQ ID NO. 73. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir

TNF (seq. 6) y NGF comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 70 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 71. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 6) y NGF tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 72 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 73.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 2) y SOST comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 74 y SEQ ID NO. 76; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 75 y SEQ ID NO. 77. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 2) y SOST comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 74 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 75. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 2) y SOST tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 76 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 77.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 3) y SOST comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 78 y SEQ ID NO. 80; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 79 y SEQ ID NO. 81. En

una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 3) y SOST comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 78 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 79. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 3) y SOST tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 80 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 81.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 4) y SOST comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 82 y SEQ ID NO. 84; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 83 y SEQ ID NO. 85. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 4) y SOST comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 82 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 83. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 4) y SOST tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 84 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 85.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 5) y SOST comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 86 y SEQ ID NO. 88; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD

seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 87 y SEQ ID NO. 89. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 5) y SOST comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 86 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 87. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 5) y SOST tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 88 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 89.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 6) y SOST comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 90 y SEQ ID NO. 92; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 91 y SEQ ID NO. 93. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 6) y SOST comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 90 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 91. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 6) y SOST tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 92 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 93.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 2) y PGE2 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 94 y

SEQ ID NO. 96; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 95 y SEQ ID NO. 97. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 2) y PGE2 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 94 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 95. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 2) y PGE2 tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 96 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 97.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 3) y PGE2 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 98 y SEQ ID NO. 100; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 99 y SEQ ID NO. 101. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 3) y PGE2 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 98 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 99. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 3) y PGE2 tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 100 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 101.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 4) y PGE2 comprende una secuencia de aminoácidos de

cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 102 y SEQ ID NO. 104; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 103 y SEQ ID NO. 105. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 4) y PGE2 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 102 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 103. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 4) y PGE2 tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 104 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 105.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 5) y PGE2 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 106 y SEQ ID NO. 108; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 107 y SEQ ID NO. 109. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 5) y PGE2 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 106 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 107. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 5) y PGE2 tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 108 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 109.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 6) y PGE2 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 110 y SEQ ID NO. 112; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 111 y SEQ ID NO. 112. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 6) y PGE2 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 110 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 111. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 6) y PGE2 tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 112 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 113.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 1) y LPA comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 114 y SEQ ID NO. 116; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 115 y SEQ ID NO. 117. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 1) y LPA comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 114 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 115. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 1) y LPA tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena

pesada de DVD de SEQ ID NO. 116 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 117.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 2) y LPA comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 118 y SEQ ID NO. 120; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 119 y SEQ ID NO. 121. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 2) y LPA comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 118 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 119. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 2) y LPA tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 120 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 121.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 3) y LPA comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 122 y SEQ ID NO. 124; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 123 y SEQ ID NO. 125. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 3) y LPA comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 122 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 123. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 3) y LPA tiene una

orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 124 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 125.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 4) y LPA comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 126 y SEQ ID NO. 128; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 127 y SEQ ID NO. 129. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 4) y LPA comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 126 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 127. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 4) y LPA tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 128 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 129.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 5) y LPA comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 130 y SEQ ID NO. 132; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 131 y SEQ ID NO. 133. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 5) y LPA comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 130 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 131. En otra forma de realización, la

proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 5) y LPA tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 132 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 133.

En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 6) y LPA comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 134 y SEQ ID NO. 136; y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana DVD seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 135 y SEQ ID NO. 137. En una forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 6) y LPA comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 134 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 135. En otra forma de realización, la proteína de unión que tiene la capacidad de unir TNF (seq. 6) y LPA tiene una orientación invertida y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD de SEQ ID NO. 136 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de DVD de SEQ ID NO: 137.

En otra forma de realización la invención provee una proteína de unión que comprende una cadena polipeptídica, en donde dicha cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido a partir de un anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido a partir de un segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un conector con la condición de que no es CH1, en donde

dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente. En una forma de realización, la región Fc está ausente en la proteína de unión.

En otra forma de realización, la invención provee una proteína de unión que comprende una cadena polipeptídica, en donde dicha cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena liviana obtenido a partir de un primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena liviana obtenido a partir de un segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, which can be the same or different from the first parent antibody; C es un dominio constante de cadena liviana; (X1)n es un conector con la condición de que no es CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente. En una forma de realización, (X2)n está ausente de la proteína de unión.

En otra forma de realización la proteína de unión de la invención comprende una primera y segunda cadena polipeptídica, en donde dicha primera cadena polipeptídica comprende un primer VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido a partir de un primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido a partir de un segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, que puede ser igual o distinto que el primer anticuerpo parental; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un conector con la condición de que no es CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región

Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; y en donde dicha segunda cadena polipeptídica comprende un segundo VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena liviana obtenido a partir de un primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena liviana obtenido a partir de un segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, que puede ser igual o distinto que el primer anticuerpo parental; C es un dominio constante de cadena liviana; (X1)n es un conector con la condición de que no es CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente. En otra forma de realización, la proteína de unión comprende dos primeras cadenas polipeptídicas y dos segundas cadenas polipeptídicas. En aun otra forma de realización, (X2)n está ausente del segundo polipéptido. En aun otra forma de realización, la región Fc, si está presente en el primer polipéptido se selecciona del grupo formado por la secuencia nativa de la región Fc y una secuencia variante de la región Fc. En aun otra forma de realización, la región Fc se selecciona del grupo formado por una región Fc de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, y una IgD.

En otra forma de realización la proteína de unión de la invención es una DVD-Ig con capacidad de unir dos antígenos que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, en donde, la primera y tercera cadena polipeptídica comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde,VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido a partir de un primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido a partir de un segundo anticuerpo parental o porción de unión

al antígeno del mismo, que puede ser igual o distinto que el primer anticuerpo parental; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un conector con la condición de que no es CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; y en donde la segunda y cuarta cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena liviana obtenido a partir de un primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena liviana obtenido a partir de un segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, que puede ser igual o distinto que el primer anticuerpo parental; C es un dominio constante de cadena liviana; (X1)n es un conector con la condición de que no es CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente.

La invención provee un método para elaborar una proteína de unión DVD-Ig por preselección de los anticuerpos parentales. En una forma de realización, el método para hacer una Inmunoglobulina con Dominio Variable Dual con capacidad de unir dos antígenos comprende los pasos de a) obtener un primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, con capacidad de unir un primer antígeno; b) obtener un segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, con capacidad de unir un segundo antígeno; c) construir una primera y tercera cadena polipeptídica, cada una de las cuales comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido a partir de dicho primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo; VD2 es un

segundo dominio variable de cadena pesada obtenido a partir de dicho segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, que puede ser igual o distinto que el primer anticuerpo parental; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un conector con la condición de que no es CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; d) construir una segunda y cuarta cadena polipeptídica, cada una de las cuales comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena liviana obtenido a partir de dicho primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena liviana obtenido a partir de dicho segundo anticuerpo parental o porción de unión a antígeno del mismo, que puede ser igual o distinto que el primer anticuerpo parental; C es un dominio constante de cadena liviana; (X1)n es un conector con la condición de que no es CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; e) expresar dicha primera, segunda, tercera y cuarta cadenas polipeptídicas; de modo que se genera una molécula de DVD-Ig con capacidad de unir dicho primer y segundo antígeno.

En aun otra forma de realización, la invención provee un método para generar una molécula de DVD-Ig con capacidad de unir dos antígenos con propiedades deseadas que comprende los pasos de a) obtener un primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, con capacidad de unir un primer antígeno y poseer al menos una propiedad deseada exhibida por la molécula de DVD-Ig; b) obtener un segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, con capacidad de unir un segundo

antígeno y poseer al menos una propiedad deseada exhibida por la molécula de DVD-Ig; c) construir una primera y tercera cadena polipeptídica que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido a partir de dicho primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido a partir de dicho segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, que puede ser igual o distinto que el primer anticuerpo parental; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un conector con la condición de que no es CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; d) construir una segunda y cuarta cadena polipeptídica que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena liviana obtenido a partir de dicho primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena liviana obtenido a partir de dicho segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, que puede ser igual o distinto que el primer anticuerpo parental; C es un dominio constante de cadena liviana; (X1)n es un conector con la condición de que no es CH1, en donde dicho (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde dicho (X2)n está presente o ausente; e) expresar dicha primera, segunda, tercera y cuarta cadena polipeptídica; de modo tal que se genera una Inmunoglobulina con Dominio Variable Dual con capacidad de unir dicho primer y dicho segundo antígeno con propiedades deseadas.

En una forma de realización, el VD1 de la primera y segunda cadena polipeptídica descrito en la presente documentación se obtienen del mismo

anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo. En otra forma de realización, el VD1 de la primera y segunda cadena polipeptídica descritos en la presente documentación se obtienen de diferentes anticuerpos parentales o porciones de unión al antígeno de los mismos. En otra forma de realización, el VD2 de la primera y segunda cadena polipeptídica descritos en la presente documentación se obtienen a partir del mismo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo. En otra forma de realización, el VD2 de la primera y segunda cadena polipeptídica descrito en la presente documentación se obtiene de diferentes anticuerpos parentales o porciones de unión al antígeno del mismo.

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

En una forma de realización el primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, se une al primer antígeno y el segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, se une al segundo antígeno. En una forma de realización particular, el primero y segundo antígeno son el mismo antígeno. En otra forma de realización, los anticuerpos parentales unen diferentes epitopes en el mismo antígeno. En otra forma de realización el primer y segundo antígeno son antígenos diferentes. En otra forma de realización, el primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, se une al primer antígeno con una potencia diferente de la potencia con

la cual el segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, se une al segundo antígeno. En aun otra forma de realización, el primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, se une al primer antígeno con una afinidad diferente de la afinidad con la cual el segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, se une al segundo antígeno.

En otra forma de realización el primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, se seleccionan del grupo formado por, anticuerpo humano, anticuerpo con CDR injertada, y anticuerpo humanizado. En una forma de realización, las porciones de unión al antígeno se seleccionan del grupo formado por un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, un fragmento dAb, una región aislada determinante de complementariedad (CDR), un anticuerpo de única cadena, y diabodies.

En otra forma de realización la proteína de unión de la invención posee al menos una propiedad deseada exhibida por el primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, o el segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo. Como alternativa, el primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo y el segundo anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo posee al menos una propiedad deseada exhibida por la Inmunoglobulina con Dominio Variable Dual. En una forma de realización, la propiedad deseada se selecciona de uno más

parámetros de anticuerpos. En otra forma de realización, los parámetros de anticuerpo se seleccionan del grupo formado por la especificidad por el antígeno, afinidad por el antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epitope, estabilidad, solubilidad, eficacia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y unión a antígenortólogo. En una forma de realización la proteína de unión es multivalente. En otra forma de realización, la proteína de unión es multiespecífica. Las proteínas de unión multivalentes y o multiespecíficas descritas en la presente documentación tienen propiedades deseadas particularmente para una perspectiva terapéutica. Por ejemplo, la proteína de unión multivalente y o multiespecífica puede (1) ser internalizada (y/o catabolizada) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al cual los anticuerpos se unen; (2) ser un anticuerpo agonista; y/o (3) inducir la muerte celular y/o apoptosis de una célula que expresa un antígeno al cual el anticuerpo multivalente tiene capacidad de unirse. El "anticuerpo parental" que provee al menos una especificidad de unión al antígeno de las proteínas de unión multivalentes y o multiespecíficas puede ser uno que sea internalizado (y/o catabolizado) por una célula que expresa un antígeno al cual se une el anticuerpo; y/o puede ser un agonista, anticuerpo inductor de muerte celular, y/o inductor de apoptosis, y la proteína de unión multivalente y o multiespecífica tal como se describe en la presente documentación puede mostrar mejora(s) en una o más de estas propiedades. Más aun, el anticuerpo parental puede carecer de una o más de estas propiedades, pero puede proveerlas cuando se construye como una proteína de unión multivalente tal como se describe en la presente documentación.

En otra forma de realización la proteína de unión de la invención tienen una constante de velocidad de asociación (Kon) a uno más blancos seleccionados del grupo formado por: al menos aproximadamente $10^2M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5M^{-1}s^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6M^{-1}s^{-1}$, según se midió por resonancia de plasmón superficial. En una forma de realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante velocidad de asociación (Kon) a uno más blancos entre $10^2M^{-1}s^{-1}$ y $10^3M^{-1}s^{-1}$; entre $10^3M^{-1}s^{-1}$ y $10^4M^{-1}s^{-1}$; entre $10^4M^{-1}s^{-1}$ y $10^5M^{-1}s^{-1}$; o entre $10^5M^{-1}s^{-1}$ y $10^6M^{-1}s^{-1}$, según se midió por resonancia de plasmón superficial.

En otra forma de realización la proteína de unión tiene una constante de velocidad de disociación (Koff) de uno más blancos seleccionados del grupo formado por: al menos aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, según se midió por resonancia de plasmón superficial. En una forma de realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad de disociación (Koff) a uno más blancos de entre aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$ y aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; de entre aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$ y aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; de entre aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$ y aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, según se midió por resonancia de plasmón superficial.

En otra forma de realización la proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) de uno más blancos seleccionados del grupo formado por: al menos aproximadamente 10^{-7} M; al menos aproximadamente 10^{-8} M; al menos aproximadamente 10^{-9} M; al menos aproximadamente 10^{-10} M; al menos

aproximadamente 10^{-11} M; al menos aproximadamente 10^{-12} M; y como máximo aproximadamente 10^{-13} M. En una forma de realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de disociación (K_D) a sus blancos de entre aproximadamente 10^{-7} M y aproximadamente 10^{-8} M; de entre aproximadamente 10^{-8} M y aproximadamente 10^{-9} M; de entre aproximadamente 10^{-9} M y aproximadamente 10^{-10} M; de entre aproximadamente 10^{-10} y aproximadamente 10^{-11} M; de entre aproximadamente 10^{-11} M y aproximadamente 10^{-12} M; de entre aproximadamente 10^{-12} y aproximadamente M 10^{-13} M.

En otra forma de realización, la proteína de unión que se describe en la presente es un conjugado que comprende además un agente seleccionado del grupo que consiste en una molécula de inmunoadhesión, un agente de diagnóstico por imágenes, un agente terapéutico y un agente citotóxico. En una forma de realización, el agente para determinar imágenes se selecciona del grupo formado por una marca radioactiva, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética y biotina. En otra forma de realización, el agente para el diagnóstico por imágenes es una radiomarca seleccionada del grupo que consiste en ^{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 forma de realización, preferida el agente terapéutico citotóxico se selecciona del grupo formado por: un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, una toxina y un agente apoptótico.

En otra forma de realización, la proteína de unión descrita en la presente se une a una proteína celular y un agente seleccionado del grupo que consiste

en una molécula de inmunoadhesión, una agente para imágenes, un agente terapéutico, y un agente citotóxico. En una forma de realización, el agente para imágenes se selecciona del grupo que consiste en una radiomarca, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética, y biotina. En otra forma de realización, el agente para imágenes es una radiomarca seleccionada del grupo que consiste en ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, y ^{sure}Sm. En aún otra forma de realización, el agente terapéutico o citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, toxina, y un agente apoptótico.

En otra forma de realización, la proteína de unión que se describe en la presente es una proteína de unión cristalizada y existe como un cristal. En una forma de realización, el cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada sin vehículo. En aún otra forma de realización, las proteínas de unión cristalizadas tienen una vida media *in vivo* más larga que la contraparte soluble de dicha proteína de unión. En aún otra forma de realización, la proteína de unión cristalizada retiene su actividad biológica.

En otra forma de realización, la proteína de unión que se describe en la presente está glicosilada. Por ejemplo, la glicosilación sigue un patrón de glicosilación humano.

Un aspecto de la invención se relaciona con un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de las proteínas de unión que se describen en la presente documentación. Una forma de realización adicional provee un vector que comprende al ácido nucleico aislado descripto en la presente, donde dicho

vector se selecciona del grupo formado por ADNpc; pTT (Durocher et al., *Nucleic Acids Research* 2002, Vol 30, Nº 2); pTT3 (pTT con múltiples sitios de clonación adicionales; pEFBOS (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) *Nucleic Acids Research* Vol 18, Nº 17); pBV; pJV; pcDNA3.1 TOPO, pEF6 TOPO y pBJ. En una forma de realización, el vector es un vector que se describe en la Solicitud de Patente de los EEUU con Nº de Acta 61/021282.

En otro aspecto, se transforma una célula huésped con el vector descripto en la presente. En una forma de realización, la célula huésped es una célula procariótica. En otra forma de realización, la célula huésped es *E. coli.* En una forma de realización asociada, la célula huésped es una célula eucariótica. En otra forma de realización, la célula eucariota se selecciona del grupo formado por una célula protista, una célula animal, una célula vegetal y una célula fúngica. En aún otra forma de realización, la célula huésped es una célula de mamífero incluyendo, sin limitaciones, CHO, COS; NS0, SP2, PER.C6; o una célula fúngica tal como *Saccharomyces cerevisiae*; o una célula de insecto tal como Sf9.

En una forma de realización, dos o más DVD-Ig, por ejemplo, con distintas especificidades, se producen en una sola célula huésped recombinante. Por ejemplo, la expresión de una mezcla de anticuerpos ha sido denominada Oligoclonics™ (Merus B.V., Países Bajos), Patentes de los EEUU Nº 7262028 y 7429486.

En otro aspecto de la invención, se provee un método para producir una proteína de unión que se describe en la presente documentación, que comprende cultivar cualquiera de las células huésped que también se describen en la presente en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas

para producir la proteína de unión. En una forma de realización, 50%-75% de la proteína de unión producida con este método es una proteína de unión tetravalente con especificidad dual, 75%-90% de la proteína de unión producida con este método es una proteína de unión tetravalente con especificidad dual. En una forma de realización particular, 90%-95% de la proteína de unión producida con este método es una proteína de unión tetravalente con especificidad dual.

En una forma de realización, se provee una composición para administrar una proteína de unión, donde la composición comprende una formulación que a su vez comprende una proteína de unión cristalizada, tal como se describe en la presente, y un ingrediente; y al menos un vehículo polimérico. Por ejemplo, el vehículo polimérico comprende uno o más polímeros seleccionado entre el grupo formado por. ácido poli(acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres), ácido poli(láctico), ácido poli(láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil) metacrylamida, poli[(organo)fosfaceno], poli(ortoésteres), alcohol poli(vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhidrido maleico-alquilvinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glucaminoglucanos, polisacáridos, mezclas y copolímeros de éstos. Por ejemplo, el ingrediente se selecciona del grupo formado por albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil-β-ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol. Otra forma de realización provee un método de tratamiento de un mamífero que comprende el paso de administrarle

al mamífero una cantidad eficaz de la composición descripta en la presente.

En la invención también se provee una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión tal como se describe en la presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, la composición farmacéutica comprende al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno. Por ejemplo, el agente adicional se selecciona del grupo formado por: un agente terapéutico, un agente para determinar imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis (incluyendo, sin limitaciones, un anticuerpo anti-VEGF o VEGF-trap); un inhibidor de quinasa (incluyendo, sin limitaciones, un inhibidor de KDR y TIE-2); un bloqueante de moléculas de co-estimulación (incluyendo, sin limitaciones, anti-B7.1, anti-B7.2, CTLA4-Ig, anti-CD20); un bloqueante de moléculas de adhesión (incluyendo, sin limitaciones, un anticuerpo anti-LFA-1, un anticuerpo anti-E/I selectina, un inhibidor de moléculas pequeñas); anticuerpo anti-citoquina o un fragmento funcional de éste (incluyendo, sin limitaciones, anticuerpos anti-IL-18, anti-TNF, anti-IL-6/receptor de citoquina); metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK506; marca o informante detectable; un antagonista de TNF; un antirreumático; un relajante muscular, un narcótico, una droga antiinflamatoria no esteroidal (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteriode, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona del crecimiento, una droga de reemplazo hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o un análogo, una citoquina y un

antagonista de citoquina.

En otro aspecto, en la invención se provee un método para tratar un sujeto humano que sufre un trastorno donde el blanco los blancos capaces de unirse a la proteína de unión que se describe en la presente son perjudiciales, que comprende administrarle al sujeto humano una proteína de unión que se describe en la presente documentación, de manera de inhibir la actividad del blanco los blancos en el sujeto humano, y aliviar uno más de los síntomas o efectuar el tratamiento. Por ejemplo, el trastorno se selecciona del grupo que comprende artritis, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de intestino inflamatoria, diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis, escleroderma, enfermedad de injerto versus huésped, rechazo de transplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con el transplante de órganos, sarcoidosis, ateroesclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis crónica activa, uveítis, shock séptico, síndrome de shock tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, accidente cerebrovascular, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, formas malignas, insuficiencia cardiaca, infarto de miocardio, enfermedad de Addison, esporádica, deficiencia poliglandular tipo I y

deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria de adultos (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriática, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropática, artropatía asociada con clamidia, yersinia y salmonella, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arterioesclerosis, alergia atópica, enfermedad bullosa autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliácea, penfigoide, enfermedad por IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica Coombs positiva, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad *Royal Free*, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, síndrome de la enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, hepatitis B, hepatitis C, inmunodeficiencia común variada (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, esterilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, pneumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedades del tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada con enfermedades del tejido conectivo mixtas, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémicas, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada con 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 inducida por drogas, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterans, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar linfocítica infiltrante, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo-1 (hepatitis autoinmune o lupoide clásica), hepatitis autoinmune tipo-2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM), hipoglucemia autoinmune, resistencia a insulina tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con el transplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada con el transplante de órganos, osteoartrosis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, esterilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad al esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria a una enfermedad del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjorgren, enfermedad de Takayasu/arteritis, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroide autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primaria, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitiligo, enfermedad hepática aguda, enfermedad hepática crónica, cirrosis alcohólica, daño hepático inducido por alcohol, colestasis, enfermedad hepática idiosincrática, hepatitis inducida por drogas, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por

estreptococos grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas por tipo Th2 y tipo Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), y distintos tipos de cáncer tales como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal y formas malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma), abetalipoproteinemia, acrocianosis, aguda y procesos parasitarios o infecciosos crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos aéreos, complejo de demencia del SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis por contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo a aloinjertos, déficit de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina pectoris, degeneración de células del asta anterior, terapia anti cd3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arterioesclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), taquicardia auricular, bloqueo aurículoventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto óseo, rechazo de transplante de médula ósea (BMT), bloqueo de ramas de haz de His, linfoma de Burkitt, acidez estomacal, arritmias cardiacas, síndrome de *atontamiento* cardiaco, tumores cardiacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación a una derivación [*bypass*] cardiopulmonar, rechazo al transplante de cartílago, degeneraciones de la corteza del cerebelo, trastornos del cerebelo, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados con una quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL),

enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), intoxicación crónica por salicilato, carcinoma colorrectal, insuficiencia cardiaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis por contacto, cor pulmonale, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis con cultivo negativo, fibrosis quística, trastornos asociados con una terapia con citoquinas, demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre hemorrágica del dengue, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad ateriosclerótica diabética, enfermedad de cuerpos difusos de Lewy, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos del ganglio basal, síndrome de Down en la edad madura, trastornos del movimiento inducidos por drogas que bloquean los receptores de dopamina del CNS, sensibilidad a drogas, eczema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por el virus Epstein-Barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y del cerebelo, linfohistiocitosis hematofagocítica familiar, rechazo al implante de timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos funcionales de las arterias periféricas, sepsis fúngicas, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo a injertos de cualquier órgano tejido, sepsis Gram-negativa, sepsis Gram-positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hallerrorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre del heno, rechazo al transplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias del haz de His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimientos hiperquinéticos, reacciones de hipersensibilidad, pneumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos de movimientos hipoquinéticos, evaluación del eje

hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, toxicidad mediada por anticuerpos, astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza a, exposición a radiación ionizante, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesiones por reperfusión isquémica, accidente cerebrovascular isquémico, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo al transplante de riñón, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo al transplante de hígado, linfedema, malaria, linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococcemia, metabólica/idiopática, migraña cefalea, trastorno mitocondrial multisistémico, enfermedad del tejido conectivo mixto, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, síndrome mielodiplástico, infarto de miocardio, trastornos isquémicos del miocardio, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar neonatal crónica, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofias musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma no Hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y ramas de ésta, trastornos arteriales oclusivos, terapia okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo al transplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna, rechazo al transplante de paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad del pericardio, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía neumocistitis carinii,

neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal y síndrome de cambios de piel), síndrome de post-perfusión, síndrome postbomba, síndrome de cardiotomía post-MI, preeclampsia, parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación, fenómeno y enfermedad de Raynaud, enfermedad de Raynaud, enfermedad de Refsums, taquicardia por QRS estrecho regular, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, demencia senil de tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, shock, anemia de células falsiformes, rechazo de aloinjertos de piel, síndrome de cambios de piel, rechazo al transplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelosas, miositis estreptococcica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxia sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumatoide juvenil de comienzo sistémico, células T o FAB ALL, telangiectasia, tromboangitis obliterans, trombocitopenia, toxicidad, transplantes, traumatismo/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades de las válvulas cardiacas, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis vital/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico asociado a virus, síndrome Wernicke-Korsakoff, síndrome Wilson, rechazo a xenoinjertos de cualquier órgano tejido, síndromes coronarios agudos, polineuritis idiopática aguda, polirradiculopatía inflamatoria desmielinizante

aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still del adulto, *Alopecia areata*, anafilaxis, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, anemia aplásica, arteriosclerosis, eczema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con una infeccion por estreptococo, enteropatía autoinmune, síndrome de pérdida de la audición autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, falla ovárica prematura autoinmune, blefaritis, bronquiectasias, penfigoide bulloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolípido catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, penfigoide cicatrizal, síndrome clínicamente aislado (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno psiquiátrico en la niñez, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, diabetes mellitus, hernia de disco, prolapso de disco, anemia hemolítica inmune inducida por drogas, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, episcleritis, eritema multiforme, eritema multiforme mayor, penfigoide gestacional, síndrome de Guillain-Barre (GBS), fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad de Perkinson idiopática, pneumonía intersticial idiopática, alergia mediada por IgE, anemia hemolítica inmune, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad inflamatoria infecciosa ocular, enfermedad inflamatoria desmielinizante, enfermedad inflamatoria del corazón, enfermedad inflamatoria del riñón, IPF/UIP, iritis, queratitis, queratoconjuntivitis seca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, histiocitosis de las células de Langerhans, *Livido reticularis*, poliangitis microscópica con degeneración macular, morbus Bechterev; trastorno neuronal motor, penfigoide de la membrana mucosa, insuficiencia multiorgánica, miastenia gravis, síndrome

mielodisplásico, miocarditis, trastornos de las raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis no-A no-B, neuritis óptica, osteolisis, cáncer de ovario, JRA pauciarticular, enfermedad oclusiva arterial periferica (PAOD), enfermedad vascular periferica (PVD), enfermedad arterial periferica (PAD), flebitis, poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), policondritis, polimialgia reumática, poliosis, JRA Poliarticular, síndrome de deficiencia poliendócrina, polimiositis, polimialgia reumática (PMR), síndrome de post-bomba, parkinsonismo primario,cáncer de próstata y rectal y formas malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma), prostatitis, aplasia de glóbulos rojos pura, insuficiencia adrenal primaria, neuromielitis óptica recurrente, restenosis, enfermedad del corazón reumático, SAPHO (sinovitis, acne, pustulosis, hiperostosis y osteitis), esclerodermia, amiloidosis secundaria, pulmón de shock, escleritis, ciática, insuficiencia adrenal secundaria, enfermedad del tejido conectivo asociada a siliconas, dermatosis de Sneddon-Wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrólisis epidérmica tóxica, mielitis transversa, TRAPS (síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), reacción alérgica de Tipo 1, diabetes de Tipo II, urticaria, pneumonía intersticial usual (UIP), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH), degeneración macular húmeda y cicatrización de heridas, yersinia y artropatía asociada con salmonella.

En una realización, los trastornos que pueden tratarse o diagnosticarse con las composiciones y métodos de la invención incluyen, sin limitaciones, tumores sólidos 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 cervix, útero y ovarios, así como coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestacional), tracto genital masculino (incluyendo próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de las células germinales), glándulas endocrinas (incluyendo las glándulas tiroides, adrenales y pituitarias), y la piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluyendo aquellos que surgen de tejidos óseos y blandos, así como el sarcoma de Kaposi) y tumores que afectan el cerebro, los nervios, los ojos y las meninges (incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, Schwannomas y meningiomas), tumores sólidos que surgen de tumores malignos hematopoyéticos, tales como leucemias y linfomas (tanto linfomas de Hodgkin y linfomas distintos de los de Hodgkin).

Las DVD-Igs de la invención también pueden tratar una o más de las siguientes enfermedades: síndromes coronarios agudos, polineuritis idiopática agua, poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still de adultos, alopecia areata, anafilaxis, síndrome anticuerpo anti-fosfolipídico, anemia aplástica, arteriosclerosis, eczema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con infección por estreptococo, pérdida auditiva autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, trombocitopenia autoinmune (AITP), blefaritis, bronquiectasis, penfigoide ampolloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolipídico catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, penfigoide cicatricial, síndrome

aislado clínico (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno psiquiátrico al inicio de la infancia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, Diabetes mellitus, hernia de disco, prolapsos de disco, anemia hemolítica inmune inducida por drogas, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, Episcleritis, Eritema multiforme, eritema multiforme mayor, pengifoide gestacional, síndrome de Guillain-Barré (GBS), Fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad idiopática de Parkinson, pneumonia idiopática intersticial, alergia mediada por IgE, anemia hemolítica inmune, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad inflamatoria ocular infecciosa, enfermedad desmielinizante inflamatoria, enfermedad inflamatoria del corazón, enfermedad inflamatoria del riñón, IPF/UIP, Iritis, queratitis, queratoconjuntivitis seca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, histiocitosis de células de Langerhan, reticularis Livedo, degeneración macular, cánceres, poliangitis microscópica, Morbus Bechterev, trastornos neuromotores, pengifoide de membrana mucosa, falla multiorgánica, Miastenia Gravis, síndrome mielodisplásico, miocarditis, trastornos de las raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis no A no B, neuritis óptica, osteolisis, cáncer de ovario, ARJ pauciarticular, enfermedad oclusiva de arteria periférica (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad arterial periférica (PAD), flebitis, Poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), Policondritis, Polimialgia reumática, Poliosis, ARJ poliarticular, síndrome de deficiencia poliendócrina, Polimiositis, polimialgia reumática (PMR), síndrome postbomba, parkinsonismo primario, cáncer de próstata y rectal y cánceres hematopoyéticos (leucemia y linfoma), prostatitis, aplasia pura de glóbulos rojos, insuficiencia adrenal primaria,

neuromielitis óptica recurrente, restenosis, enfermedad cardíaca reumática, SAPHO (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostosis, y osteitis), escleroderma, amiloidosis secundaria, pulmón de shock, escleritis, ciática, insuficiencia adrenal secundaria, enfermedad de tejido conectivo asociado a siliconas, dermatosis de Sneddon-Wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrolisis epidérmica tóxica, mielitis transversa, TRAPS (receptor del factor de necrosis tumoral, reacción alérgica Tipo 1, diabetes tipo II, urticaria, pneumonia intersticial común (UIP), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH), degeneración macural húmeda, y sanado de heridas.

En una forma de realización, los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión al antígeno de éstos, se usan para tratar los cánceres o prevenir o inhibir metástasis de los tumores que se describen en la presente documentación, ya sea solos o en combinación con radioterapia y/u otros agentes quimioterapéuticos.

En otro aspecto, en la invención se provee un método de tratamiento de un paciente que sufre de un trastorno que comprende el paso de administrar cualquiera de las proteínas de unión descriptas en la presente, de forma concurrente o después de la administración de un segundo agente, según se describió en la presente. En una forma de realización particular, el segundo agente adicional se selecciona del grupo formado por budenosida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de

tromboxano, antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos monoclonales anti-IL-10, anticuerpos monoclonales anti-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, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAID, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de MAP quinasa, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β, inhibidores de la enzima convertidora de TNFα, inhibidores de la señalización de células T, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquinas, receptor soluble de p55 TNF, receptor soluble de p75 TNF, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citoquinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-11 y TGFβ.

En una forma de realización particular, las composiciones farmacéuticas descriptas en la presente son administradas al paciente mediante al menos un modo seleccionado entre parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intraventricular, intracerebeloso, intracerebroventricular, intracolónico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdíaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal,

sublingual, intranasal y transdérmico.

En un aspecto de la invención, se provee al menos un anticuerpo anti-idiotípico contra al menos una proteína de unión de la presente invención. El anticuerpo anti-idiotípico incluye cualquier molécula que contiene una proteína o un péptido que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina tal como, sin limitaciones, al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o liviana o a porción de unión al ligando de ésta, una región variable de la cadena pesada o de la cadena liviana, una región constante de la cadena pesada o liviana, una región de marco de trabajo cualquier porción de ésta, que se pueda incorporar en una proteína de unión de la presente invención.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La Figura 1A es una representación esquemática de construcciones de (DVD)-Ig con dominio variable dual donde se ilustra la estrategia para la generación de una DVD-Ig a partir de dos anticuerpos parentales.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Esta invención se relaciona con proteínas de unión multivalentes y/o multiespecíficas capaces de unirse a dos o más antígenos. Específicamente, la invención se relaciona con inmunoglobulinas con dominio variable dual (DVD-Ig) y composiciones farmacéuticas que las comprenden, así como con ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células huésped para preparar estas DVD-Ig. La invención también abarca métodos para usar las

DVD-Ig de la invención para detectar antígenos específicos, tanto in vitro como in vivo.

A menos que se los defina de otro modo en la presente documentación, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tienen los significados que comúnmente les dan aquellos versados en la técnica. El significado y el alcance de los términos debería estar claro; sin embargo, en el caso en que haya una ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente tienen prioridad sobre cualquier definición de diccionario extrínseca. Además, a menos que lo requiera de otro modo el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades, y los términos plurales incluirán las formas singulares. En esta solicitud, el uso de "o" denota "y/o", a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluyendo", así comotras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitativo. También, los términos tales como "elemento" o "componente" abarcan los elementos y los componentes que constituyen una unidad, y los elementos y los componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

En general, las nomenclaturas usadas en conexión el cultivo de células y tejidos, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química y la hibridización de proteínas y ácidos nucleicos descriptas en la presente documentación, y los procedimientos correspondientes, son aquellos bien conocidos y de uso común en la técnica. Los métodos y los procedimientos de la presente invención generalmente se llevan a cabo de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se

describen en esta memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y los procedimientos de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como comúnmente se los lleva a cano en la técnica o como se describe en la presente documentación. Las nomenclaturas usadas en conexión con los procedimientos de laboratorio y los procesos de química analítica, la química de síntesis orgánica y la química farmacéutica descriptas en la presente documentación, y los procedimientos correspondientes, son aquellos bien conocidos y de uso común en la técnica. Se usan técnicas convencionales para la síntesis química, los análisis químicos, las preparaciones farmacéuticas, la formulación, la administración y el tratamiento de los pacientes.

Para que la presente invención se comprenda con mayor facilidad, a continuación se definen determinados términos selectos.

El término "polipéptido", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan indistintamente con el término polipéptido, y también hacen referencia a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos de polipéptidos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico polimérico. El uso de un "polipéptido" en la presente abarca polipéptidos y fragmentos y variantes (incluyendo fragmentos de variantes) de éstos, a menos que en el contexto se indique lo contrario. Para un polipéptido antigénico, un fragmento de polipéptidopcionalmente contiene al menos un epitope contiguo no lineal. Los límites precisos del al menos un fragmento de

epitope pueden confirmarse usando el conocimiento técnico usual. El fragmento comprende al menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos, tal como al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos, o al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos. Una variante del polipéptido es como se describe en la presente documentación.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" hace referencia a una proteína o un polipéptido que, en virtud de su origen o la fuente de la que deriva, no está asociado con los componentes con los que se asocia y que lo acompañan en su estado nativo; se halla sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; es expresado por una célula de una especie diferente; o no aparece en la naturaleza. Por consiguiente, un polipéptido que es sintetizado por medios químicos o es sintetizado en un sistema celular diferente de la célula en la que se origina naturalmente estará "aislado" de los componentes con los que se halla asociado en la naturaleza. Una proteína también puede liberarse sustancialmente de los componentes con los que se halla asociada en la naturaleza si se la aísla usando procedimientos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

El término "recuperar", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia al proceso de liberar sustancialmente una especie química, tal como un polipéptido, de los componentes con los que se halla asociada en la naturaleza, aislándola, por ejemplo, por medio de procedimientos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

La "actividad biológica", como se la usa en la presente documentación, hace referencia a cualquier propiedad biológica inherente de una molécula (ya

sea que esté presente en la naturaleza, como puede hallársela in vivo, o que se la provea o se la produzca por medios recombinantes). Las propiedades biológicas incluyen, sin limitaciones, la unión a un receptor; la inducción de la proliferación celular, la inhibición del crecimiento celular, la inducción de otras citoquinas, la inducción de la apoptosis y la actividad enzimática. La actividad biológica también incluye la actividad de una molécula de Ig.

Los términos "unión específica" o "se une específicamente", tal como se los usa en la presente documentación, con referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico epitope) sobre la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epitope "A", la presencia de una molécula que contiene el epitope A (o A libre, sin marcar) en una reacción que contenga "A" marcado y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término "anticuerpo", tal como se lo usa en la presente documentación, se refiere en términos generales a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante o derivación de éstas, que retienen las características esenciales de unión al epitope de una molécula Ig. Estos formatos de anticuerpos mutantes, variantes o derivados son conocidos en la técnica. A continuación se describirán formas de realización no limitativas de dichos formatos.

En un anticuerpo completo, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada HCVR o VH en la presente documentación) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de dicha cadena liviana (abreviada LCVR o VL en la presente documentación) y una región constante de dicha cadena liviana. La región constante de la cadena liviana consiste en un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden dividirse adicionalmente en regiones hipervariables, conocidas como regiones de determinación de la complementariedad (CDR), y separadas por regiones conservadas conocidas como regiones de marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas, desde el extremo amino-termina hacia el extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

El término "región Fc" se usa para definir la región C-terminal de la cadena pesada de una inmunoglobulina, que puede generarse mediante la digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una secuencia de una región Fc nativa o una variante de una región Fc. La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4. Los reemplazos de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo son conocidos en la técnica (Winter, *et al.* Patentes de los EEUU Nº 5648260 y 5624821). La porción Fc de un anticuerpo

es mediadora de diferentes funciones efectoras importantes, por ejemplo, la inducción de citoquinas, la ADCC, la fagocitosis, la citotoxicidad mediada por complemento (CDC), y la velocidad de eliminación/vida media de los anticuerpos y los complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para anticuerpos terapéuticos, pero en otros casos, puede ser innecesario incluso perjudicial, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Determinados isotipos de la IgG humana, en particular IgG1 y IgG3, son mediadores de la ADCC y la CDC a través de la unión a FcγRs y al complemento C1q, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son componentes críticos en la determinación de la vida media en circulación de los anticuerpos. En aún otra forma de realización, al menos un residuo de aminoácido es reemplazado en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de manera que estas funciones efectoras del anticuerpo resultan 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 disulfuro dentro de la región bisagra (Huber et al Nature; 264 415-20; Thies et al 1999 J Mol Biol; 293 67-79). La mutación de los residuos de cisteína dentro de las regiones bisagra para prevenir la formación de enlaces disulfuro en la cadena pesada desestabilizará la dimerización de los dominios CH3. Se han identificado los residuos responsables de la dimerización de CH3 (Dall'Acqua 1998 Biochemistry 37: 9266-73). Entonces, es posible generar una media Ig monovalente. Vale destacar que estas moléculas de medias Ig monovalentes han sido halladas en la naturaleza para las subclases IgG e IgA (Seligman 1978 Ann Immunol 129: 855-70; Biewenga et al 1983 Clin Exp Immunol 51:

395-400). La estequiometría de la región FcRn: Ig Fc ha sido determinada como 2:1 (West et al., 2000 Biochemistry 39: 9698-708), y media Fc es suficiente para mediar en la unión a FcRn (Kim et al 1994 Eur J Immunol; 24: 542-548). Las mutaciones para alterar la dimerización del dominio CH3 pueden no tener efectos adversos mayores sobre su unión a FcRn, ya que los residuos importantes para la dimerización de CH3 están localizados en la interfase interior de la estructura de lámina b de CH3, mientras que la región responsable de la unión a FcRn está localizada en la interfase externa de los dominios de CH2-CH3. Sin embargo la molécula de media Ig puede presentar ciertas ventajas en la penetración tisular, debido a que presenta un tamaño más pequeño que un anticuerpo regular. En una forma de realización, se reemplaza al menos un residuo de aminoácido en la región constante de la proteína de unión de la invención, por ejemplo, la región Fc, de modo que se interrumpe la dimerización de las cadenas pesadas, lo que resulta en moléculas de media DVD Ig. La actividad antiinflamatoria de la IgG es completamente dependiente del glicano unido a N del fragmento Fc de la IgG. Se han determinado los requerimientos de glicano precisos para la actividad antiinflamatoria para crear un fragmento Fc de IgG1 apropiado y generar un Fc de IgG1 completamente recombinante y sialilado con una potencia muy mejorada (Anthony, O.M., et al. (2008) Science 320:373-376).

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), tal como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a uno más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser

llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo completo. Estas formas de realización de anticuerpos también pueden tener formatos biespecíficos, con especificidad dual o multiespecíficos, es decir, pueden unirse específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados por el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos entre sí en la región bisagra a través de un enlace disulfuro; (iii) un fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv, que consiste en los dominios FL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546, Winter et al., publicación PCT WO 90/05144 A1), que comprende un solo dominio variable; y (vi) una región de determinación de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, a saber, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden conectarse uno con otro usando un conector sintético que les permita prepararlos como una sola cadena de proteína, donde las regiones VL y VH se apareen para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 85:5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena simple también se consideran dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos donde los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena de polipéptido, pero usando un conector que es demasiado

corto para que los dos dominios se combinen en la misma cadena, que lo que se fuerza el apareamiento de dichos dominios con dominios complementarios de una cadena diferente y la formación de dos sitios de unión al antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, O.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Estas porciones de unión a anticuerpos son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel, editores, Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 pp. (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 la cadena liviana, forman un par de regiones de unión al antígeno (Zapata et al Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995); y Patente de los EEUU Nº 5641870).

En esta memoria descriptiva se usa el término "proteína de unión multivalente" para hacer referencia a una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión al antígeno. En una forma de realización, la proteína de unión multivalente se diseña para que tenga tres o más sitios de unión al antígeno, y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. El término "proteína de unión multiespecífica" hace referencia a una proteína de unión con la capacidad de unir dos o más blancos relacionados o no relacionados. Las proteínas de unión con dominio variable dual (DVD) de la invención comprenden dos o más sitios de unión al antígeno, y son proteínas tetravalentes o multivalentes. Los DVD pueden ser monoespecíficos, es decir, capaces de unirse a un antígeno, o multiespecíficos, es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas de unión DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena

liviana se conocen como una DVD-Ig. Cada mitad de una DVD-Ig comprende un polipéptido DVD de cadena pesada, y un polipéptido DVD de cadena liviana, y dos sitios de unión al antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena liviana, con la participación de un total de 6 CDR en la unión al antígeno por sitio de unión al antígeno.

El término "anticuerpo biespecífico", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a anticuerpos completos que son generados por medio de tecnología de quadroma (véase Milstein, C. y A.C. Cuello, Nature, 1983. 305(5934): p. 537-40), mediante la conjugación química de dos anticuerpos monoclonales diferentes (véase Staerz, U.D., et al., Nature, 1985. 314(6012): p. 628-31), mediante métodos de protrusión-en-orificio, o con abordajes similares que permitan introducir mutaciones en la región Fc (véase Holliger, P., T. Prospero, y G. Winter, Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(14): p. 6444-8.18), lo que resulta en varias especies de inmunoglobulinas diferentes, una sola de las cuales es el anticuerpo biespecífico funcional. A través de la función molecular, un anticuerpo biespecífico se une a un antígeno (o epitope) en uno de sus dos brazos de unión (un par de HC/LC) y se une a un antígeno (o epitope) diferente en el segundo brazo (un par diferente de HC/LC). De acuerdo con esta definición, un anticuerpo biespecífico tiene dos brazos de unión al antígeno diferentes (en términos de especificidad y secuencia de la CDR) y es monovalente para cada antígeno al que se une.

El término "anticuerpo con especificidad dual", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a anticuerpos completos que pueden unirse a dos antígenos (o epitopes) diferentes en cada uno de sus dos brazos

de unión (un par de HC/LC) (véase la publicación PCT WO 02/02773). Por consiguiente, una proteína de unión con especificidad dual tiene dos brazos de unión al antígeno idénticos, con una especificidad y una secuencia de la CDR idénticas, y es bivalente para cada antígeno al que se une.

Un "sitio de unión al antígeno funcional" de una proteína de unión es uno que es capaz de unirse al antígeno blanco. La afinidad de unión al antígeno del sitio de unión al antígeno no es necesariamente tan elevada como la del anticuerpo parental del que deriva el sitio de unión al antígeno, pero la capacidad de unirse al antígeno debe poder medirse usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos para evaluar la unión de un anticuerpo a un antígeno. Más aún, no es necesario que la afinidad de unión al antígeno de cada uno de los sitios de unión al antígeno de un anticuerpo multivalente de la presente sea cuantitativamente igual.

El término "citoquina" es un término genérico para designar las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra población de células como mediadores intercelulares. Los ejemplos de citoquinas incluyen las linfoquinas, las monoquinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen las hormonas de crecimiento, tales como la hormona de crecimiento humana, la N-metionil hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorrelaxina; las hormonas glicoproteicas, tales como la hormona estimuladora de los folículos (FSH), la hormona estimuladora de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de los fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentario; los factores de necrosis tumoral alfa y beta;

la sustancia inhibidora mulleriana; el péptido asociado con la gonadotrofina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento del endotelio vascular; la integrina; la trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento de los nervios, tales como NGF-alfa; el factor de crecimiento de las plaquetas; el factor de crecimiento de la placenta, los factores de crecimiento transformantes (TGF), tales como TGF-alfa y TGF-beta; los factores de crecimiento similares a la insulina 1 y 11; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductivos; interferones, tales como los interferones alfa, beta y gamma; los factores estimuladores de colonias (CSF), tales como el CSF de macrófagos (M-CSF), el CSF de granulocitos macrófagos (GM-CSF) y el CSF de de granulocitos (G-CSF); las interleuquinas (IL), tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-33; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos, incluyendo LIF y el ligando kit (KL). Como se lo usa en la presente documentación, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o cultivos de células recombinantes, y equivalentes con actividad biológica de las secuencias de citoquinas nativas.

El término "conector" se usa para hacer referencia a polipéptidos que comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y usados para unir una o más porciones de unión al antígeno. Estos conectores peptídicos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, O.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Los ejemplos de conectores incluyen, sin limitaciones, AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID Nº 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID Nº 2); AKTTPKLGG (SEQ ID Nº 3); SAKTTPKLGG (SEQ ID Nº 4); SAKTTP (SEQ

ID Nº 5); RADAAP (SEQ ID Nº 6); RADAAPTVS (SEQ ID Nº 7); RADAAAAGGPGS (SEQ ID Nº 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEQ ID Nº 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID Nº 10); ADAAP (SEQ ID Nº 11); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID Nº 12); TVAAP (SEQ ID Nº 13); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID Nº 14); QPKAAP (SEQ ID Nº 15); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID Nº 16); AKTTPP (SEQ ID Nº 17); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID Nº 18); AKTTAP (SEQ ID Nº 19); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID Nº 20); ASTKGP (SEQ ID Nº 21); ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID Nº 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID Nº 23); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID Nº 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID Nº 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID Nº 26), TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 27); y ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 28).

Un dominio constante de inmunoglobulina hace referencia a un dominio constante de una cadena pesada o liviana. Las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de la cadena pesada y la cadena liviana de la IgG humana son conocidas en la técnica.

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un anticuerpobtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Vale decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos, excepto por las posibles mutaciones de ocurrencia natural que puedan estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que están dirigidos contra un solo antígeno. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra distintos determinantes (epitopes), cada mAb está dirigido contra un solo determinante en el antígeno.

El modificador "monoclonal" no ha de interpretarse como un requerimiento de un método particular para la producción del anticuerpo.

El término "anticuerpo humano", como se lo usa en la presente documentación, incluye anticuerpos que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de secuencias de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones que han sido introducidas por mutagénesis al azar o con especificidad de sitio in vitro, o por mutaciones somáticas in vivo), por ejemplo, en las CDR, y en particular, en CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se lo usa en la presente documentación, no incluye anticuerpos donde se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como el ratón, en secuencias de regiones de marco humanas.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se lo usa en la presente documentación, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos que se expresan usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (lo que se describirá más adelante en la Sección II C), los anticuerpos aislados de una biblioteca de combinación de anticuerpos humanos recombinantes (Hoogenboom H.O., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gavilondo J.V., y Larrick J.W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378), los anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico

para genes de inmunoglobulina humana (véanse, Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl.* Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A. y Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al. (2000) Immunology Today 21:364-370) o los anticuerpos preparados, expresados o asilados por cualquier otro medio que comprenda separar secuencias de genes de inmunoglobulinas humanas para obtener otras secuencias de ADN. Estos anticuerpos humanos recombinantes tendrán regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas formas de realización, estos anticuerpos humanos recombinantes son sometidos a una mutagénesis *in vitro* (o cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*), por lo que las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan y están relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal, pueden no existir en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana *in vivo* bajo condiciones naturales.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más de sus CDR, alteraciones que pueden resultar en una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con la afinidad del anticuerpo parental, que no posee dichas alteraciones. Los ejemplos de anticuerpos madurados por afinidad tendrán afinidades por el antígeno blanco en el orden nanomolar o aún picomolar. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen con procedimientos conocidos en la técnica. En Marks et al. BidlTechnology 10:779-783 (1992) se describe la maduración por afinidad mediante el barajado de dominios VH y VL. La

mutagénesis al azar de residuos de la CDR y/o el marco se describe en Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147- 155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); Hawkins et al, J. Mol. BioL 226:889-896 (1992), y la mutación selectiva en posiciones de mutagénesis selectivas, posiciones de contacto hipermutación con un residuo de aminoácido que potencia la actividad se describe en la Patente de los EEUU US 6914128B1.

El término "anticuerpo quimérico" hace referencia a anticuerpos que contienen secuencias de la región variable de las cadenas pesada y liviana de una especie, y secuencias de la región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y liviana unidas a regiones constantes humanas.

El término "anticuerpo con una CDR injertada" hace referencia a anticuerpos que comprenden secuencias de regiones variables de las cadenas pesada y liviana de una especie, pero cuyas secuencias de una o más regiones CDR de VH y/o VL han sido reemplazadas por secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y liviana murinas, donde una o más de las CDR murinas (por ejemplo, CDR3) han sido reemplazadas por secuencias CDR humanas.

El término "anticuerpo humanizado" hace referencia a anticuerpos que contienen secuencias de la región variable de las cadenas pesada y liviana de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, pollo, camélidos, ovejas o cabras), pero donde al menos una parte de la secuencia VH y/o VL ha sido alterada para que sean más "similares a humanos", es decir, para que sean más similares a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un

tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo con una CDR injertada donde las secuencias CDR humanas han sido insertadas en secuencias VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias CDR no humanas correspondientes. Además, el término "anticuerpo humanizado" hace referencia específicamente a un anticuerpo, o una variante, un derivado, un análogo un fragmento de éste, que se une de forma inmunoespecífica a un antígeno de interés, y que comprende una región de marco (FR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región de determinación de la complementariedad (CDR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se lo usa en la presente documentación, el término "sustancialmente", en el contexto de una CDR, hace referencia a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado sustancialmente comprende la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables (Fab, Fab', F(ab') 2, FabC, Fv), donde la totalidad o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir, el anticuerpo donante), y la totalidad o sustancialmente todas las regiones de marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina human. En una forma de realización, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado contiene la cadena liviana y al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra,

CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena liviana humanizada. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena pesada humanizada. En formas de realización específicas, un anticuerpo humanizado solamente contiene un dominio variable humanizado de una cadena liviana y/o una cadena pesada humanizada.

Los términos "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "nomenclatura de Kabat" se usan indistintamente en la presente documentación. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, hacen referencia a un sistema para numerar los residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo una porción de unión al antígeno de éste (Kabat *et al.* (1971) *Ann. NY Acad, Sci.* 190:382-391, y Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH 91-3242). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable se extiende entre las posiciones de los aminoácidos 31 a 35 para CDR1, entre las posiciones de los aminoácidos 50 a 65 para CDR2, y entre las posiciones de los aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena liviana, la región hipervariable se extiende entre las posiciones de los aminoácidos 24 a 34 para CDR1, entre las posiciones de los aminoácidos 50 a 56 para CDR2, y entre las posiciones de los aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "CDR" hace referencia a la región de determinación de la complementariedad dentro de las

secuencias variables de un anticuerpo. Para cada una de las regiones variables, hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena liviana, que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. El término "conjunto de CDR", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un grupo de tres CDR que aparecen en una sola región variable y permiten la unión al antígeno. Los límites exactos de estas CDR han sido definidos en distintos términos de acuerdo con distintos sistemas. El sistema descripto por Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solamente provee un sistema de numeración no ambiguo de los residuos que puede aplicarse a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también provee límites precisos para los residuos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR Kabat. Chotia y sus colegas (Chotia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y Chotia et al., Nature 342:877-883 (1989)) descubrieron que determinadas sub-porciones dentro de las CDR Kabat adoptan conformaciones casi idénticas del esqueleto peptídico, a pesar de su gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Estas sub-porciones se denominaron L1, L2 y L3, o H1, H2 y H3, donde "L" y "H" hacen referencia a las regiones de la cadena liviana y la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR Chotia, y tienen límites que se superponen con las CDR Kabat. Otros límites que definen CDR que se superponen con las CDR de Kabat han sido descriptos por Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) y MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Aún otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas de la presente, pero aún así se superponen con las CDR

Kabat, aunque pueden estar acortadas o alargadas a la luz de las predicciones o los descubrimientos experimentales de residuos o grupos de residuos particular, o aún CDR completas, que no afectan significativamente la unión al antígeno. En los métodos usados en la presente pueden emplearse CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque en algunas formas de realización se usan CDR definidas de acuerdo con Kabat o Chotia.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "marco" o "secuencia de marco hace referencia a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Como la definición exacta de una secuencia CDR puede determinarse usando distintos sistemas, el significado de una secuencia de marco está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, L2 y L3 de la cadena liviana, y CDR-H1, H2 y H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones de marco en la cadena liviana y la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, donde CDR1 está localizada entre FR1 y FR2, CDR2 está localizada entre FR2 y FR3, y CDR3 está localizada entre FR3 y FR4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de marco, tal como la han definidotros, representa las FR combinadas en la región variable de una sola cadena de inmunoglobulina de ocurrencia natural. Como se la usa en la presente documentación, una FR representa una de las cuatro sub-regiones, y las FR representan dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región de marco.

Tal como se lo usa en la presente documentación, el término "gen de anticuerpo de la línea germinal" o "fragmento de gen" hace referencia a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han

sufrido el proceso de maduración que conduce a un reordenamiento genético y mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular (véanse, por ejemplo, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por las diversas formas de realización de la presente invención deriva del descubrimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal tienen mayores probabilidades que los genes de genes maduros de conservar estructuras esenciales en su secuencia de aminoácidos que son propias de los individuos de la especie, por lo que es menos probable sean reconocidos como extraños cuando se los use con fines terapéuticos en dicha especie.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "neutralizar" denota contrarrestar la actividad biológica de un antígeno mediante la unión específica de una proteína capaz de unirse a dicho antígeno. En una forma de realización, la proteína de unión neutralizadora se une a la citoquina y reduce su actividad biológica al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, o más.

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

El término "epitope" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a un receptor de célula T o inmunoglobulina. En determinadas formas de realización, los epitopes determinantes incluyen agrupaciones superficiales de moléculas con actividad química, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilos o sulfonilos, y en determinadas formas de realización, pueden tener características específicas en su estructura tridimensional y/o características de carga específicas. Un

epitope es una región de un antígeno donde se une un anticuerpo. Por lo tanto, un epitope consiste de los residuos de aminoácidos de una region de un antígeno (o fragmento del mismo) que se une al sitio complementario en el miembro específico de unión. Un fragmento antigénico puede contener más de un epitope. En determinadas formas de realización, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce su antígeno blanco en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Se dice que los anticuerpos se "unen al mismo epitope" si los anticuerpos compiten (uno evita la unión o modula el efecto del otro). Además, las definiciones estructurales de los epitopes (superpuestos, similares, idénticos) son informativas, pero las definiciones funcionales comúnmente son más relevantes, ya que incluyen parámetros estructurales (de unión) y funcionales (modulación, competición).

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

El término "K_{on}", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a la constante de activación para la asociación de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) con el antígeno, para formar, por ejemplo, el

complejo de anticuerpo/antígeno, como es conocido en la técnica. La "K_{on}" también se conoce como "constante de velocidad de asociación", o "k_a", términos que se usan indistintamente en la presente documentación. Este valor, que indica la velocidad de unión de un anticuerpo con su antígeno blanco, o la velocidad de formación de un complejo entre un anticuerpo y el antígeno, también puede obtenerse de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

El término "K_{off}", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a la constante de desactivación para la disociación, o la "constante de la velocidad de disociación", de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo), por ejemplo, del complejo de anticuerpo/antígeno, como es conocido en la técnica. El término "Koff", también conocido como "constante de la velocidad de disociación" o "kd", como se los usa indistintamente aquí. Este valor representa la constante de disociación de un anticuerpo de su antígeno blanco, o la separación del complejo Ab-Ag en el transcurso del tiempo, lo que resulta en el anticuerpo y el antígeno libres, como se ilustra en la siguiente ecuación:

Ab + Ag←Ab-Ag.

El término "K_D" como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a la "constante de disociación en equilibrio", o "KD," como se los usa indistintamente aquí, que hace referencia al valor obtenido en una medición de titulación en equilibrio, u obtenido dividiendo la constante de velocidad de

disociación (k_{off}) por la constante de velocidad de asociación (k_{on}). La constante de velocidad de asociación, la constante de velocidad de disociación y la constante de disociación en equilibrio se usan para representar la afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno. Los métodos para determinar las constantes de velocidad de asociación y disociación son bien conocidos en la técnica. El uso de técnicas basadas en fluorescencia ofrece una sensibilidad elevada y la capacidad de examinar muestras en amortiguadores fisiológicos en equilibrio. Pueden usarse otros abordajes e instrumentos experimentales, tales como el ensayo BIAcore® (análisis de interacción biomolecular), por ejemplo, los instrumentos disponibles en BIAcore International AB, una compañía de GE Healthcare, Uppsala, Suecia. Adicionalmente, también puede usarse un ensayo KinExA® (ensayo de exclusión cinética), disponible en Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

Una "marca" y una "marca detectable" hacen referencia a la porción unida a un miembro de unión específico, tal como un anticuerpo un analito, por ejemplo, para permitir la detección de la reacción entre dos miembros de un par de unión específico, tal como un anticuerpo y un analito, y el miembro de unión específico marcado, por ejemplo, el anticuerpo el analito, se conoce como "marcado para la detección". De este modo, el término "proteína de unión marcada", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una proteína con una marca incorporada que permite identificar la proteína de unión. En una forma de realización, la marca es un marcador detectable que puede producir una señal que puede detectarse por medios visuales o instrumentales, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado la incorporación una de unidades biotiniladas a un polipéptido,

unidades que pueden detectarse con avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o una actividad enzimática que puede detectarse con métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, sin limitaciones, los que se indicarán a continuación: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^{3}H ^{14}C ^{35}S, ^{90}Y, ^{99m}Tc, ^{11}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho ^{153}Sm); cromógenos, marcas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, lantánido-fósforos), marcas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos de biotinilo; epitopes de polipéptidos predeterminados que son reconocidos por un informante secundario (por ejemplo, secuencias de cierre [*zipper*] de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcas de epitope); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.« Los ejemplos representativos de marcas empleadas comúnmente para los inmunoensayos incluyen porciones que producen luz, por ejemplo, compuestos de acridinio, y porciones que producen fluorescencia, por ejemplo, fluoresceína. Se describen otras marcas en la presente documentación. Con relación a esto, la porción propiamente dicha puede no estar marcada para la detección, pero puede tornarse detectable al reaccionar con otra porción adicional. El uso de "marcas para la detección" abarca este último tipo de marcas detectables.

El término "conjugado" hace referencia a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, unida a una segunda porción química, tal como un agente terapéutico citotóxico. El término "agente" se utiliza en la presente para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una

macromolécula biológica o un extractobtenido a partir de materiales biológicos. En una forma de realización, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, sin limitaciones, toxinas pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracin diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de éstos. Cuando se lo emplea en el contexto de un inmunoensayo, el anticuerpo conjugado puede ser un anticuerpo marcado para la detección, usado como anticuerpo de detección.

Los términos "cristal" y "cristalizado", como se los usa en la presente documentación, hacen referencia a una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo), o una porción de unión al antígeno de ésta, que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma de materia en estado sólido que es diferente de otras formas, tales como el estado sólido amorfo el estado líquido cristalino. Los cristales están compuestos por disposiciones de átomos, iones o moléculas tridimensionales, repetitivas y regulares (por ejemplo, proteínas, tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos de antígenos/anticuerpos). Estas disposiciones tridimensionales siguen relaciones matemáticas bien comprendidas en la técnica. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal, se denomina unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que satisface una simetría cristalográfica dada y bien definida provee la "célula individual" del cristal. La repetición de la célula individual por repeticiones regulares en las tres dimensiones provee el cristal. Véanse

Giege, O. y Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2ª edición, pp. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999).

El término "polinucleótido" hace referencia a una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de cadena simple y doble de ADN.

El término "polinucleótido aislado" hace referencia a un polinucleótido (por ejemplo, genómico, de ADNc o de origen sintético, o alguna combinación de éstos) que, en virtud de su origen, no está asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido con el que normalmente se halla asociado en la naturaleza; que está unidoperativamente a un polinucleótido con el que normalmente no se halla unido en la naturaleza; o que no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término "vector" hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que designa un rizo de ADN circular de cadena doble con el que pueden unirse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, que permite unir segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicarse en forma autónoma en la célula huésped en la que han sido introducidos (por ejemplo, los vectores bacterianos con un origen de replicación en bacterias y los vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped al introducirse en ella, por lo que se replican junto con el genoma del huésped.

Más aún, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes con los que están unidos operativamente. Estos vectores se conocen en la presente como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles para los procedimientos de ADN recombinante comúnmente toman la forma de plásmidos. En esta solicitud, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector de uso más común. Sin embargo, la invención pretende incluir estas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que tienen funciones equivalentes.

El término "unidoperativamente" hace referencia a una yuxtaposición donde los componentes descriptos se hallan en una relación que les permite funcionar de la manera deseada. Una secuencia control "unida operativamente" a una secuencia codificante está ligada de modo tal que la expresión de la secuencia codificante se obtiene bajo condiciones compatibles con las secuencias control. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen secuencias de control de la expresión que se hallan contiguas al gen de interés y secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión", tal como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a las secuencias de polinucleótidos que son necesarias para la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las cuales están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas para el inicio de la transcripción, la terminación, secuencias promotoras y

potenciadoras; señales eficaces para el procesamiento del ARN, tales como secuencias de separación y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas; y cuando se lo desea, secuencias que mejoran la secreción de las proteínas. La naturaleza de estas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped. En procariotas, estas secuencias de control generalmente incluyen promotores, sitios de unión a ribosomas y secuencias de terminación de la transcripción. En eucariotas, en general, estas secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" incluye componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias directrices y secuencias que son asociados de fusión.

La "transformación" hace referencia a cualquier proceso con el cual el ADN exógeno ingresa en una célula huésped. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales, usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para insertar secuencias de ácidos nucleicos extrañas en células huésped procariotas o ecuariotas. El método se selecciona sobre la base de la célula huésped a transformar, y puede incluir, sin limitaciones, la infección viral, la electroporación, la lipofección y el bombardeo de partículas. Estas células "transformadas" incluyen células transformadas de forma estable, donde el ADN insertado puede replicarse como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma del huésped. También incluyen células que

expresan de forma transitoria el ADN o el ARN insertado por períodos de tiempo limitados.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped") hace referencia a la célula en la que se introduce ADN exógeno. En una forma de realización, la célula huésped comprende dos o más (por ejemplo, múltiples) anticuerpos que codifican ácidos nucleicos, tales como las células huésped descriptas en la Patente de los EEUU Nro. 7262028, por ejemplo. Estos términos no solamente hacen referencia a la célula sujeto particular, sino también a la progenie de dicha célula. Como es posible que ocurran modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, de hecho, esta progenie puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluye dentro del término "célula huésped", tal como se lo usa en la presente documentación. En una forma de realización, las células huésped incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas entre cualquiera de los reinos de la vida. En otra forma de realización, las células eucariotas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. En otra forma de realización, las células huésped incluyen, sin limitaciones, la línea de células procariotas de *E. coli*; las líneas de células de mamífero CHO, HEK 293, COS, NS0, SP2 y PER.C6; la línea de células de insecto Sf9; y las células fúngicas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Pueden emplearse técnicas convencionales para la síntesis de ADN recombinante y oligonucleótidos, y para cultivo y la transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y los procedimientos de purificación pueden llevarse a cabo de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes, de maneras conocidas en la técnica o

como se describe en la presente documentación. Las técnicas y los procedimientos mencionados en general pueden llevarse a cabo se acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica, y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se describen en toda la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: *A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

Un "organismo transgénico", como es conocido en la técnica, hace referencia a un organismo que tiene células que contienen un transgen, donde el transgen introducido en el organismo (o cualquier ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa naturalmente en el organismo. Un "transgen" es una construcción de ADN que se integra de forma estable y operativa en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un organismo transgénico, donde dirige la expresión de un producto génico codificado en uno más tipos celulares o tejidos del organismo transgénico.

Los términos "regular" y "modular" se utilizan indistintamente y, según se usan en la presente, hacen referencia a un cambio una alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de una citoquina). La modulación puede ser un incremento una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada de la molécula de interés. Los ejemplos de actividades y funciones de una molécula incluyen, sin limitaciones, características de unión, actividad enzimática, activación de receptores celulares y transducción de señales.

Correspondientemente, el término "modulador" hace referencia a un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o una función de una

molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de una citoquina). Por ejemplo, un modulador puede provocar un incremento una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada de una molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del modulador. En determinadas formas de realización, un modulador es un inhibidor que reduce la magnitud de al menos una actividad o una función de una molécula. Los ejemplos de inhibidores incluyen, sin limitaciones, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, hidratos de carbono pequeñas moléculas orgánicas. Los pepticuerpos se describen, por ejemplo, en WO01/83525.

El término "agonista" hace referencia a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca un incremento en la magnitud de una actividad o una función determinada, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del agonista. Los agonistas particulares de interés pueden incluir, sin limitaciones, polipéptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, o cualquier otra molécula capaz de unirse al antígeno.

Los términos "antagonista" o "inhibidor" hacen referencia a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del antagonista. Los antagonistas particulares de interés incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica del antígeno. Los antagonistas y los inhibidores de los antígenos pueden incluir, sin limitaciones, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, o cualquier otra

molécula capaz de unirse al antígeno.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "cantidad eficaz" hace referencia a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la severidad y/o la duración de un trastorno uno más de sus síntomas, inhibir o prevenir el avance de un trastorno, provocar la regresión de un trastorno, inhibir o prevenir la recurrencia, el desarrollo, el inicio la progresión de uno más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o potenciar o mejorar el o los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, un agente profiláctico terapéutico).

Los términos "paciente" y "sujeto" pueden usarse indistintamente en la presente para hacer referencia a un animal, tal como un mamífero, incluyendo un primate (por ejemplo, un ser humano, un mono y un chimpancé), un animal no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un cobayo, un gato, un perro, una rata, un ratón, una ballena), un ave (por ejemplo, un pato un ganso) y un tiburón. Preferiblemente, el paciente o sujeto es un ser humano, tal como un ser humano que está siendo tratado analizado para determinar la presencia de una enfermedad, un trastorno una condición, un ser humano que se halla en riesgo de contraer una enfermedad, un trastorno una condición, un ser humano que tiene una enfermedad, un trastorno una condición, y/o un ser humano que está recibiendo tratamiento para una enfermedad, un trastorno una condición.

El término "muestra", como se lo usa en la presente documentación, se usa en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", como se la usa en la presente documentación, incluye, sin limitaciones, una cantidad de una sustancia de un organismo vivo un organismo que estuvo vivo. Estos

organismos vivos incluyen, sin limitaciones, seres humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Estas sustancias incluyen sin limitaciones, sangre (por ejemplo, sangre completa), plasma, suero, orina, fluido amniótico, fluido sinovial, células endoteliales, leucocitos, monocitos, otras células, órganos, tejidos, médula ósea, nódulos linfáticos y bazo.

Un "componente", varios "componentes" y "al menos un componente" generalmente hacen referencia a un anticuerpo de captura, un anticuerpo de detección o conjugado, un control, un calibrador, una serie de calibradores, un panel de sensibilidad, un recipiente, un amortiguador, un diluyente, una sal, una enzima, un cofactor para una enzima, un reactivo de detección, un reactivo/una solución de pretratamiento, un sustrato (por ejemplo, una solución), una solución de detención, y elementos semejantes que pueden incluirse en un conjunto de elementos para evaluar una muestra de prueba, tal como una muestra de orina, suero plasma de un paciente, de acuerdo con los métodos que se describen en la presente y otos métodos conocidos en la técnica. Por ende, en el contexto de esta descripción, "al menos un componente", un "componente" y varios "componentes" pueden incluir un polipéptido u otro analito, como se describió con anterioridad, tal como una composición que comprende un analito, tal como un polipéptido, que opcionalmente se halla inmovilizado en un soporte sólido, tal como mediante la unión a un anticuerpo anti-analito (por ejemplo, anti-polipéptido). Algunos componentes pueden hallarse en solución o liofilizados, y han de ser reconstituidos para usarlos en el ensayo.

Un "control" hace referencia a una composición de la que se sabe que no contiene el analito ("control negativo") o que sí contiene el analito ("control

positivo"). Un control positivo puede comprender una concentración conocida del analito. Los términos "control", "control positivo" y "calibrador" pueden usarse indistintamente en la presente para hacer referencia a una composición que comprende una concentración conocida del analito. Un "control positivo" puede usarse para establecer las características de desempeño del ensayo, y se trata de un indicador útil de la integridad de los reactivos (por ejemplo, los analitos).

Un "corte predeterminado" y un "nivel predeterminado" generalmente hacen referencia al valor de corte de un ensayo que se usa para evaluar la eficacia de diagnóstico/pronóstico/terapéutica, mediante la comparación de los resultados del ensayo con el corte/nivel predeterminado, donde el corte/nivel predeterminado ya ha sido ligado asociado a diversos parámetros clínicos (por ejemplo, la severidad de una enfermedad, el progreso/la falta de progreso/la mejora, etcétera). Si bien en esta descripción pueden proveerse ejemplos de niveles predeterminados, es bien conocido que los valores de corte pueden variar dependiendo de la naturaleza del inmunoensayo (por ejemplo, los anticuerpos empleados y otos factores). Además, aquellos versados en la técnica han de poder adaptar la descripción provista en la presente a otros inmunoensayos, para obtener valores de corte específicos para dichos inmunoensayos sobre la base de la descripción. Si bien el valor preciso de un corte/nivel predeterminado puede variar entre los ensayos, las correlaciones que se describen en la presente (de haberlas) deberían ser generalmente aplicables.

Un "reactivo de pretratamiento", por ejemplo, un reactivo de lisis, precipitación y/o solubilización, como se lo usa en un ensayo de diagnóstico

como se describe en la presente documentación, es uno que lisa las células y/o solubiliza un analito que está presente en una muestra de prueba. El pretratamiento no es necesario para todas las muestras, como se describe con mayor detalle en la presente documentación. Entre otros acontecimientos, la solubilización del analito (por ejemplo, el polipéptido de interés) puede comprender la liberación del analito de cualquier proteína de unión endógena que pueda estar presente en la muestra. Un reactivo de pretratamiento puede ser homogéneo (puede no ser necesario un paso para separarlo) o heterogéneo (puede ser necesario un paso para separarlo). Con el uso de un reactivo de pretratamiento heterogéneo, es necesario eliminar las proteínas de unión al analito que hayan precipitado de la muestra de prueba antes de proceder con el siguiente paso del ensayo.

Los "reactivos de control de calidad", en el contexto de los inmunoensayos y los conjuntos de elementos que se describen en la presente documentación, incluyen, sin limitaciones, calibradores, controles y paneles de sensibilidad. Un "calibrador" o "referencia" típicamente se usa (por ejemplo, uno más, tal como varios) para establecer curvas de calibración (referencia) para interpolar la concentración de un analito, tal como un anticuerpo un analito. Como alternativa, puede usarse un solo calibrador que sea cercano a un corte positivo/negativo predeterminado. Pueden usarse varios calibradores combinados (es decir, más de un calibrador, o una cantidad variable de calibradores) para conformar un "panel de sensibilidad".

El "riesgo" hace referencia a la posibilidad o la probabilidad de que ocurra un acontecimiento particular, ya sea en la actualidad o en algún punto en el futuro. La "estratificación del riesgo" hace referencia a una serie de

factores de riesgo clínicos que les permiten a los médicos clasificar a los pacientes como poseedores de un riesgo bajo, moderado, alto máximo de desarrollar una enfermedad, un trastorno una condición particulares.

"Específico" y "especificidad", en el contexto de una interacción entre miembros de un par de unión específico (por ejemplo, un antígeno (o un fragmento de éste) y un anticuerpo (o un fragmento de éste con reactividad antigénica)), hacen referencia a la reactividad selectiva de la interacción. La frase "se une específicamente" y frases análogas hacen referencia a la capacidad de los anticuerpos (o fragmentos de éstos con reactividad antigénica) de unirse específicamente a un analito (o un fragmento de éste) y no unirse específicamente a otras entidades.

Un "miembro de unión específico" es un miembro de un par de unión específico. Un par de unión específico comprende dos moléculas diferentes, cada una de las cuales se une específicamente a través de medios químicos o físicos. Entonces, además de los antígenos y los anticuerpos de los pares de unión específicos de los inmunoensayos comunes, otros pares de unión específicos pueden incluir biotina y avidina (o estreptavidina), hidratos de carbono y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores y enzimas, inhibidores de enzimas y enzimas, y semejantes. Además, los pares de unión específicos pueden incluir miembros que son análogos de los miembros de unión específicos originales, por ejemplo, un análogo de analito. Los miembros de unión inmunorreactivos específicos incluyen antígenos, fragmentos de antígenos y anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales y policlonales, así como complejos, fragmentos y variantes (incluyendo fragmentos de variantes) de éstos, ya sea

aislados o producidos por medios recombinantes.

Una "variante", como se la usa en la presente documentación, hace referencia a un polipéptido que difiere de un polipéptido dado (por ejemplo, un polipéptido de IL-18, BNP, NGAL o el HIV, o un anticuerpo contra el polipéptido) en una secuencia de aminoácidos, debido a la adición (por ejemplo, la inserción), la supresión o la sustitución conservativa de aminoácidos, pero que retiene la actividad biológica de dicho polipéptido (por ejemplo, una variante de IL-18 puede competir con un anticuerpo anti-IL-18 por la unión a IL-18). En la técnica, se reconoce que una sustitución conservativa de un aminoácido, es decir, el reemplazo de un aminoácido por un aminoácido diferente con propiedades similares (por ejemplo, hidrofilicidad y grado y distribución de las regiones cargadas) típicamente comprende un cambio menor. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, considerando el índice hidropático de los aminoácidos, como es conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982)). El índice hidropático de un aminoácido se basa en la consideración de su hidrofobicidad y su carga. En la técnica, se sabe que es posible realizar sustituciones por aminoácidos con índices hidropáticos similares y aún retener una función apropiada. En un aspecto, se realizan sustituciones por aminoácidos que tienen índices hidropáticos de ± 2. La hidrofilicidad de los aminoácidos también puede usarse para determinar las sustituciones que han de resultar en proteínas que retendrán la función biológica. En el contexto de un péptido, la consideración de la hidrofilicidad de los aminoácidos permite calcular la máxima hidrofilicidad local promedio de dicho péptido, una medida útil de la que se ha informado que está bien correlacionada con la antigenicidad y la inmunogenicidad (véase, por

ejemplo, la Patente de los EEUU Nº 4554101). La sustitución por aminoácidos con valores de hidrofilicidad similares puede resultar en péptidos que retengan la actividad biológica, por ejemplo, la inmunogenicidad, como es conocido en la técnica. En un aspecto, las sustituciones se realizan por aminoácidos que tienen valores de hidrofilicidad separados por ± 2. Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofilicidad de los aminoácidos están influidos por la cadena lateral particular de dicho aminoácido. De manera consistente con esta observación, ha de comprenderse que las sustituciones de aminoácidos que sean compatibles con la función biológica dependerán de la similitud relativa de los aminoácidos, y particularmente las cadenas laterales de dichos aminoácidos, determinada a partir de la hidrofobicidad, la hidrofilicidad, la carga, el tamaño y otras propiedades. Una "variante" también puede usarse parea describir un polipéptido un fragmento de éste que han sido sometidos a un procesamiento diferencial, tal como por proteólisis, fosforilación u otra modificación posterior a la traducción, pero que aún retiene su actividad biológica o su reactividad por el antígeno, por ejemplo, la capacidad de unirse a IL-18. En la presente documentación, el uso de una "variante" abarca fragmentos de una variante, a menos que en el contexto se indique lo contrario.

I. Generación de una proteína de unión con DVD

La invención se relaciona con proteínas de unión con dominio variable dual, capaces de unirse a uno más blanco, y con métodos para prepararlas. En una forma de realización, la proteína de unión comprende una cadena polipeptídica, donde dicha cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, C es un dominio constante, X1 representa un aminoácido un

polipéptido, X2 representa una región Fc, y n es 0 ó 1. La proteína de unión de la invención puede generarse usando diversas técnicas. En la invención se proveen vectores de expresión, células huésped y métodos para generar la proteína de unión.

A. Generación de los anticuerpos monoclonales parentales

Los dominios variables de la proteína de unión con DVD pueden obtenerse a partir de anticuerpos parentales, incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales capaces de unirse a antígenos de interés. Estos anticuerpos pueden ser de ocurrencia natural o pueden generarse con tecnología de recombinación.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de éstas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma incluyendo las que son conocidas en la técnica y que se detallan, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies*: *A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edción, 1988); Hammerling, et al., en Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). El término "anticuerpo monoclonal", como se lo usa en la presente documentación, no se limita a los anticuerpos producidos con tecnología de hibridomas. El término "anticuerpo monoclonal" hace referencia a un anticuerpo que deriva de un clon individual, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no el método con el que se lo produce. Los hibridomas se seleccionan, se clonan y se someten a un análisis adicional para

determinar características deseables, incluyendo el desarrollo de hibridomas robustos, la producción de anticuerpos en gran cantidad y la presencia de características deseables en los anticuerpos, como se describirá en el Ejemplo 1 más adelante. Los hibridomas pueden cultivarse y expandirse *in vivo* en animales singeneicos, en animales que carecen de sistema inmune, por ejemplo, ratones desnudos, o en un cultivo celular *in vitro.* Los métodos para seleccionar, clonar y expandir hibridomas son bien conocidos por aquellos versados en la técnica. En una forma de realización particular, los hibridomas son hibridomas de ratón. En otra forma de realización, los hibridomas se producen en un animal no humano, en una especie distinta del ratón, tal como la rata, la oveja, el cerdo, el ganado bovino el caballo. En otra forma de realización, los hibridomas son hibridomas humanos, donde se fusiona un mieloma humano no secretor con una célula humana donde se expresa un anticuerpo capaz de unirse a un antígeno específico.

También se generan anticuerpos monoclonales recombinantes a partir de linfocitos individuales aislados usando un procedimiento conocido en la técnica, tal como el método de anticuerpos con linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en la Patente de los EEUU Nº 5627052, la Publicación PCT WO 92/02551, y Babcock, J.S. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848. En este método, se identifican células individuales que secretan anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos derivados de un animal inmunizados, se rescatan ADNc de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de las células por PCR con transcriptasa inversa, y luego se expresan estas regiones variables en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulinas apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanes), en

células huésped de mamíferos, tales como células COS o CHO. Después, las células huésped transfectadas con las secuencias de inmunoglobulinas amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden someterse a otros procedimientos de análisis y selección *in vitro*, por ejemplo, analizando las células transfectadas para aislar aquellas células que expresan anticuerpos contra el antígeno de interés. Las secuencias de inmunoglobulinas amplificadas pueden someterse a manipulaciones adicionales *in vitro*, por ejemplo, con métodos de maduración por afinidad *in vitro* como los que se describen en la Publicación PCT WO 97/29131 y la Publicación PCT WO 00/56772.

Los anticuerpos monoclonales también se producen inmunizando un animal no humano que comprende algunos o la totalidad de los loci de la inmunoglobulina humana con un antígeno de interés. En una forma de realización, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón modificada que comprende fragmentos grandes de loci de inmunoglobulina humana y presenta una producción de anticuerpos diferentes. Véanse, por ejemplo, Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994), y las Patentes de los EEUU Nº 5916771, 5939598, 5985615, 5998209, 6075181, 6091001, 6114598 y 6130364. Véanse también WO 91/10741, publicada el 25 de Julio de 1991, WO 94/02602, publicada el 3 de Febrero de 1994, WO 96/34096 y WO 96/33735, ambas publicadas el 31 de Octubre de 1996, WO 98/16654, publicada el 23 de Abril de 1998, WO 98/24893, publicada el 11 de Junio de 1998, WO 98/50433, publicada el 12 de Noviembre de 1998, WO 99/45031, publicada el 10 de Septiembre de 1999, WO 99/53049, publicada el 21 de Octubre de 1999, WO 00/09560, publicada el 24 de Febrero de 2000, y WO 00/037504, publicada el 29 de Junio de 2000.

El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio de anticuerpos completamente humanos similar al de un ser humano adulto y genera anticuerpos monoclonales humanos con especificidad por el antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente 80% del repertorio humano merced a la introducción de fragmentos YAC con la configuración de la línea germinal humana, con un tamaño en el orden de las megabases, que contienen loci de la cadena pesada humana y loci de la cadena liviana humana. Véanse Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998).

También pueden usarse Methods in *vitro* para preparar los anticuerpos parentales, donde se analiza una biblioteca de anticuerpos para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para dicho examen de las bibliotecas de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen los métodos que se describen, por ejemplo, en Ladner et al. Publicación PCT Nº WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación PCT Nº WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación PCT Nº WO 91117271; Winter et al. Publicación PCT Nº WO 92/2079 1; Markland et al., Publicación PCT Nº WO 92/15679; Breitling et al., Publicación PCT Nº WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación PCT Nº WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226: 889-896; Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; y Barbas et al. (1991) *PNAS*

88:7978-7982, la publicación de solicitud de patente de los EEUU 20030186374, y la Publicación PCT Nº WO 97/29131.

Los anticuerpos parentales de la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de partículas de fagos que contienen las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, estos fagos pueden utilizarse para presentar dominios de unión al antígeno expresados a partir de un repertorio una biblioteca de combinación de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los fagos que expresan un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con un antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado un antígeno unido capturado en una superficie sólida o una esfera. Los fagos usados en estos métodos típicamente son fagos filamentosos, e incluyen los dominios de unión fd y M13, expresados a partir de fagos con Fab, Fv o dominios de anticuerpos Fv estabilizados por enlaces disulfuro fusionados en forma recombinante al gen III o al gen VIII de proteínas del fago. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos descriptos en Brinkman et al., *J. Inmunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames et al., *J. Inmunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Inmunol.* 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Inmunology* 57:191-280 (1994); la Solicitud PCT Nº PCT/GB91/01134; las Publicaciones PCT WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401; y las Patentes de los EEUU Nº

5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780 225, 5658727, 5733743 y 5969108.

Como se describe en las referencias de la presente, una vez seleccionados los fagos, las regiones codificantes del anticuerpobtenidas de los fagos pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y pueden expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describirá con mayor detalle más adelante. Por ejemplo, también pueden emplearse procedimientos para la producción recombinante de fragmentos Fab, Fab' y $F(ab')_2$ donde se usan métodos conocidos en la técnica, tales como los que se describen en la Publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); Sawai et al., *AJRI* 34:26-34 (1995); y Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988). Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir anticuerpos y Fv de cadena simple incluyen las que se describen en la Patente de los EEUU Nº 4946778 y 5258498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); y Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988).

Como alternativa al análisis de bibliotecas de anticuerpos recombinantes mediante la presentación en fagos, pueden aplicarse otras metodologías conocidas en la técnica para analizar grandes bibliotecas de combinación con el fin de identificar anticuerpos parentales. Un tipo de sistema de expresión alternativa es uno donde la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones de ARN-proteínas, como se describe en la Publicación PCT Nº

WO 98/31700, por Szostak y Roberts, y en Roberts, O.W. y Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido la proteína que codifica mediante la traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que contienen puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por consiguiente, un ARNm específico puede enriquecerse a partir de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, una biblioteca de combinación) sobre la base de las propiedades del péptido la proteína codificada, por ejemplo, el anticuerpo la porción de éste, tales como la unión del anticuerpo la porción de éste al antígeno con especificidad dual. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de éstos, recuperadas del análisis de dichas bibliotecas, pueden expresarse por medios recombinantes como se describe en la presente (por ejemplo, en células huésped de mamífero), y más aún, pueden someterse a una maduración de afinidad adicional con procedimientos adicionales de análisis de fusiones de ARNm-péptidos en cuyas secuencias originales se han introducido mutaciones, o con otros métodos de maduración por afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se describe en la presente.

En otro abordaje, los anticuerpos parentales también pueden generarse usando métodos de presentación en levaduras conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en levaduras, se usan métodos genéticos para unir dominios de anticuerpos a la pared celular de la levadura, de modo que sean presentados en la superficie de la levadura. En particular, estas levaduras pueden utilizarse para presentar dominios de unión al antígeno expresados a partir de un repertorio una biblioteca de combinación de anticuerpos (por

ejemplo, humanos o murinos). Los ejemplos de métodos de presentación en levaduras que pueden usarse para preparar los anticuerpos parentales incluyen aquellos descriptos en Wittrup, et al., Patente de los EEUU Nº 6699658.

Los anticuerpos que se describen en la presente pueden ser sometidos a modificaciones adicionales para generar anticuerpos parentales con injertos de CDR y humanizados. Los anticuerpos parentales con injertos de CDR comprenden secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo humano, donde una o más de las regiones CDR de la V_H y/o la V_L son reemplazadas por secuencias CDR de anticuerpos murinos capaces de unirse a un antígeno de interés. Una secuencia de la región del marco de cualquier anticuerpo humano puede servir como molde para el injerto de CDR. Sin embargo, el reemplazo directo de cadenas en una de estas regiones de marco comúnmente resulta en una cierta pérdida de afinidad de unión al antígeno. Cuanto más homólogo es un anticuerpo humano al anticuerpo murinoriginal, menor es la probabilidad de que la combinación de las CDR murinas con la región del marco humana introduzca distorsiones en las CDR que puedan reducir la afinidad. Entonces, en una forma de realización, la región variable del marco humano seleccionada para reemplazar la región variable del marco murino, aparte de las CDR, tiene al menos a 65% de identidad de secuencia con la región variable del marco del anticuerpo murino. En una forma de realización, las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR, tienen al menos 70% de identidad de secuencia. En una forma de realización particular, las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR, tienen al menos 75% identidad de secuencia. En otra forma de realización, las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR,

tienen al menos 80% de identidad de secuencia. Los métodos para producir dichos anticuerpos son conocidos en la técnica (véase EP 239400; Publicación PCT WO 91/09967; Patentes de los EEUU Nº 5225539, 5530101 y 5585089), reformulación de residuos en superficie [*veneering*] o reformulación de superficie [*resurfacing*] (EP 592106; EP 519596; Padlan, *Molecular Immunology* 28 (4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., *PNAS* 91:969-973 (1994)) y barajado de cadenas (Patente de los EEUU Nº 5565352); y anticuerpos anti-idiotípicos

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado y tienen una o más regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de la especie no humana, y regiones de marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Las secuencias de Ig humanas conocidas se describen, por ejemplo, en 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/inmunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Inmune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; www.anticuerporesource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Inmunology.html.www.inmunologylink.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.ehimeu.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.isacnet.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEPStart.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/inmuno.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/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/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/Webpages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html; Kabat et al., Sequences of Proteins of Inmunological Interest, Departamento de Salud de los EEUU (1983). Estas secuencias importadas pueden usarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la afinidad de unión, la velocidad de activación, la velocidad de desactivación, la avidez, la especificidad, la vida media o cualquier otra característica apropiada, como es conocido en la técnica.

Los residuos de la región del marco en las regiones del marco humano pueden reemplazarse por los residuos correspondientes de la CDR del

anticuerpo donante para alterar, por ejemplo, mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones del marco de trabajo se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelación de las interacciones de los residuos de la CDR y del marco de trabajo para identificar los residuos del marco de trabajo que son importantes para la unión al antígeno y por comparación de secuencias para identificar residuos poco comunes del marco de trabajo en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen et al., Patente de los EEUU Nº 5585089; Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988). Los modelos tridimensionales de la inmunoglobulina se hallan disponibles y son conocidos por aquellos versados en la técnica. Hay programas informáticos disponibles que permiten ilustrar y presentar estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite analizar la participación de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de unión de la inmunoglobulina candidata a su antígeno. De este modo, pueden aislarse y combinarse residuos FR de secuencias consenso e importadas con el fin de obtener una característica deseada en el anticuerpo, tal como la afinidad de unión por uno más antígenos blanco. En general, los residuos de las CDR tienen una influencia directa y más sustancial sobre la unión al antígeno. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, tales como, sin limitaciones, los que se describen en Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151 2296 (1993); Chotia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992);

Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994); Publicación PCT WO 91/09967, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592106; EP 519596, EP 239400, Patentes de los EEUU Nº 5565332, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567.

B. Criterio para la selección de anticuerpos monoclonales parentales

Una forma de realización de la invención se relaciona con la selección de anticuerpos parentales con al menos una o más propiedades deseadas en la molécula DVD-Ig. En una forma de realización, la propiedad deseada se selecciona de uno más parámetros del anticuerpo. En otra forma de realización, los parámetros del anticuerpos se seleccionan del grupo formado por especificidad por el antígeno, afinidad por el antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epitope, estabilidad, solubilidad, eficacia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y unión a antígenortólogo.

B1. Afinidad por el antígeno

La afinidad deseada de un mAb terapéutico puede depender de la naturaleza del antígeno, y del criterio de valoración terapéutica deseada. En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales tienen afinidades más altas (Kd = entre 0,01 y 0,50 pM) cuando bloquean la interacción receptor de citoquina-citoquina ya que dichas interacciones son generalmente interacciones

de alta afinidad (por ejemplo, rangos <pM – <nM). En tales casos, la afinidad del mAb por su blanco debería ser igual o mejor que la afinidad de la citoquina (ligando) por su receptor. Por otra parte, un mAb con menor afinidad (rango > nM) podría ser eficaz terapéuticamente por ejemplo, en la depuración de proteínas circulantes potencialmente patogénicas como por ejemplo, anticuerpos monoclonales que se unen a, secuestran, y elimine las especies circulantes de amiloide A-β. En otros casos, la reducción de la afinidad de un mAb con alta afinidad existente por mutagénesis sitio dirigida o usando un mAb con menor afinidad por su blanco, se podría usar para evitar los potenciales efectos secundarios como por ejemplo, un mAb con alta afinidad puede secuestrar/neutralizar todos sus blancos pretendidos, de este modo reduciendo/eliminando completamente la o las funciones de la proteína objetivo. En este marco, a mAb con baja afinidad puede secuestrar/neutralizar una fracción del blanco que puede ser la responsable de los síntomas de la enfermedad (los niveles patológicos o sobreproducidos), permitiendo de este modo que una fracción del blanco continúe cumpliendo su función o funciones fisiológicas normales. Por lo tanto, puede ser posible reducer el Kd para ajustar la dosis y/o reducir los efectos secundarios. La afinidad del mAb parental puede cumplir un papel en el direccionamiento apropiado a moléculas de la superficie celular para alcanzar un resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, si un blanco se expresa en células cancerígenas con alta densidad y en células normales con baja densidad, un mAb con baja afinidad se unirá a un mayor número de blancos en las células tumorales que en las células normales, dando como resultado la eliminación de la célula tumoral a través de ADCC ó CDC, y por lo tanto podría tener efectos terapéuticos deseados. De este modo,

la selección de un mAb con afinidad deseada puede ser de interés tanto para blancos solubles como para los de superficie.

La señalización de un receptor cuando se produce la interacción con su ligando puede depender de la afinidad de la interacción receptor-ligando. De modo similar, es concebible que la afinidad de un mAb por un receptor de superficie podría determinar la naturaleza de la señalización intracelular y si el mAb puede transmitir una señal agonista o antagonista. La naturaleza basada en la afinidad de la señalización mediada por mAb puede tener un impacto en su perfil de efectos secundarios. Por lo tanto, se necesita determinar con cuidado la afinidad deseada y las funciones deseadas de los anticuerpos monoclonales terapéuticos por medio de experimentación *in vitro* e *in vivo*.

El Kd deseado de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) se puede determinar experimentalmente dependiendo del resultado terapéutico deseado. En una forma de realización se seleccionan los anticuerpos parentales con afinidad (Kd) por un antígeno particular igual a, o mejor que, la afinidad deseada de una DVD-Ig por el mismo antígeno. Los anticuerpos parentales para una molécula DVD-Ig dada pueden ser el mismo anticuerpo o anticuerpos distintos. La afinidad y cinética de unión a antígeno se evalúan por Biacore u otra técnica similar. En una forma de realización, cada anticuerpo parental tiene una constante de disociación (Kd) de su antígeno que se selecciona del grupo formado por: al menos aproximadamente 10^{-7} M; al menos aproximadamente 10^{-8} M; al menos aproximadamente 10^{-9} M; al menos aproximadamente 10^{-10} M; al menos aproximadamente 10^{-11} M; al menos aproximadamente 10^{-12} M; y como máximo 10^{-13} M. El primer anticuerpo parental del cual se obtiene VD1 y el segundo anticuerpo parental del cual se

obtiene VD2, pueden tener afinidad (K_D) similar o diferente por el respectivo antígeno. Cada anticuerpo parental tiene una constante de velocidad de asociación (Kon) al antígeno que se selecciona del grupo formado por: al menos aproximadamente $10^2M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5M^{-1}s^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6M^{-1}s^{-1}$, según se midió por resonancia de plasmón superficial. El primer anticuerpo parental del cual se obtiene VD1 y el segundo anticuerpo parental del cual se obtiene VD2, pueden tener una constante de velocidad de asociación (Kon) similar o diferente por el respectivo antígeno. En una forma de realización, cada anticuerpo parental tiene una constante de velocidad de disociación (Koff) del antígeno que se selecciona del grupo formado por: al menos aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, según se midió por resonancia de plasmón superficial. El primer anticuerpo parental del cual se obtiene VD1 y el segundo anticuerpo parental del cual se obtiene VD2, pueden tener una constante de velocidad de disociación (Koff) similar o diferente por el respectivo antígeno.

B2. Potencia

La afinidad/potencia de anticuerpos monoclonales parentales dependerá del resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, para interacciones receptor-ligando (O-L) la afinidad (kd) es igual o mejor que el kd O-L (rango pM). Para la simple depuración de una proteína circulante patológica, el kd podría estar en el rango nM, por ejemplo, depuración de diferentes especies de péptido A-β circulante. Adicionalmente, el kd también dependerá de si el blanco expresa copias múltiples del mismo epitope por ejemplo un epitope conformacional de

direccionamiento del mAb en oligómeros Aβ.

Cuando VD1 y VD2 se unen al mismo antígeno, pero a diferentes epitopes, la DVD-Ig contendrá 4 sitios de unión para el mismo antígeno, aumentando de esta manera la avidez y así el kd aparente de la DVD-Ig. En una forma de realización, se seleccionan los anticuerpos parentales con igual o menor kd que el deseado en la DVD-Ig. Las consideraciones de afinidad de un mAb parental también pueden depender de si el DVD-Ig contiene cuatro más sitios de unión a idénticos (es decir; una DVD-Ig de un único mAb). En este caso, el kd aparente podría ser mayor que el mAb debido a su avidez. Dicha DVD-Igs se puede emplear para entrecruzar receptores de superficie, aumentar la potencia de neutralización, potenciar la depuración de proteínas patológicas, etc.

En una forma de realización se seleccionan los anticuerpos parentales con potencia de neutralización por un antígeno específico igual o mejor que el potencial de neutralización de la DVD-Ig por el mismo antígeno. La potencia de neutralización se puede evaluar por medio de un bioensayo dependiente de blanco en donde las células de un tipo apropiado producen una señal que se puede medir (es decir proliferación o producción de citoquina) en respuesta a una estimulación del blanco, y la neutralización del blanco por el mAb puede reducir la señal en un modo dependiente de la dosis.

B3. Funciones biológicas

Los anticuerpos monoclonales pueden desempeñar potencialmente muchas funciones. Algunas de estas funciones se enumeran en la Tabla 1. Estas funciones se pueden evaluar tanto por ensayos *in vitro* (por ejemplo, ensayos en base a células y bioquímicos) así como con modelos animales *in*

vivo.

Tabla 1: Algunas potenciales aplicaciones para anticuerpos terapéuticos

Blanco (Clase)	Mecanismo de acción (blanco)
Soluble (citoquinas, otros)	Neutralización de la actividad (por ejemplo, una citoquina) Potenciar la depuración (por ejemplo, oligómeros Aβ) Aumentar la vida media (por ejemplo, GLP 1)
Superficie celular (Receptores, otros)	Agonista (por ejemplo, GLP1 O; EPO; etc.) Antagonista (por ejemplo, integrinas; etc.) Citotóxico (CD 20; etc.)
Depósitos de proteínas	Potenciar depuración/degradación (por ejemplo, placas Aβ, depósitos amiloides)

Se pueden seleccionar mAbs con diferentes funciones a las descritas en los ejemplos en la presente documentación en la Tabla 1 para obtener un resultado terapéutico deseado. Se pueden usar dos o más anticuerpos monoclonales parentales seleccionados con formato DVD-Ig para lograr dos funciones distintas en una única molécula DVD-Ig. Por ejemplo, se puede generar una DVD-Ig por selección de un mAb parental que neutralice la función de una citoquina específica, y seleccionar una mAb parental que potencie la depuración de una proteína patológica. Similarmente, los inventores pueden seleccionar dos anticuerpos monoclonales parentales que reconozcan dos receptores de superficie celular diferentes, un mAb con una función agonista sobre un receptor y el otro mAb con una función antagonista sobre un receptor diferente. Estos dos anticuerpos monoclonales seleccionados, cada uno con

una función distinta, se pueden usar para construir una única molécula de DVD-Ig que tendrá dos funciones diferentes (agonista y antagonista) de los anticuerpos monoclonales en una única molécula. Similarmente, se pueden usar dos anticuerpos monoclonales antagonistas a receptores de superficie celular, cada uno bloqueando la unión de los respectivos ligandos de receptor (por ejemplo, EGF e IGF) con un formato DVD-Ig. Por el contrario, se puede seleccionar un mAb anti-receptor antagonista (por ejemplo, anti-EGFR) y un mAb anti-mediador soluble neutralizante (por ejemplo, anti-IGF1/2) para hacer un DVD-Ig.

B4. Reconocimiento de epitope:

Regiones diferentes de proteínas pueden cumplir diferentes funciones. Por ejemplo regiones específicas de una citoquina interaccionan con el receptor de citoquina para dar lugar a la activación del receptor mientras que otras regiones de la proteína pueden ser requeridas para la estabilización de la citoquina. En este caso uno puede seleccionar un mAb que se une específicamente a la región o regiones de interacción con el receptor en la citoquina y de este modo bloquear la interacción citoquina-receptor. En algunos casos, por ejemplo ciertos receptores de quimoquinas que unen ligandos múltiples, se puede seleccionar un mAb que se une al epitope (región en el receptor de quimoquina) que interacciona con sólo un ligando. En otros casos, los anticuerpos monoclonales pueden unirse a epitopes sobre un blanco que no son directamente responsables de las funciones fisiológicas de la proteína, pero la unión de mAb a estas regiones podría interferir con las funciones fisiológicas (impedimento estérico) o alterar la conformación de la proteína de modo tal que la proteína no puede funcionar (mAb a receptores con ligandos

múltiples que alteran la conformación del receptor de forma que ninguno de los ligandos se puede unir). También se han identificado anticuerpos monoclonales anti-citoquina que no bloquean la unión de la citoquina a su receptor, pero bloquean la transducción de señales (por ejemplo, 125-2H, un mAb anti-IL-18).

Los ejemplos de epitopes y funciones de mAb incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, bloqueo de la interacción Receptor-Ligando (O-L) (mAb neutralizante que se une al sitio de interacción con O); impedimento estérico que da como resultado una unión a O disminuida o nula. Un Ab puede unirse al blanco en un sitio diferente del sitio de unión al receptor, pero todavía interferir con la unión al receptor y funciones del blanco por inducción de cambios conformacionales y eliminar la función (por ejemplo, Xolair), unirse a O pero bloquear la señalización (125-2H).

En una forma de realización, el mAb parental necesita estar dirigido al epitope apropiado para una eficacia máxima. Dicho epitope debe ser conservado en la DVD-Ig. El epitope de unión a un mAb se puede determinar por medio de muchas técnicas, incluyendo co-cristalografía, proteólisis limitada de complejos mAb-antígeno acoplado al mapeo del péptido por espectrometría de masa (Legros V. et al 2000 Protein Sci. 9:1002-10), bibliotecas de péptidos por expresión en fagos (O'Connor KH et al 2005 J Immunol Methods. 299:21-35), así como mutagénesis (Wu C. et al . 2003 J Immunol 170:5571-7).

B5. Propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas:

El tratamiento terapéutico con anticuerpos con frecuencia requiere la administración de altas dosis, con frecuencia varios mg/kg (debido a la baja potencia en términos de cómo consecuencia de un generalmente gran peso molecular). Con el objetivo de adecuarse a la conformidad del paciente y de

abordar adecuadamente las terapias de enfermedades crónicas y el tratamiento ambulatorio, se desea la administración subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.) de mAbs terapéuticos. Por ejemplo, el volumen máximo deseado para una administración s.c. es aproximadamente 1,0 mL, y por lo tanto, son deseables concentraciones >100 mg/mL para limitar el número de inyecciones por dosis. En una forma de realización, el anticuerpo terapéutico se administra en una dosis. El desarrollo de dichas formulaciones está limitado, sin embargo, por interacciones proteína-proteína (por ejemplo, agregación, que potencialmente aumenta los riesgos de inmunogenicidad) y por limitaciones durante el procesamiento y administración (por ejemplo, viscosidad). Consecuentemente, las grandes cantidades requeridas para la eficacia clínica y las limitaciones en el desarrollo asociadas limitan el completo aprovechamiento del potencial de la formulación del anticuerpo y la administración s.c. en regímenes de altas dosis. Es evidente que las propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas de una molécula proteína y la solución de proteína son de extrema importancia, por ejemplo, características de estabilidad, solubilidad y viscosidad.

B5.1. Estabilidad:

Una formulación de anticuerpo "estable" es una en la cual el anticuerpo en la misma esencialmente conserva sus su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica con el almacenamiento. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. En una forma de realización, el anticuerpo en la formulación es estable a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) o a 40°C durante al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente entre 2 y 8°C durante al menos 1

año durante al menos 2 años. Además, en una forma de realización, la formulación es estable luego del congelamiento (a, por ejemplo, -70°C) y descongelamiento de la formulación, más adelante 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 un agregado en la formulación.

Se desea una DVD-Ig estable *in vitro* a diferentes temperaturas durante un período de tiempo extenso. Uno puede lograr esto mediante un rápido tamizaje de mAbs parentales estables *in vitro* a temperaturas elevadas, por ejemplo, a 40°C durante entre 2 y 4 semanas, y luego evaluar la estabilidad. Durante el almacenamiento a entre 2 y 8°C, la proteína muestra estabilidad durante al menos 12 meses, por ejemplo, al menos 24 meses. La estabilidad (% de molécula intacta, monomérica) se puede evaluar usando diferentes técnicas tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, SDS-PAGE, así como ensayo de bioactividad. Para una lista más comprensiva de técnicas analíticas que se pueden emplear para analizar las modificaciones covalentes y conformacionales véase Jones, A. J. S. (1993) Analytical methods for the assessment of protein formulations y delivery systems. En: Cleland, J. L.; Langer, O., editores. Formulation y delivery of peptides y proteins, 1^{era} edición, Washington, ACS, pg. 22-45; y Pearlman, O.; Nguyen, T. H.(1990) Analysis of protein drugs. En: Lee, V. H., editor. Peptide y protein drug delivery, 1^{era} edición, New York, Marcel Dekker, Inc., pg. 247-301.

Heterogeneidad y formación de agregado: la estabilidad del anticuerpo puede ser tal que la formulación puede mostrar menos de aproximadamente 10%, y, en una forma de realización, menos de aproximadamente 5%, En otra forma de realización, menos de aproximadamente 2%, o, en una forma de realización, en el rango entre 0,5% y 1,5% o menos en el material anti-GMP que está presente como agregado. La cromatográfica de exclusión molecular es un método que es sensible, reproducible, y muy robusto en la detección de agregados de proteína.

Adicionalmente a niveles bajos de agregados, el anticuerpo debe, en una forma de realización, ser químicamente estable. La estabilidad química puede ser determinada por cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico aniónico), cromatografía de interacción hidrofóbica, u otros métodos tales como isoelectroenfoque o electroforesis capilar. Por ejemplo, la estabilidad química del un anticuerpo puede ser tal que luego del almacenamiento durante al menos 12 meses a entre 2 y 8°C, el pico que representa el anticuerpo no modificado en una cromatografía de intercambio catiónico puede aumentar no más del 20%, en una forma de realización, no más del 10%, o, en otra forma de realización, no más del 5% en comparación con la solución de anticuerpo antes del ensayo de almacenamiento.

En una forma de realización, los anticuerpos parentales muestran integridad estructural; correcta formación de puentes disulfuro, y correcto plegamiento: la inestabilidad química debida a cambios en la estructura secundaria o terciaria de un anticuerpo puede impactar en la actividad del anticuerpo. Por ejemplo, la estabilidad indicada por la actividad del anticuerpo

puede ser tal que luego del almacenamiento de al menos 12 meses a entre 2 y 8°C la actividad del anticuerpo pueda disminuir no más del 50%, en una forma de realización no más del 30%, o incluso no más del 10%, o en una forma de realización no más del 5% o 1% en comparación con la solución de anticuerpo antes del ensayo de almacenamiento. Se pueden emplear ensayos de unión a antígeno para determinar la actividad del anticuerpo.

B5.2. Solubilidad:

La "solubilidad" de un mAb se correlaciona con la producción de una IgG monomérica correctamente plegada. La solubilidad de la IgG por lo tanto puede ser evaluada por HPLC. Por ejemplo, la IgG soluble (monomérica) dará lugar a un pico único en el cromatograma de HPLC, mientras que la insoluble (por ejemplo, multimérica y agregada) dará lugar a varios picos. Una persona versada en la técnica tendrá por lo tanto la capacidad de detectar un aumento disminución en la solubilidad de una IgG usando técnicas de HPLC de rutina. Para una lista más comprensiva de técnicas analíticas que se pueden emplear para analizar la solubilidad (véase Jones, A. G. Dep. Chem. Biochem. Eng., Univ. Coll. London, London, UK. Editor(es): Shamlou, P. Ayazi. Process. Solid-Liq. Suspensions (1993), 93-117. Editorial: Butterworth-Heinemann, Oxford, UK y Pearlman, Rodney; Nguyen, Tue H, Advances in Parenteral Sciences (1990), 4 (Pept. Protein Drug Delivery), 247-301). La solubilidad de un mAb terapéutico es crítica para la formulación a altas concentraciones requeridas con frecuencia para la adecuada dosificación. Tal como se describe en la presente documentación, solubilidades >100 mg/mL pueden ser requeridas para permitir la dosificación eficaz del anticuerpo. Por ejemplo, la solubilidad del anticuerpo no puede ser menos de aproximadamente 5 mg/mL en la fase de investigación

temprana, en una forma de realización no menos de aproximadamente 25 mg/mL en estadios de procesos avanzados de la ciencia, o en una forma de realización no menos de aproximadamente 100 mg/mL, o en una forma de realización no menos de aproximadamente 150 mg/mL. Es obvio para una persona versada en la técnica que entre las propiedades intrínsecas de una molécula proteína son importantes las propiedades fisicoquímicas de la solución de proteína, por ejemplo, estabilidad, solubilidad, viscosidad. Sin embargo, una persona versada en la técnica apreciará que existe una gran variedad de excipientes que se pueden usar como aditivos para afectar beneficiosamente las características de la formulación de proteína final. Estos excipientes pueden incluir: (i) solventes líquidos, cosolventes (por ejemplo, alcoholes tales como etanol); (ii) agentes amortiguadores (por ejemplo, fosfato, acetato, citrato, aminoácidos amortiguadores); (iii) azúcares o alcoholes azúcares (por ejemplo, sacarosa, trealosa, fructosa, rafinosa, manitol, sorbitol, dextranos); (iv) tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 20, 40, 60, 80, poloxámeros); (v) modificadores de isotonicidad (por ejemplo, sales tales como NaCl, azúcares, alcoholes azúcares); y (vi) otros (por ejemplo, preservantes, agentes quelantes, antioxidantes, sustancias quelantes (por ejemplo, EDTA), polímeros biodegradables, moléculas vehículo (por ejemplo, HSA, PEGs).

La viscosidad es un parámetro de gran importancia con respecto a la fabricación del anticuerpo y el procesamiento del anticuerpo (por ejemplo, diafiltración/ultrafiltración), procesos de llenado y terminado (aspectos de bombeo, aspectos de filtración) y aspectos de administración (jeringabilidad, administración con dispositivo sofisticado). Las bajas viscosidades permiten que la solución líquida del anticuerpo tenga altas concentraciones. Esto permite

que la misma dosis sea administrada en pequeños volúmenes. Pequeños volúmenes de inyección forman parte de la ventaja de menor dolor en la sensación de la inyección, y las soluciones no tienen que ser necesariamente isotónicas para reducir el dolor en las inyecciones en el paciente. La viscosidad de la solución de anticuerpo puede ser tal que a velocidades de cizalla de 100 (1/s) la viscosidad de la solución de anticuerpo es menor que 200 mPa s, en una forma de realización menor a 125 mPa s, en otra forma de realización menor a 70 mPa s, y en aun otra forma de realización menor a 25 mPa s o incluso menor a 10 mPa s.

B 5.3. Eficacia de producción

La generación de una DVD-Ig que se expresa eficazmente en células mamíferas, tales como células de ovarios de hámster chino (CHO), requerirá en una forma de realización dos anticuerpos monoclonales parentales que se expresan eficazmente en células mamíferas. El rendimiento de producción de una línea mamífera estable (es decir CHO) debe ser superior a aproximadamente 0,5g/l, en una forma de realización superior a aproximadamente 1g/l, y en otra forma de realización en el rango de aproximadamente entre 2 y aproximadamente 5 g/l o más (Kipriyanov SM, Little M. 1999 Mol Biotechnol. 12:173-201; Carroll S, Al-Rubeai M. 2004 Expert Opin Biol Ther. 4:1821-9).

La producción de anticuerpos y proteínas de fusión Ig en células mamíferas está influenciada por varios factores. El diseño del vector de expresión por medio de la incorporación de promotores fuertes, potenciadores y marcadores de selección puede maximizar la transcripción del gene de interés a partir de una copia del vector integrado. La identificación de los sitios

de integración del vector que son permisivos para altos niveles de transcripción del gen pueden aumentar la expresión de la proteína de un vector (Wurm et al, 2004, Nature Biotechnology , 2004, Vol/Iss/Pg. 22/11 (1393-1398)). Además, los niveles de producción son afectados por la relación de las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo y diferentes pasos en el proceso de ensamble y secreción de la proteína (Jiang et al. 2006, Biotechnology Progress, Jan-Feb 2006, vol. 22, no. 1, p. 313-8).

B 6. Inmunogenicidad

La administración de un mAb terapéutico puede dar como resultado con cierta incidencia una respuesta inmune (es decir, la formación de anticuerpos endógenos dirigidos contra el mAb terapéutico). Los potenciales elementos que pueden inducir inmunogenicidad deben ser analizados durante la selección de los anticuerpos monoclonales parentales, y se deben realizar pasos para reducir dichos riesgos para optimizar los anticuerpos monoclonales parentales antes de la construcción de DVD-Ig. Se ha encontrado que los anticuerpos derivados de ratón son altamente inmunogénicos en pacientes. La generación de anticuerpos quiméricos que comprenden regiones variables de ratón y constantes de humanos presentan un próximo paso lógico para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos (Morrison y Schlom, 1990). Como alternativa, la inmunogenicidad se puede reducir transfiriendo secuencias CDR murinas a la estructura del anticuerpo humano (rediseño/injerto de CDR/humanización), como está descrito para un anticuerpo terapéutico por Riechmann et al., 1988. Otro método se refiere como "reformulación de superficie [*resurfacing*]" o "reformulación de los residuos de superficie [*veneering*]", comenzando con los dominios variables de cadena

liviana y pesada de roedor, sólo se alteran los aminoácidos de la estructura accesibles en superficie a los de humano, mientras que las CDR y los aminoácidos escondidos se conservan del anticuerpo de roedor parental (Roguska et al., 1996). En otro tipo de humanización, en lugar de injertar las CDRs enteras, una técnica injerta sólo las "regiones determinantes de especificidad" (SDRs), definidas como el subconjunto de residuos de CDR que están involucrados en la unión del anticuerpo a su blanco (Kashmiri et al., 2005). Esto necesita de la identificación de las SDRs por medio del análisis de las estructuras tridimensionales disponibles de los complejos anticuerpo-blanco el análisis por mutación de los residuos de CDR del anticuerpo para determinar cuáles interaccionan con el blanco. Como alternativa, los anticuerpos completamente humanos pueden tener una inmunogenicidad reducida en comparación con los anticuerpos murinos, quiméricos o humanizados.

Otra estrategia para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos terapéuticos es la eliminación de ciertas secuencias específicas que se predice como inmunogénicas. En una estrategia, luego de una primera generación se ha ensayado la biología en humanos y se encontró inaceptablemente inmunogénico, los epitopes de células B se pueden mapear y luego alterarse para evitar la detección inmune. Otra estrategia usa métodos para predecir y eliminar potenciales epitopes de células T. Se han desarrollado métodos computacionales para estudiar e identificar las secuencias de péptidos de terapéuticos biológicos con el potencial de unirse a proteínas MHC (Desmet et al., 2005). Como alternativa, se puede usar un método en base a células dendríticas humanas para identificar epitopes de células T $CD4^+$ en potenciales alergenos proteicos (Stickler et al., 2005; S.L. Morrison y J. Schlom, *Important*

Adv. Oncol. (1990), pp. 3–18; Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. y Winter, G. "*Reshaping human antibodies for therapy.*" Nature (1988) 332: 323-327; Roguska-M-A, Pedersen-J-T, Henry-A-H, Searle-S-M, Roja-C-M, Avery-B, Hoffee-M, Cook-S, Lambert-J-M, Blättler-W-A, Rees-A-O, Guild-B-C. A comparison of two murine mAbs humanized by CDR-grafting y variable dominio resurfacing. Protein engineering, {Protein-Eng}, 1996, vol. 9, p. 895-904; Kashmiri-Syed-V-S, De-Pascalis-Roberto, Gonzales-Noreen-O, Schlom-Jeffrey. SDR grafting--a new approach to antibody humanization. Methods (San Diego Calif.), {Methods}, May 2005, vol. 36, no. 1, p. 25-34; Desmet-Johan, Meersseman-Geert, Boutonnet-Nathalie, Pletinckx-Jurgen, De-Clercq-Krista, Debulpaep-Maja, Braeckman-Tessa, Lasters-Ignace. Anchor profiles of HLA-specific peptides: analysis by a novel affinity scoring method y experimental validation. Proteins, 2005, vol. 58, p. 53-69; Stickler-M-M, Estell-D-A, Harding-F-A. $CD4^+$ T-cell epitope determination using unexposed human donor peripheral blood mononuclear cells. Journal of immunotherapy 2000, vol. 23, p. 654-60).

B 7. Eficacia *in vivo*

Para generar una molécula DVD-Ig con eficacia *in vivo* deseada, es importante generar y seleccionar mAbs con eficacia *in vivo* deseada similar cuando se da en combinación. Sin embargo, en algunos casos la DVD-Ig puede exhibir una eficacia *in vivo* que no puede ser lograda con la combinación de dos mAbs separados. Por ejemplo, una DVD-Ig puede acercar dos blancos induciendo una actividad que no se puede alcanzar con la combinación de dos mAbs separados. En la sección B 3 de la presente documentación se describen funciones biológicas deseables adicionales. Los anticuerpos parentales con

características deseables en la molécula DVD-Ig se pueden seleccionar en base a los factores tales como farmacocinética ½; distribución tisular; blancos solubles versus de superficie celular; y concentración-soluble/densidad-superficie del blanco.

B 8. Distribución tisular *in vivo*

Para generar una molécula DVD-Ig con una distribución tisular *in vivo* deseada, en una forma de realización se deben seleccionar mAbs parentales con similar perfil de distribución tisular *in vivo* deseada. Como alternativa, en base a los mecanismos de la estrategia de direccionamiento específico dual, puede en otros casos no ser necesaria la selección de mAbs parentales con la similitud en la distribución tisular *in vivo* deseada cuando se da en combinación. Por ejemplo, en el caso de una DVD-Ig en donde un componente de unión dirige la DVD-Ig a un sitio específico llevando de esta manera al segundo componente de unión al mismo sitio blanco. Por ejemplo, una especificidad de unión de una DVD-Ig podría estar dirigida a páncreas (células del islote) y la otra especificidad podría llevar GLP1 al páncreas para inducir insulina.

B 9. Isotipo:

Para generar una molécula DVD-Ig con propiedades deseadas incluyendo, a modo de ejemplo ilustrativo, isotipo, funciones efectoras y la vida media de circulación, en una forma de realización se seleccionan mAbs parentales con las funciones efectoras Fc apropiadas dependiendo de la utilidad terapéutica y de los criterios de valoración terapéutica deseada. Hay cinco clases o isotipos de cadena pesada principales, algunos de los cuales tienen varios subtipos y estos determinan las funciones efectoras de una molécula de anticuerpo. Estas funciones efectoras residen en la región bisagra,

dominios CH2 y CH3 de la molécula de anticuerpo. Sin embargo, los residuos en otras partes de una molécula de anticuerpo pueden tener igualmente efectos en las funciones efectoras. La región bisagra de las funciones efectoras Fc incluye: (i) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, (ii) unión a complemento (C1q), activación y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), (iii) fagocitosis/depuración de complejos antígeno-anticuerpo, y (iv) liberación de citoquina en algunos casos. Estas funciones efectoras Fc de una molécula de anticuerpo están mediadas por medio de la interacción de la región Fc con un conjunto de receptores de superficie celular específicos de clase. Los anticuerpos del isotipo IgG1 son más activos mientras que IgG2 e IgG4 tienen mínimas o ninguna función efectora. Las funciones efectoras de los anticuerpos IgG están mediadas por interacciones con tres tipos de receptores de Fc celular estructuralmente homólogos (y subtipos) (FcgR1, FcgRII y FcgRIII). Estas funciones efectoras de una IgG1 se pueden eliminar por mutación de residuos aminoácidos específicos en la región bisagra inferior (por ejemplo, L234A, L235A) que son requeridos para la unión FcgR y C1q. Los residuos de aminoácidos en la región Fc, en particular los dominios CH2-CH3, también determinan la vida media de circulación de la molécula de anticuerpo. Esta función de Fc está mediada por la unión de la región Fc al receptor Fc neonatal (FcRn) que es responsable para la recirculación de las moléculas de anticuerpo desde los lisosomas ácidos nuevamente a la circulación general.

Si un mAb debe tener un isotipo activo uno inactivo, dependerá del criterio de valoración terapéutico deseado para un anticuerpo. Más adelante se enumeran algunos ejemplos de uso de isotipos y resultado terapéutico deseado:

a) Si el criterio de valoración deseado es la neutralización funcional de una citoquina soluble, entonces se puede usar un isotipo inactivo;
b) Si el criterio de valoración deseado es la depuración de una proteína patológica, se puede usar un isotipo activo;
c) Si el resultado deseado es la depuración de agregados de proteína, se puede usar un isotipo activo;
d) Si el resultado deseado es antagonizar un receptor de superficie, se puede usar un isotipo inactivo (Tysabri, IgG4; OKT3, IgG1 mutada);
e) Si el resultado deseado es eliminar las células blanco, se puede usar un isotipo activo (Herceptina, IgG1 (y con funciones efectoras potenciadas); y
f) Si el resultado deseado es quitar proteínas de la circulación sin entrar al SNC, se puede usar un isotipo IgM (por ejemplo, depuración de especies de péptidos Ab circulantes).

Las funciones efectoras Fc de un mAb parental se puede determinar por diferentes métodos *in vitro* conocidos en la técnica.

Tal como se discutió, la selección del isotipo, y de esta manera las funciones efectoras dependerán del criterio de valoración terapéutico deseado. En los casos en donde se desea la simple neutralización de un blanco circulante, por ejemplo bloqueo de las interacciones receptor-ligando, las funciones efectoras pueden ser no requeridas. En tales casos, se desean los isotipos o mutaciones en la región Fc de un anticuerpo que eliminan las funciones efectoras. En otros casos en donde la eliminación de células blanco es el criterio de valoración terapéutico, se desean por ejemplo la eliminación de células tumorales, isotipos o mutaciones o eliminación de fucosas en la región

Fc que potencie las funciones efectoras (Presta GL, Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656, 2006; Satoh M., Iida S., Shitara K. Expert Opinion Biol. Ther. 6:1161-1173, 2006). De manera similar, dependiendo de la utilidad terapéutica, la vida media de circulación de una molécula de anticuerpo se puede reducir/prolongar por modulación de las interacciones anticuerpo-FcRn introduciendo mutaciones específicas en la región Fc (Dall'Acqua WF, Kiener PA, Wu H. J. Biol. Chem. 281:23514-23524, 2006; Petkova SB., Akilesh S., Sproule TJ. et al. Internat. Immunol. 18:1759-1769, 2006; Vaccaro C., Bawdon O., Wanjie S et al. PNAS 103:18709-18714, 2007).

La información publicada sobre los diferentes residuos que inluyen en las diferentes funciones efectoras de un mAb terapéutico normal puede requerir que sea confirmada para DVD-Ig. Puede ser posible que en un formato DVD-Ig adicional (diferente) los residuos de la región Fc, diferentes de aquellos identificados para la modulación de las funciones efectoras del anticuerpo monoclonal, puedan ser importantes.

En conjunto, la decisión de cuales funciones efectoras Fc (isotipo) serán críticas en el formato DVD-Ig final dependerá de la indicación de la enfermedad, blanco terapéutico, criterio de valoración terapéutico deseado y consideraciones de seguridad. Más adelante se enumeran regiones constantes apropiadas de cadena pesada y cadena liviana ejemplificativas que incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo:

- IgG1 - alotipo: G1mz
- IgG1 mutante - A234, A235
- IgG2 - alotipo: G2m(n-)
- Kappa - Km3

- Lambda

Estudios de receptor de Fc y C1q: La posibilidad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) no deseadas por formación de complejos de anticuerpo a cualquier blanco sobreexpresado en las membranas celulares, puede ser abolida por las mutaciones en la región bisagra (por ejemplo, L234A, L235A). Estos aminoácidos sustituidos, presentes en la región bisagra de IgG1 del mAb, se espera que den como resultado una unión disminuida de mAb a los receptores de Fc humano (pero no FcRn), ya que la unión de FcgR se cree que ocurre en sitios superpuestos en la región bisarga de IgG1. Esta característica de mAb puede llevar a un perfil de seguridad mejorado sobre anticuerpos que contienen una IgG de tipo salvaje. La unión de mAb a los receptores de Fc humanos se pueden determinar por experimentos de citometría de flujo usando líneas celulares (por ejemplo,THP-1, K562) y una línea celular CHO diseñada que exprese FcgRIIb (u otros FcgRs). En comparación con anticuerpos monoclonales IgG1 control, mAb presenta unión reducida a FcgRI y FcgRIIa mientras que la unión a FcgRIIb no está afectada. La unión y activación de C1q por complejos inmunes antígeno/IgG dispara la cascada clásica del complemento con las consecuentes respuestas inflamatoria y/o inmunoregulatoria. El sitio de unión a C1q en las IgGs ha sido localizado en residuos de la región bisagra de IgG. La unión de C1q para aumentar las concentraciones de mAb se evaluó por ELISA de C1q. Los resultados demostraron que mAb no es capaz de unirse a C1q, tal como se esperaba cuando se comparó con la unión de una IgG1 de tipo salvaje control. En conjunto, las mutaciones L234A, L235A en la región bisagra abole la unión

de mAb a FcgRI, FcgRIIa y C1q pero no afecta la interacción de mAb con FcgRIIb. Estos datos sugieren que *in vivo*, el mAb con Fc mutante interactuará normalmente con el FcgRIIb inhibitorio pero probablemente fracasará en interactuar con los receptores activantes FcgRI y FcgRIIa o C1q.

Unión a FcRn humano: El receptor neonatal (FcRn) es responsable del transporte de IgG a través de la placenta y para el control de la vida media catabólica de las moléculas de IgG. Puede ser deseable aumentar la vida media terminal de un anticuerpo para mejorar la eficacia, para reducir la dosis o frecuencia de la administración, o para mejorar la localización al blanco. Como alternativa, puede ser ventajoso realizar lopuesto, es decir, disminuir la vida media terminal de un anticuerpo para reducir la exposición al cuerpo entero para mejorar la relación de unión blanco a no blanco. El ajuste de la interacción entre IgG y su receptor salvaje, FcRn, ofrece una manera de aumentar o disminuir la vida media terminal de IgG. Las proteínas en la circulación, incluyendo IgG, son incorporadas en la fase fluido por medio de micropinocitosis por ciertas células, tales como aquellas del endotelio vascular. IgG se puede unir a FcRn en endosomas bajo condiciones levemente ácidas (pH entre 6,0 y 6,5) y puede reciclarlo a la superficie celular, en donde se libera bajo condiciones casi neutras (pH entre 7,0 y 7,4). El mapeo del sitio de unión de la región Fc en FcRn80, 16, 17 mostró que dos residuos histidina que son conservados en las especies, His310 y His435, son los responsables de la dependencia con el pH de esta interacción. Usando tecnología de expresión en fagos, se identificó una mutación en la región Fc de ratón que aumenta la unión a FcRn y extiende la vida media de la IgG de ratón (véase Victor, G. et al.; Nature Biotechnology (1997), 15(7), 637-640). Las mutaciones en la región Fc

que aumentan la afinidad de unión de IgG humana por FcRn a pH 6,0, pero no a pH 7,4, también han sido identificadas (véase Dall'Acqua William F, et al., Journal of Immunology (2002), 169(9), 5171-80). Adicionalmente, en un caso, también se observó un aumento similar dependiente del pH en la unión (hasta 27 veces) para FcRn de Rhesus, y esto dio como resultado un aumento de dos veces en la vida media sérica en monos Rhesus en comparación con la IgG parental (véase Hinton, Paul O. et al., Journal of Biological Chemistry (2004), 279(8), 6213-6216). Estos hallazgos indican que es posible extender la vida media en plasma de la terapéutica del anticuerpo por ajuste de la interacción de la región Fc con FcRn. Por el contrario, las mutaciones en la región Fc que atenúan la interacción con FcRn pueden reducir la vida media del anticuerpo.

B.10 Farmacocinética (PK):

Para generar una molécula DVD-Ig con perfil farmacocinético deseado, en una forma de realización se seleccionan mAbs parentales con perfil farmacocinético similarmente deseado. Una consideración es que la respuesta inmune a anticuerpos monoclonales (es decir, HAHA, respuesta humana anti-anticuerpo humano; HACA, respuesta humana anti-anticuerpo quimérico) además complica la farmacocinética de estos agentes terapéuticos. En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales con mínima o sin inmunogenicidad se usan para la construcción de moléculas DVD-Ig de modo que las DVD-Igs resultantes también tendrán mínima o ninguna inmunogenicidad. Algunos de los factores que determinan la PK de un mAb incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, propiedades intrínsecas del mAb (secuencia de aminoácidos de VH); inmunogenicidad; unión a FcRn y funciones de Fc.

El perfil PK de los anticuerpos monoclonales parentales seleccionados puede ser determinado fácilmente en roedores ya que el perfil PK en roedores se correlaciona bien con (o predice con detalle) el perfil PK de anticuerpos monoclonales en monos *cynomolgus* y humanos. El perfil PK se determina tal como se describe en la sección de Ejemplos 1.2.2.3.A.

Luego que se seleccionan los anticuerpos monoclonales parentales con características de PK deseadas (y otras propiedades funcionales deseadas tal como se describe en la presente documentación), se construye la DVD-Ig. Dado que las moléculas DVD-Ig contienen dos dominios de unión a antígeno de dos anticuerpos monoclonales parentales, las propiedades PK de la DVD-Ig también se evalúan. Por lo tanto, mientras se determinan las propiedades PK de la DVD-Ig, se pueden emplear ensayos PK para determinar el perfil PK en base a la funcionalidad de ambos dominios de unión a antígeno derivados de los 2 anticuerpos monoclonal parentales. El perfil PK de una DVD-Ig se puede determinar tal como se describe en el Ejemplo 1.2.2.3.A. Otros factores que pueden afectar el perfil PK de DVD-Ig incluyen la orientación de del dominio de unión a antígeno (CDR); tamaño del conector; e interacciones Fc/FcRn. Las características PK de los anticuerpos parentales se pueden evaluar por análisis de los siguientes parámetros: absorción, distribución, metabolismo y excreción.

Absorción: Hasta este momento, la administración de anticuerpos monoclonales terapéuticos es por medio de rutas parenterales (por ejemplo, intravenosa [IV], subcutánea [SC], o intramuscular [IM]). La absorción de un mAb en la circulación sistémica seguido de la administración SC ó IM del espacio intersticial es principalmente a través de la vía linfática. La degradación proteolítica, saturable, presistémica puede dar como resultado una

biodisponibilidad absoluta variable luego de la administración extravascular. Generalmente, se puede observar un aumento en la biodisponibilidad absoluta con el aumento de las dosis de anticuerpos monoclonales debido a la saturación de la capacidad proteolítica a altas dosis. El proceso de absorción para un mAb es generalmente un poco lento ya que el fluido linfático drena lentamente al sistema vascular, y la duración de la absorción puede darse durante horas a varios días. La biodisponibilidad absoluta de anticuerpos monoclonales seguida la administración SC generalmente varía en un rango entre 50% y 100%. En el caso de una estructura mediadora de transporte en la barrera sangre-cerebro direccionada por la construccion DVD-Ig, los tiempos de circulación en plasma se pueden reducir debido al transporte trans-celular mejorado en la barrera sangre. cerebro (BBB) hacia el compartimiento del SNC, donde se libera la DVD-Ig para permitir la interacción a través del sitio de reconocimiento de su segundo antígeno.

Distribución: Luego de la administración IV, los anticuerpos monoclonales generalmente siguen un perfil bifásico de concentración-tiempo en suero (o plasma), comenzando con una fase rápida de distribución, seguido de una fase de eliminación lenta. En general, un modelo farmacocinético biexponencial es el que mejor describe este tipo de perfil farmacocinético. El volumen de distribución en el compartimento central (Vc) para un mAb es generalmente igual a o levemente mayor que el volumen del plasma (entre 2 y 3 litros). Un patrón bifásico marcado en el perfil sérico (plasma) de concentración versus tiempo puede no ser evidente para otras vías parenterales de administración, tales como IM ó SC, debido a que la fase de distribución de la curva de concentración sérica(plasma)-tiempo está

enmascarada por la porción larga de absorción. Muchos factores, incluyendo las propiedades fisicoquímicas, la incorporación específica mediada por receptor específica de sitio y orientada por blanco, la capacidad de unión del tejido, y la dosis de mAb pueden influir en la biodistribución de un mAb. Algunos de estos factores pueden contribuir a la no linealidad en la biodistribución para un mAb.

Metabolismo y excreción: Debido al tamaño molecular, los anticuerpos monoclonales intactos no son excretados en la orina por medio del riñón. Son principalmente inactivados por el metabolismo (por ejemplo, catabolismo). Para anticuerpos monoclonales terapéuticos en base a IgG, las vidas medias generalmente varían en un rango entre horas o entre 1y 2 días hasta más de 20 días. La eliminación de un mAb puede ser afectada por muchos factores, incluyendo, a modo de ejemplo ilustrativo, afinidad por el receptor de FcRn, inmunogenicidad del mAb, el grado de glicosilación del mAb, la susceptibilidad del mAb a la proteólisis, y eliminación mediada por receptor.

B.11 Patrón de reactividad cruzada tisular en humanos y especies tox:

Los patrones de tinción idénticos sugieren que la potencial toxicidad humana puede ser evaluada en especies tox. Las especies tox son aquellos animales en los cuales se estudia la toxicidad no relacionada.

Los anticuerpos individuales se seleccionan para cumplir con dos criterios. (1) Tinción de tejido apropiada para la expresión conocida del blanco del anticuerpo. (2) Patrón de tinción similar entre tejidos humanos y de especies tox del mismo órgano.

Criterio 1: Inmunizaciones y/o selecciones de anticuerpo generalmente emplean antígenos recombinantes o sintetizados (proteínas, hidratos de

carbono u otras moléculas). La unión a su contraparte natural y contraselección contra antígenos no relacionados son frecuentemente parte del embudo del tamizaje para anticuerpos terapéuticos. Sin embargo, la selección contra una multitud de antígenos es generalmente poco práctica. Por lo tanto los estudios de reactividad cruzada de tejido con tejidos humanos de todos los órganos mayores sirven para descartar la unión no deseada del anticuerpo a cualquier antígeno no relacionado.

Criterio 2: Estudios de reactividad cruzada de tejido comparativos con tejidos humanos y de especies tox (mono *cynomolgus*, perro, posiblemente roedores y otros, los mismos 36 ó 37 tejidos son ensayados como en el estudio humanos) ayudan para validar la selección de una especie tox. En los estudios típicos de reactividad cruzada de tejido en secciones de tejidos congelados los anticuerpos terapéuticos pueden demostrar la unión esperada al antígeno conocido y/o con un menor grado la unión a tejidos en base a interacciones de nivel bajo (unión inespecífica, unión con bajo nivel a antígenos similares, interacciones basadas en cargas de bajo nivel, etc.). En cualquier caso la especie toxicológica animal más relevante es la que tiene el mayor grado de coincidencia de unión a tejido humano y animal.

Los estudios de reactividad cruzada de tejido siguen las normas regulatorias apropiadas incluyendo la norma III/5271/94 EC CPMP "Producción y control de calidad de mAbs" y la 1997 US FDA/CBER "Puntos para considerar en la fabricación y ensayo de productos de anticuerpos monoclonales para uso humano". Se fijaron criosecciones (5 µm) de tejidos humanos obtenidos por autopsia o biopsia y se secaron sobre portaobjetos. Se realizó la tinción con peroxidasa de las secciones de tejido, usando el sistema

avidina-biotina. Normas de FDA "Puntos para considerar en la fabricación y ensayo de productos de anticuerpos monoclonales para uso humano". Las referencias relevantes incluyen Clarke J 2004, Boon L. 2002a, Boon L 2002b, Ryan A 1999.

Los estudios de reactividad cruzada de tejido son generalmente realizados en dos etapas, en donde la primera etapa incluye criosecciones de 32 tejidos (generalmente: glándula adrenal, tracto gastrointestinal, próstata, vejiga, corazón, músculo esquelético, células sanguíneas, riñón, piel, médula ósea, hígado, médula espinal, mama, pulmón, bazo, cerebelo, ganglio linfático, testículos, corteza cerebral, ovario, timo, colon, páncreas, tiroides, endotelio, paratiroides, uréter, ojo, pituitaria, útero, trompas de Falopio y placenta) de un donante humano. En la segunda fase se realizó un estudio de reactividad cruzada completo con hasta 38 tejidos (incluyendo adrenales, sangre, vasos sanguíneos, médula ósea, cerebelo, cerebro, cérvix, esófago, ojo, corazón, riñón, intestino delgado, hígado, pulmón, ganglio linfático, glándula mamaria, ovario, oviducto, páncreas, paratiroides, nervio periférico, pituitaria, placenta, próstata, glándula salivar, piel, intestino grueso, médula espinal, bazo, estómago, músculo estriado, testículos, timo, tiroides, amígdala, uréter, vejiga urinaria, y útero) de 3 adultos no relacionados. Los estudios se hacen generalmente con dos niveles de dosis como mínimo.

El anticuerpo terapéutico (es decir el artículo en ensayo) y un anticuerpo control con igual isotipo puede ser biotinilado para la detección del complejo avidina-biotina (ABC); otros métodos de detección pueden incluir la detección de un tercer anticuerpo para un artículo de ensayo marcado para FITC (o

similar), o complejación previa con un anti-IgG humana marcado para un artículo de ensayo n o marcado.

Brevemente, las criosecciones (aproximadamente 5 µm) de tejidos humanos obtenidos por autopsia o biopsia se fijaron y se secaron sobre portaobjetos. Se realizó la tinción con peroxidasa de las secciones de tejido, usando el sistema avidina-biotina. Primero (en caso de un sistema de detección de complejación previa), el artículo ensayo se incuba con el anti-IgG humana secundario biotinilado y se convierte en un complejo inmune. Se agrega el complejo inmune con concentraciones finales de entre 2 y 10 µg/mL del artículo ensayo sobre secciones de tejido sobre un portaobjeto y luego se hacen reaccionar las secciones de tejido durante 30 minutos con un conjunto de elementos de avidina-biotina-peroxidasa. Posteriormente, se aplica DAB (3,3'-diaminobencidina), un sustrato para la reacción de la peroxidasa, durante 4 minutos para la tinción del tejido. Se usan esferas de antígeno-Sefarosa como control positivo de secciones de tejido.

Cualquier tinción específica se juzga como una reactividad esperada (por ejemplo, consistente con la expresión del antígeno) o no esperada en base a la expresión conocida del antígeno blanco en cuestión. Cualquier tinción juzgada como específica se califica de acuerdo a la intensidad y frecuencia. Los estudios de competición de antígeno suero de bloqueo pueden ayudar adicionalmente en la determinación de si la tinción observada es específica o inespecífica.

Si se encuentra que dos anticuerpos seleccionados cumplen con los criterios de selección -tinción apropiada de tejido, coincidencia de tinción entre

tejido específico humano y animal toxicológico-, pueden ser seleccionados para la generación de DVD-Ig.

El estudio de reactividad cruzada de tejido tiene que ser repetido con la construcción de DVD-Ig final, pero mientras estos estudios siguen el mismo protocolo tal como se describe en la presente documentación, son más complejos de evaluar debido a que cualquier unión puede provenir de cualquier anticuerpo parental, y cualquier unión no explicada necesita ser confirmada por estudios complejos de competición de antígeno.

Resulta fácilmente evidente que el complejo emprendimiento de los estudios de reactividad cruzada de tejido con una molécula multiespecífica como una DVD-Ig es simplificado en gran medida si los dos anticuerpos parentales son seleccionados para (1) carecer del hallazgo de reactividad cruzada de tejido no esperada y (2) apropiada similitud de hallazgo de reactividad cruzada de tejido entre los correspondientes tejidos humano y especies toxicológicas.

B.12 Especificidad y selectividad:

Para generar una molécula DVD-Ig con la especificidad y selectividad deseadas, uno necesita generar y seleccionar mAbs parentales con el perfil de especificidad y selectividad similarmente deseado.

Los estudios de unión para la especificidad y selectividad con una DVD-Ig pueden ser complejos debido a los cuatro más sitios de unión, dos para cada antígeno. Brevemente, los estudios de unión usando ELISA, BIAcore. KinExA u otro estudio de interacción con una DVD-Ig necesita monitorear la unión de uno, dos o más antígenos a la molécula de DVD-Ig. Mientras que la tecnología BIAcore puede resolver la unión independiente, secuencial, de múltiples

antígenos, los métodos más tradicionales que incluyen ELISA o técnicas más modernas como KinExA, no pueden. Por lo tanto la caracterización cuidadosa de cada anticuerpo parental es crítica. Luego de que cada anticuerpo individual ha sido caracterizado para la especificidad, la confirmación de retención de especificidad de los sitios de unión individuales en la molécula DVD-Ig se simplifica en gran medida.

Resulta fácilmente evidente que la compleja tarea de determinar la especificidad de una DVD-Ig se simplifica en gran medida si los dos anticuerpos parentales se seleccionan según la especificidad antes de ser combinados en una DVD-Ig.

Los estudios de interacción antígeno-anticuerpo pueden tomar muchas formas, incluyendo muchos estudios de interacción clásicos proteína-proteína, incluyendo ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), espectroscopia de masa, entrecruzamiento químico, SEC con dispersión de luz, diálisis en equilibrio, permeación en gel, ultrafiltración, cromatografía en gel, SEC analítico en zona amplia, ultracentrifugación micropreparativa (equilibrio de sedimentación), métodos espectroscópicos, microcalorimetría de titulación, equilibrio de sedimentación (en ultracentrífuga analítica), velocidad de sedimentación (en centrífuga analítica), resonancia de plasmón superficial (incluyendo BIAcore). Las referencias relevantes incluyen "Current Protocols in Protein Science", John E. Coligan, Ben M. Dunn, David W. Speicher, Paul T, Wingfield (eds.) Volumen 3, capítulos 19 y 20, publicado por John Wiley & Sons Inc., y las referencias incluidas en ella y "Current Protocols in Immunology", John E. Coligan, Barbara E. Bierer, David H. Margulies, Ethan M. Shevach,

Warren Strober (eds.) publicado por John Wiley & Sons Inc y referencias relevantes incluidas en ella.

Liberación de citoquina en sangre entera: la interacción de mAb con células de sangre humana se puede investigar por medio de un ensayo de liberación de citoquina (Wing, M. G. Therapeutic Immunology (1995), 2(4), 183-190; "Current Protocols in Pharmacology", S.J. Enna, Michael Williams, John W. Ferkany, Terry Kenakin, Paul Moser, (eds.) publicado por John Wiley & Sons Inc; Madhusudan, S. Clinical Cancer Research (2004), 10(19), 6528-6534; Cox, J. Methods (2006), 38(4), 274-282; Choi, I. European Journal of Immunology (2001), 31(1), 94-106). Brevemente, se incuban diferentes concentraciones de mAb con sangre entera durante 24 horas. La concentración ensayada debe cubrir un gran rango incluyendo las concentraciones finales que simulan los niveles típicos en sangre en pacientes (incluyendo a modo de ejemplo ilustrativo, entre 100 ng/ml y 100µg/ml). Luego de la incubación, se analizaron los sobrenadantes y lisados celulares para estudiar la presencia de IL-1Rα, TNF-α, IL-1b, IL-6 e IL-8. Los perfiles de concentración de citoquina generados por mAb se compararon con los perfiles producidos por una IgG humana control negativo y un LPS o PHA control positivo. El perfil de citoquina mostrado por mAb tanto en los sobrenadantes como en los lisados celulares fue comparable con la IgG humana control. En una forma de realización, el anticuerpo monoclonal no interacciona con las células sanguíneas humanas para liberar espontáneamente citoquinas inflamatorias.

Los estudios de liberación de citoquina para una DVD-Ig son complejos debido a los cuatro más sitios de unión, dos de cada uno para cada antígeno. Brevemente, los estudios de liberación de citoquinas descritos en la presente

documentación miden el efecto de la molécula DVD-Ig completa sobre la sangre entera u otros sistemas celulares, pero pueden resolver cual porción de la molécula provoca la liberación de citoquinas. Una vez que se ha detectado la liberación de citoquinas, la pureza de la preparación de DVD-Ig tiene que ser determinada, dado que algunos componentes celulares que copurifican pueden causar la liberación de citoquinas por sí solas. Si la pureza no es una cuestión, se puede necesitar el empleo de la fragmentación de DVD-Ig (incluyendo a modo de ejemplo ilustrativo la eliminación de la porción Fc, separación de los sitios de unión, etc.), mutagénesis del sitio de unión u otros métodos para descifrar cualquier observación. Resulta fácilmente evidente que esta compleja tarea se simplifica en gran medida si los dos anticuerpos parentales se seleccionan para que carezcan de liberación de citoquina antes de ser combinados en una DVD-Ig.

B.13 Reactividad cruzada con otras especies para estudios toxicológicos:

En una forma de realización, los anticuerpos individuales se seleccionaron con suficiente reactividad cruzada por especies tox apropiadas, por ejemplo, mono *cynomolgus*. Los anticuerpos parentales necesitan unirse a blancos de especies ortólogas (es decir mono *cynomolgus*) y mostrar una respuesta apropiada (modulación, neutralización, activación). En una forma de realización, la reactividad cruzada (afinidad/potencia) por blancos de especies ortólogas deben ser 10 veces la del blanco humano. En la práctica, los anticuerpos parentales se evalúan para múltiples especies, incluyendo ratón, rata, perro, mono (y otros primates no humanos), así como especies modelo de enfermedades (es decir oveja para modelo de asma). La reactividad cruzada

aceptable para especies tox de los anticuerpos monoclonales parentales permite estudios toxicológicos futuros de DVD-Ig-Ig en las mismas especies. Por esa razón, los dos anticuerpos monoclonales parentales deben tener reactividad cruzada aceptable para especies tox comunes permitiendo por lo tanto los estudios toxicológicos de DVD-Ig en las mismas especies.

Los mAbs parentales se pueden seleccionar entre diferentes mAbs con capacidad de de unir blancos específicos y bien conocidos en la arte. Estos incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, anticuerpo anti-TNF (Patente de los EE.UU. No. 6.258.562), anticuerpo anti-IL-12 y/o anti-IL-12p40 (Patente de los EE.UU. No. 6.914.128); anticuerpo anti-IL-18 (EE.UU. 2005/0147610 A1), anti-C5, anti-CBL, anti-CD147, anti-gp120, anti-VLA-4, anti-CD11a, anti-CD18, anti-VEGF, anti-CD40L, anti CD-40 (por ejemplo, véase WO2007124299) anti-Id, anti-ICAM-1, anti-CXCL13, anti-CD2, anti-EGFR, anti-TGF-beta 2, anti-HGF, anti-cMet, anti DLL-4, anti-NPR1, anti-PLGF, anti-ErbB3, anti-E-selectina, anti-Fact VII, anti-Her2/neu, anti-F gp, anti-CD11/18, anti-CD14, anti-ICAM-3, anti-RON, anti CD-19, anti-CD80 (por ejemplo, véase WO2003039486, anti-CD4, anti-CD3, anti-CD23, anti-beta2-integrina, anti-alfa4beta7, anti-CD52, anti-HLA DR, anti-CD22 (por ejemplo, véase la Patente de los EE.UU. 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-integrina VNR, anti-IL-1alfa, anti-IL-1beta, anti-receptor de IL-1, anti-receptor de IL-2, anti-IL-4, anti-receptor de IL-4, anti-IL5, anti-receptor de IL-5, anti-IL-6, anti-IL-6R, RANKL, NGF, DKK, alfaVbeta3, IL-17A, anti-IL-8, anti-IL-9, anti-IL-13, anti-receptor de IL-13, anti-IL-17, y anti-IL-23; IL-23p19; (véase Presta LG. 2005 Selection,

design, y engineering of therapeutic antibodies J Allergy Clin Immunol. 116:731-6 y http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/antibodies.html).

Los mAbs parentales también se pueden seleccionar entre diferentes anticuerpos terapéuticos aprobados para el uso, en ensayos clínicos, o en desarrollo para el uso clínico. Dichos anticuerpos terapéuticos incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, rituximab (Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche) (véase por ejemplo Patente de los EE.UU. No. 5.736.137), un anticuerpo anti-CD20 quimérico aprobado para tratar linfoma no hodgkiniano; HuMax-CD20, un anti-CD20 actualmente en desarrollo por Genmab, un anticuerpo anti-CD20 descrito en la Patente de los EE.UU. No. 5.500.362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel), y PRO70769 (PCT/US2003/040426, titulado "Variantes de Inmunoglobulinas y Usos de las mismas"), trastuzumab (Herceptin®, Genentech) (véase por ejemplo Patente de los EE.UU. No.5.677.171), un anticuerpo anti- Her2/neu humanizado aprobado para tratar cáncer de mamas; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg®), actualmente en desarrollo por Genentech; un anticuerpo anti-Her2 descrito en la Patente de los EE.UU. No. 4.753.894; cetuximab (Erbitux®, Imclone) (Patente de los EE.UU. No. 4.943.533; PCT WO 96/40210), un anticuerpo anti-EGFR quimérico en ensayo clínicos para una variedad de cánceres; ABX-EGF (Patente de los EE.UU. No. 6.235.883), actualmente en desarrollo por Abgenix-Immunex-Amgen; HuMax- EGFr (Solicitud de los EE.UU. No. de Acta 10/172.317), actualmente en desarrollo por Genmab; 425, EMD55900, EMD62000, y EMD72000 (Merck KGaA) (Patente de los EE.UU. No. 5.558.864; Murthy et al. 1987, Arch Biochem Biophys. 252(2):549-60; Rodeck et al., 1987, J Cell Biochem. 35(4):315-20;

Kettleborough et al., 1991, Protein Eng. 4(7):773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (PCT WO 95/20045; Modjtahedi et al., 1993, J. Cell Biophys. 1993, 22(1-3):129-46; Modjtahedi et al., 1993, Br J Cancer. 1993, 67(2):247-53; Modjtahedi et al, 1996, Br J Cancer, 73(2):228-35; Modjtahedi et al, 2003, Int J Cancer, 105(2):273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canada y Centro de Inmunología Molecular, Cuba (Patente de los EE.UU. No. 5.891.996; Patente de los EE.UU. No. 6.506.883; Mateo et al, 1997, Immunotechnology, 3(1):71-81); mAb-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci USA. 100(2):639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (PCT WO 0162931A2); y SC100 (Scancell) (PCT WO 01/88138); alemtuzumab (Campath®, Millenium), un mAb humanizado actualmente aprobado para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de 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 con anti-LFA-3 desarrollado 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 desarrollado por Abbott, Humicade®, un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Celltech, golimumab (CNTO-148), un anticuerpo contra TBF completamente humano desarrollado por Centocor, etanercept

(Enbrel®), una fusión de Fc con el receptor de TNF p75 desarrollado por Immunex/Amgen, lenercept, una fusión de Fc con el receptor de TNF p55 previamente desarrollado por Roche, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD147 en desarrollo por Abgenix, ABX-IL8, un anticuerpo anti-IL8 en desarrollo por Abgenix, ABX-MA1, un anticuerpo anti-MUC18 en desarrollo por Abgenix, Pemtumomab (R1549, 90Y-muHMFG1), un anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, Therex (R1550), un anticuerpo anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, AngioMab (AS1405), en desarrollo por Antisoma, HuBC-1, en desarrollo por Antisoma, Thioplatin (AS1407) en desarrollo por Antisoma, Antegren® (natalizumab), un anticuerpo anti-alfa-4-beta-1 (VLA-4) y alfa-4-beta-7 en desarrollo por Biogen, VLA-1 mAb, un anticuerpo anti- integrina VLA-1 en desarrollo por Biogen, LTBR mAb, un anticuerpo anti-receptor beta de linfotoxina (LTBR) en desarrollo por Biogen, CAT-152, un anticuerpo anti-TGF-β2 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology, ABT 874 (J695), un anticuerpo anti-IL-12 p40 en desarrollo por Abbott, CAT-192, un anticuerpo anti-TGFβ1 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology y Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxin1 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B® un anticuerpo anti-Blys en desarrollo por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences Inc., TRAIL-R1mAb, un anticuerpo anti-TRAIL-R1 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences, Inc., Avastin® bevacizumab, rhuMAb-VEGF), un anticuerpo anti-VEGF en desarrollo por Genentech, un anticuerpo anti-familia de receptor de HER en desarrollo por Genentech, anti-factor tisular (ATF), un anticuerpo anti-factor tisular en desarrollo por Genentech, Xolair® (Omalizumab), un anticuerpo anti-IgE en desarrollo por

Genentech, Raptiva® (Efalizumab), un anticuerpo anti- CD11a en desarrollo por Genentech y Xoma, anticuerpo MLN-02 (antiguamente LDP-02), en desarrollo por Genentech y Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, un anticuerpo anti-CD4 en desarrollo por Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 en desarrollo por Genmab y Amgen, HuMax-Inflam, en desarrollo por Genmab y Medarex, HuMax-Cancer, un anticuerpo anti-Heparanasa I en desarrollo por Genmab y Medarex y Oxford GcoSciences, HuMax-Lymphoma, en desarrollo por Genmab y Amgen, HuMax-TAC, en desarrollo por Genmab, IDEC-131, y anticuerpo anti-CD40L en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (Clenoliximab), un anticuerpo anti-CD4 en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, un anticuerpo anti-CD80 en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, un anti-CD23 en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos anti-factor de migración de macrófagos (MIF) en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, BEC2, un anticuerpo anti-idiotipo en desarrollo por Imclone, IMC-1C11, un anticuerpo anti-KDR en desarrollo por Imclone, DC101, un anticuerpo anti-flk-1 en desarrollo por Imclone, anticuerpos anti-VE caderina en desarrollo por Imclone, CEA-Cide® (labetuzumab), un anticuerpo anti-antígeno carcinoembriónico (CEA) en desarrollo por Immunomedics, LymphoCide® (Epratuzumab), un anticuerpo anti-CD22 en desarrollo por Immunomedics, AFP-Cide, en desarrollo por Immunomedics, MyelomaCide, en desarrollo por Immunomedics, LkoCide, en desarrollo por Immunomedics, ProstaCide, en desarrollo por Immunomedics, MDX-010, un anticuerpo anti-CTLA4 en desarrollo por Medarex, MDX-060, un anticuerpo anti-CD30 en desarrollo por Medarex, MDX-070 en desarrollo por Medarex, MDX-018 en desarrollo por Medarex, Osidem® (IDM-1), y anticuerpo

anti-Her2 en desarrollo por Medarex y Immuno-Designed Molecules, HuMax®-CD4, un anticuerpo anti-CD4 en desarrollo por Medarex y Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 en desarrollo por Medarex y Genmab, CNTO 148, un anticuerpo anti-TNFα en desarrollo por Medarex y Centocor/J&J, CNTO 1275, un anticuerpo anti-citoquina en desarrollo por Centocor/J&J, MOR101 y MOR102, anticuerpos anti-molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (CD54) en desarrollo por MorphoSys, MOR201, un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento fibroblástico 3 (FGFR-3) en desarrollo por MorphoSys, Nuvion® (visilizumab), un anticuerpo anti-CD3 en desarrollo por Protein Design Labs, HuZAF®, un anticuerpo anti-interferón gamma en desarrollo por Protein Design Labs, Anti-integrina α 5β1, en desarrollo por Protein Design Labs, anti-IL-12, en desarrollo por Protein Design Labs, ING-1, un anticuerpo anti-Ep-CAM en desarrollo por Xoma, Xolair® (Omalizumab) un anticuerpo humanizado anti-IgE desarrollado por Genentech y Novartis, y MLN01, un anticuerpo anti- integrina Beta2 en desarrollo por Xoma. En otra forma de realización, 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 (epitopr glicosilado de células B, NCI); BiTE MT103 (biespecífico CD19 x CD3, Medimmune); 4G7xH22 (biespecífico célula BxFcgammaR1, Medarex/Merck KGa); rM28 (biespecífico CD28 x MAPG, Patente de los EE.UU. No. EP1444268); MDX447 (EMD 82633) (biespecífico CD64 x EGFR, Medarex); Catumaxomab (removab) (biespecífico EpCAM x anti-CD3, Trion/Fres); Ertumaxomab (biespecífico HER2/CD3, Fresenius Biotech); oregovomab (OvaRex) (CA-125,

ViRexx); Rencarex® (WX G250) (anhidrasa carbónica IX, Wilex); CNTO 888 (CCL2, Centocor); TRC105 (CD105 (endoglina), Tracon); BMS-663513 (agonista CD137, Brystol Myers Squibb); MDX-1342 (CD19, Medarex); Siplizumab (MEDI-507) (CD2, Medimmune); Ofatumumab (Humax-CD20) (CD20, Genmab); Rituximab (Rituxan) (CD20, Genentech); veltuzumab (hA20) (CD20, Immunomedics); Epratuzumab (CD22, Amgen); lumiliximab (IDEC 152) (CD23, Biogen); muromonab-CD3 (CD3, Ortho); HuM291 (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); Campath1h (Alemtuzumab) (CD52, Genzyme); MDX-1411 (CD70, Medarex); hLL1 (EPB-1) (CD74.38, Immunomedics); Galiximab (IDEC-144) (CD80, Biogen); MT293 (TRC093/D93) (colágeno clivado, Tracon); HuLuc63 (CS1, PDL Pharma); ipilimumab (MDX-010) (CTLA4, Brystol Myers Squibb); Tremelimumab (Ticilimumab, CP-675,2) (CTLA4, Pfizer); HGS-ETR1 (Mapatumumab) (agonista DR4 TRAIL-R1, Human Genome Science /Glaxo Smith Kline); AMG-655 (DR5, Amgen); Apomab (DR5, Genentech); CS-1008 (DR5, Daiichi Sankyo); HGS-ETR2 (lexatumumab) (agonista DR5 TRAIL-R2, HGS); Cetuximab (Erbitux) (EGFR, Imclone); IMC-11F8, (EGFR, Imclone); Nimotuzumab (EGFR, YM Bio); Panitumumab (Vectabix) (EGFR, Amgen); Zalutumumab (HuMaxEGFr) (EGFR, Genmab); CDX-110 (EGFRvIII, AVANT Immunotherapeutics); adecatumumab (MT201) (Epcam , Merck); edrecolomab (Panorex, 17-1A) (Epcam , Glaxo/Centocor); MORAb-003 (receptor a de folato, Morphotech); KW-2871 (ganglиósido GD3, Kyowa); MORAb-009 (GP-9,

Morphotech); CDX-1307 (MDX-1307) (hCGb, Celldex); Trastuzumab (Herceptin) (HER2, Celldex); Pertuzumab (rhuMAb 2C4) (HER2 (DI), Genentech); apolizumab (cadena beta HLA-DR, PDL Pharma); AMG-479 (IGF-1R, Amgen); anti-IGF-1R R1507 (IGF1-O, Roche); CP 751871 (IGF1-O, Pfizer); IMC-A12 (IGF1-O, Imclone); BIIB022 (IGF-1R , Biogen); Mik-beta-1 (IL-2Rb (CD122), Hoffman LaRoche); CNTO 328 (IL6, Centocor); Anti-KIR (1-7F9) (Receptor similar a Ig de célula asesina (KIR), Novo); Hu3S193 (Lewis (y), Wyeth, Ludwig Institute of Cancer Research); hCBE-11 (LTßR, Biogen); HuHMFG1 (MUC1, Antisoma/NCI); RAV12 (epitope carbohidrato unido a N, Raven); CAL (proteína relacionada con la hormona paratiroides (PTH-rP), University of California); CT-011 (PD1, CureTech); MDX-1106 (ono-4538) (PD1, Medarex/Ono); MAb CT-011 (PD1, Curetech); IMC-3G3 (PDGFRa, Imclone); bavituximab (fosfatidilserina, Peregrine); huJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); muJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); GC1008 ((pan) inhibidor TGFb (IgG4), Genzyme); Infliximab (Remicade) (TNFa, Centocor); A27.15 (receptor de transferrina, Salk Institute, INSERN WO 2005/111082); E2.3 (receptor de transferrina, Salk Institute); Bevacizumab (Avastin) (VEGF, Genentech); HuMV833 (VEGF, Tsukuba Research Lab-WO/2000/034337, University of Texas); IMC-18F1 (VEGFR1, Imclone); IMC-1121 (VEGFR2, Imclone).

B. Construcción de moléculas DVD:

La molécula de Inmunoglobulina con Dominio Variable Dual (DVD-Ig) se diseña de tal modo que se asocian en tándem dos dominios variables de cadena liviana (VL) diferentes provenientes de los dos anticuerpos monoclonales parentales diferentes en forma directa o a través de un conector

corto mediante técnicas de ADN recombinante, seguidos por el dominio constante de cadena liviana. En forma similar, la cadena pesada comprende dos dominios variables de cadena pesada (VH) diferentes asociados en tándem, seguidos por el domino constante de CH1 y la región Fc (**Fig.1A**).

Los dominios variables se pueden obtener usando técnicas de ADN recombinante a partir de un anticuerpo parental que se genera por alguno de los métodos que se describen en la presente documentación. En una forma de realización, el domino variable es un domino variable murino de cadena pesada o liviana. En otra forma de realización, el domino variable es un dominio variable de cadena pesada o liviana con CDR injertada o humanizado. En una forma de realización, el domino variable es un domino variable humano de cadena pesada o liviana.

En una forma de realización el primero y segundo dominios variables se asocian directamente entre ellos usando técnicas de ADN recombinante. En otra forma de realización, los dominios variables se asocian a través de una secuencia conectora. En una forma de realización, se asocian dos dominios variables. También se pueden asociar tres o más dominios variables en forma directa o a través de una secuencia conectora. Los dominios variables pueden unir al mismo antígeno pueden unir antígenos diferentes. Las moléculas DVD de la invención pueden incluir un domino variable de inmunoglobulina y un domino variable de no inmunoglobulina tal como un dominio de unión a ligando de un receptor, el dominio activo de una enzima. Las moléculas DVD también pueden comprender 2 o más dominios no Ig.

La secuencia conectora puede ser un solo aminoácido una secuencia polipeptídica. En una forma de realización, las secuencias conectoras se eligen

del grupo que consiste en AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID N°: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID N°: 2); AKTTPKLGG (SEQ ID N°: 3); SAKTTPKLGG (SEQ ID N°: 4); SAKTTP (SEQ ID N°: 5); RADAAP (SEQ ID N°: 6); RADAAPTVS (SEQ ID N°: 7); RADAAAAGGPGS (SEQ ID N°: 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEQ ID N°: 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID N°: 10); ADAAP (SEQ ID N°: 11); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID N°: 12); TVAAP (SEQ ID N°: 13); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID N°: 14); QPKAAP (SEQ ID N°: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID N°: 16); AKTTPP (SEQ ID N°: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID N°: 18); AKTTAP (SEQ ID N°: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID N°: 20); ASTKGP (SEQ ID N°: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID N°: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID N°: 23); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID N°: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID N°: 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID N°: 26) , TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 27); y ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 28). La elección de las secuencias conectoras se basa en el análisis de la estructura cristalina de varias moléculas Fab. Existe un acoplamiento flexible natural entre el domino variable y el dominio constante CH1/CL en Fab o en la estructura molecular del anticuerpo. Este acoplamiento natural comprende aproximadamente entre 10 y 12 residuos de aminoácidos, contribuidos por entre 4 y 6 residuos del extremo C terminal del dominio V y entre 4 y 6 residuos del extremo N terminal del domino CL/CH1. Las DVD-Igs de la invención se generaron usando entre 5 y 6 residuos de aminoácidos N terminales, o entre 11 y 12 residuos de aminoácidos, de CL o CH1, como conector en la cadena liviana y cadena pesada de las DVD-Ig, respectivamente. Los residuos N terminales de los

dominios CL o CH1, en particular los primeros 5 a 6 residuos de aminoácidos, adoptan una conformación en bucle sin estructuras secundarias fuertes, y por lo tanto pueden actuar como conectores flexibles entre los dos dominios variables. Los residuos N terminales de los dominios CL ó CH1 son una extensión natural de los dominios variables, ya que son parte de las secuencias de Ig, y por lo tanto minimizan en gran medida cualquier inmunogenicidad potencial que pueda surgir de los conectores y los empalmes.

Otras secuencias conectoras 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 a 12 residuos de aminoácidos de los dominios CL/CH1; los conectores de cadena liviana puede ser de Cκ o Cλ; y los conectores de cadena pesada pueden derivar del CH1 de cualquier isotipo, incluyendo Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cα1, Cα2, Cδ, Cε, y Cμ. Las secuencias conectoras también pueden derivar de otras proteínas tales como proteínas de tipo Ig, (por ejemplo, TCR, FcR, KIR); de secuencias basadas en G/S (por ejemplo, repeticiones G4S) (SEQ ID N°: 29); de secuencias derivadas de la región bisagra; y de otras secuencias naturales de otras proteínas.

En una forma de realización se asocia un dominio constante a los dos dominios variables asociados usando técnicas de ADN recombinante. En una forma de realización, la secuencia que comprende dominios variables asociados de cadena pesada se asocia a un dominio constante de cadena pesada y la secuencia que comprende dominios variables asociados de cadena liviana se asocia a un dominio constante de cadena liviana. En una forma de realización, los dominios constantes son dominio constante de cadena pesada humana y dominio constante de cadena liviana humana, respectivamente. En

una forma de realización, la cadena pesada DVD se asocia además a una región Fc. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa, o una región Fc variante. En otra forma de realización, la región Fc es una región Fc humana. En otra forma de realización la región Fc incluye una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, o IgD.

En otra forma de realización se combinan dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena liviana para formar una molécula DVD-Ig. La tabla 2 lista las secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de anticuerpos ejemplificativos para objetivos útiles en el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, para tratar cáncer. En una forma de realización, la invención provee una DVD que comprende al menos dos de las regiones VH y/o VL que se listan en la Tabla 2, en cualquier orientación.

Tabla 2: Listado de secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de Anticuerpos para generar DVD-Igs

SEQ ID N°:	ID única de ABT	Región proteica	secuencia 123456789012345678901234567890123456789
30	AB017VH	VHTNF (seq. 1)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSS
31	AB017VL	VLTNF (seq. 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKR
32	AB020VH	VH NGF	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID N°:	ID única de ABT	Región proteica	secuencia 123456789012345678901234567890123456789
33	AB020VL	VL NGF	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKR
34	AB022VH	VH SOST	EVQLQQSGPELVTPGASVKISCKASGYTFTDHYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYSGETTYNQKFKGTATLTVDKSSSIAYMEIRGLTSEDSAVYYCARDDYDASPFAYWGQGTLVTVSA
35	AB022VH	VL SOST	DVQMIQSPSSLSASLGDIVTMTCQASQGTSINLNWFQQKPGKAPKLLIYGSSNLEDGVPSRFSGSRYGTDFTLTISSLEDEDLATYFCLQHSYLPYTFGGGTKLEIKR
36	AB048VH	VH PGE2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTKYWLGWVRQAPGQGLEWMGDIYPGYDYTHYNEKFKDRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDGSSTYWGQGTLVTVSS
37	AB048VL	VL PGE2	DVLMTQTPLSLPVTPGEPASISCTSSQNIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGGGTKVEIKR
38	AB213VH	VH TNF (seq. 2)	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTDYGVNWVRQPPGKGLEWLGMIWGDGSTDYDSTLKSRLSISKDNSKSQIFLKMNSLQTDDTARYYCAREWHHGPVAYWGQGTLVTVSA
39	AB213VL	VL TNF (seq. 2)	DIVMTQSHKFMSTTVGDRVSITCKASQAVSSAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSVTDFTLTIHNLQAEDLALYYCQQHYSTPFTFGSGTKLEIKR
40	AB214VH	VH TNF (seq. 3)	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLQMTDLRTEDTGVYYCSRNYYGSTYDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID N°:	ID única de ABT	Región proteica	secuencia 12345678901234567890123456789012345678901234567890
41	AB214VL	VL TNF (seq. 3)	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQFVGSSIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESMSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQESHSWPFTFGSGTNLEVKR
42	AB215VH	VH TNF (seq. 4)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGNGLEWVAFMSYDGSNKYAKDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
43	AB215VL	VL TNF (seq. 4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKR
44	AB216VH	VH LPA	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYGFINYLIEWIKQRPGQGLEWIGLINPGSDYTNYNENFKGKATLTADKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYGSGNYFDYWGQGTTLTVSS
45	AB216VL	VL LPA	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSGQSLVHINGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNLFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGTGTKLEIKR
46	AB217VH	VH TNF (seq. 5)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWSDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVESAMGGFYYNGMDVWGQGTTVTVSS
47	AB217VL	VL TNF (seq. 5)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRIDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFIFTISSLQPEDFASYYCLQHKSYPLTFGGGTKVEIKR
48	AB218VH	VH TNF (seq. 6)	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSRNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGDRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEGGFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID N°:	ID única de ABT	Región proteica	secuencia 12345678901234567890123456789012345678901234567890
49	AB218VL	VL TNF (seq. 6)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIHGASIRATGLPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNYWWTFGQGTKVEIKR

La descripción detallada de las moléculas de DVD-Ig específicas capaces de unirse a blancos de unión específicos, y los métodos para prepararlas, se proveerá en la sección de Ejemplos más adelante.

C. Producción de proteínas con DVD

Las proteínas de unión de la presente invención pueden producirse con cualquiera de una cantidad de procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión puede efectuarse a partir de células huésped en las cuales se han transfectado uno más vectores de expresión que codifican las cadenas DVD pesada y liviana de acuerdo con procedimientos convencionales. Las diversas formas del término "transfección" abarcan una amplia variedad de procedimientos de uso común para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y semejantes. Aunque es posible expresar las proteínas DVD de la invención en células huésped procariotas o eucariotas, las proteínas DVD se expresan en células eucariotas, por ejemplo, en células huésped de mamíferos, ya que la probabilidad de que se ensamble y se secrete una proteína DVD plegada correctamente y con actividad inmunológica es mayor en dichas células

eucariotas (y en particular, en células de mamíferos) que en las células eucariotas.

Las células huésped de mamíferos que sirven de ejemplo para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células CHO (incluyendo las células CHO dhfr$^-$ descriptas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, que se usan en combinación con un marcador de selección DHFR, como se describe, por ejemplo, en O.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2 y PER.C6. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican proteínas con DVD en células huésped de mamíferos, las proteínas con DVD se producen cultivando las células huésped por un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de las proteínas con DVD en las células huésped o la secreción de las proteínas con DVD en el medio de cultivo donde se están desarrollando las células huésped. Las proteínas con DVD pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

En un ejemplo de un sistema para la expresión recombinante de las proteínas con DVD de la invención, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica la cadena pesada con DVD y la cadena liviana con DVD en células CHO dhfr- por medio de una transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y liviana de DVD están unidos operativamente en cada caso a elementos reguladores, que consisten en el potenciador de CMV y el promotor AdMLP, con el fin de obtener niveles de transcripción elevados de los genes. El vector de expresión recombinante también contiene un gen DHFR, que permite

seleccionar las células CHO dhfr⁻ transfectadas con el vector usando una selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformadas seleccionadas se cultivan de modo que se expresen las cadenas pesada y liviana de DVD, y la proteína DVD intacta se aísla del medio de cultivo. Se usan técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar las transformantes, cultivar dichas células huésped y obtener la proteína DVD del medio de cultivo. Adicionalmente, en la invención se provee un método para sintetizar una proteína DVD de la invención, que comprende cultivar una célula huésped de la invención en un medio de cultivo apropiado hasta que se ha sintetizado una proteína DVD de la invención. Además, el método puede comprender aislar dicha proteína DVD del medio de cultivo.

Una característica importante de la DVD-Ig es que puede ser producida y purificada de una manera similar que un anticuerpo convencional. La producción de la DVD-Ig resulta en un solo producto de importancia homogéneo con la actividad con especificidad dual deseada, sin modificaciones de secuencia en la región constante o modificaciones químicas de ningún tipo. Otros métodos descriptos con anterioridad para generar proteínas de unión completas "biespecíficas", "multiespecíficas" y "multiespecíficas multivalentes" no resultan en un solo producto primario, sino que resultan en la producción intracelular o por secreción de una mezcla de proteínas de unión monoespecíficas, multiespecíficas o multivalentes completas, y proteínas de unión multivalentes completas con combinaciones de distintos sitios de unión. A modo de ejemplo, sobre la base del diseño descripto por Miller y Presta (Publicación PCT WO2001/077342(A1), hay 16 combinaciones posibles de

cadenas pesadas y livianas. Por lo tanto, solamente 6,25% de las proteínas han de presentar la forma activa deseada, y no ha de haber un solo producto de importancia o un solo producto primario, en comparación con las otras 15 combinaciones posibles. Aún no se ha demostrado la separación de las formas completamente activas deseadas de la proteína de las formas inactivas y parcialmente activas usando las técnicas de cromatografía convencionales que típicamente se emplean en la fabricación a gran escala.

Sorprendentemente, el diseño de las "proteínas de unión multivalentes completas con especificidad dual" de la presente invención resulta en una cadena liviana con dominio variable dual y una cadena pesada con dominio variable dual que se ensamblan primariamente para obtener las "proteínas de unión completas multivalentes con especificidad dual" deseadas.

Al menos 50%, al menos 75% y al menos 90% de las moléculas de inmunoglobulinas con dominio variable dual ensambladas y expresadas son la proteína tetravalente con especificidad dual deseada. En particular, este aspecto de la invención permite mejorar la utilidad comercial de la invención. Entonces, en la presente invención se incluye un método para expresar una cadena liviana con dominio variable dual y una cadena pesada con dominio variable dual en una sola célula, lo que resulta en un producto primario de una "proteína de unión tetravalente completa con especificidad dual".

En la presente invención se provee un método para expresar una cadena liviana con dominio variable dual y una cadena pesada con dominio variable dual en una sola célula, lo que resulta en un "producto primario" de una "proteína de unión tetravalente completa con especificidad dual", donde el "producto primario" constituye más de 50% de la totalidad de la proteína

ensamblada, que comprende una cadena liviana con dominio variable dual y una cadena pesada con dominio variable dual.

En la presente invención se proveen métodos para expresar una cadena liviana con dominio variable dual y una cadena pesada con dominio variable dual en una sola célula, lo que resulta en un "producto primario" de una "proteína de unión tetravalente completa con especificidad dual", donde el "producto primario" constituye más de 75% de la totalidad de la proteína ensamblada, que comprende una cadena liviana con dominio variable dual y una cadena pesada con dominio variable dual.

En la presente invención se proveen métodos para expresar una cadena liviana con dominio variable dual y una cadena pesada con dominio variable dual en una sola célula, lo que resulta en un "producto primario" de una "proteína de unión tetravalente completa con especificidad dual", donde el "producto primario" constituye más de 90% de la totalidad de la proteína ensamblada, que comprende una cadena liviana con dominio variable dual y una cadena pesada con dominio variable dual.

II. Proteínas de unión con DVD derivatizadas

En una forma de realización, se provee una proteína de unión marcada donde la proteína de unión de la invención ha sido derivatizado unido a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido proteína). Por ejemplo, una proteína de unión de la invención marcada puede obtenerse mediante la unión funcional de una proteína de unión de la invención (por medio de una unión química, una fusión genética, una asociación no covalente, u otros medios) a una o más entidades moleculares diferentes, tales comotro anticuerpo (por

ejemplo, un anticuerpo biespecífico un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o un péptido que puedan mediar en la asociación de la proteína de unión con otra molécula (tal como la región nuclear de la estreptavidina o una marca de polihistidina).

Entre los agentes detectables útiles con los cuales puede derivatizarse una proteína de unión de la invención, se incluyen los compuestos fluorescentes. Entre los ejemplos de agentes fluorescentes detectables se incluyen la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, el cloruro de 5-dimetilamina-1-napfalensulfonilo, la ficoeritrina, y semejantes. Una proteína de unión también puede derivatizarse con enzimas detectables, tales como la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano picante, la glucosa oxidasa, y semejantes. Cuando una proteína de unión se derivatiza con una enzima detectable, es detectado mediante el agregado de reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina resulta en un producto de reacción coloreado que puede ser detectado. Una proteína de unión también puede derivatizarse con biotina y detectarse mediante la medición indirecta de la unión a avidina o estreptavidina.

En otra forma de realización de la invención, se provee una proteína de unión cristalizada, y formulaciones y composiciones que comprenden estos cristales. En una forma de realización, las proteínas de unión cristalizadas tienen una vida media *in vivo* más larga que la contraparte soluble de la proteína de unión. En otra forma de realización, la proteína de unión conserva su actividad biológica después de la cristalización.

La proteína de unión cristalizada de la invención puede producirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, y tal como se describe en WO 02072636.

En forma de realización de la invención, se provee una proteína de unión glicosilada, donde el anticuerpo la porción de unión al antígeno de éste comprenden uno más residuos de hidrato de carbono. La producción nativa de proteínas *in vivo* puede incluir un procesamiento adicional, conocido como modificación postraduccional. En particular, pueden agregarse residuos de azúcares (glicosilo) en forma enzimática, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes, que contienen cadenas laterales de oligosacáridos unidas en forma covalente, son conocidas como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno más residuos de hidrato de carbono en el dominio Fc, así como en el dominio variable. Los residuos de hidrato de carbono en el dominio Fc tienen un efecto importante en la función efectora del dominio Fc, con un efecto menor en la unión al antígeno la vida media del anticuerpo (O. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* **21** (2005), páginas 11–16). «Por el contrario, la glicosilación del dominio variable puede tener efecto sobre la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debido a impedimento estérico (Co, M.S., *et al.*, *Mol. Inmunol.* (1993) 30:13611367), o puede dar como resultado una afinidad aumentada por el antígeno (Wallick, S.C., *et al.*, *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., *et al.*, *EMBO J.* (1991) 10:2717 2723).

Un aspecto de la presente invención se relaciona con la generación de mutantes de sitios de glicosilación en las cuales se ha mutado el sitio de

glicosilación unido a O N de la proteína de unión. Aquél versado en la técnica puede generar dichos mutantes con el uso de tecnologías convencionales bien conocidas. Los mutantes de sitios de glicosilación que retienen la actividad biológica, pero presentan una actividad de unión incrementada o disminuida, son otrobjeto de la presente invención.

En aún otra forma de realización, se modifica la glicosilación del anticuerpo la porción de unión al antígeno de la invención. Por ejemplo, es posible generar un anticuerpo no glicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse, por ejemplo, para incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones del hidrato de carbono pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la alteración de uno más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno más sitios de glicosilación en la región variable, para eliminar de este modo la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Este abordaje se describe con mayor detalle en la Publicación PCT WO2003016466A2 y las Patentes de los EEUU N° 5714350 y 6350861.

Adicionalmente o como alternativa, puede prepararse una proteína de unión modificada de la invención que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo (véase Kanda, Yutaka et al., Journal of Biotechnology (2007), 130(3), 300-310) o un anticuerpo que tiene más estructuras de GlcNAc cruzadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterados incrementan la capacidad de los anticuerpos de producir ADCC. Dichas

modificaciones de los hidratos de carbono pueden efectuarse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descripto células con la maquinaria de glicosilación alterada, que pueden ser usadas como células huésped para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención, y de este modo, producir un anticuerpo con glicosilación alterada. Véanse, por ejemplo, Shields, O. L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Umana *et al.* (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, así como la Patente Europea N° EP 1176195; las Publicaciones PCT WO 03/035835 y WO 99/54342 80.

La glicosilación de las proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula huésped en la cual se expresa la proteína. Distintos organismos pueden producir enzimas de glicosilación diferentes (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas), y pueden tener diferentes sustratos (azúcares nucleotídicos) disponibles. Debido a dichos factores, el patrón de glicosilación, y la composición de residuos glicosídicos, pueden diferir dependiendo del sistema huésped en el cual se expresa la proteína en particular. Entre los residuos glicosídicos útiles en la invención pueden incluirse, sin limitaciones, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido síalico. En una forma de realización, la proteína de unión glicosilada comprende residuos glicosídicos que permiten obtener un patrón de glicosilación humano.

Aquellos versados en la técnica saben que el cambio en las glicosilaciones de proteínas puede dar como resultado diferentes características en la proteína. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida por un microorganismo huésped, tal como una levadura,

y glicosilada usando la vía endógena de la levadura, puede ser reducida en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Dichas glicoproteínas también pueden ser inmunogénicas en seres humanos y presentar una vida media reducida *in vivo* después de la administración. Receptores específicos en humanos y otros animales pueden reconocer residuos glicosídicos específicos y promover la rápida eliminación de la proteína del torrente sanguíneo. Entre otros efectos adversos pueden incluirse cambios en el plegamiento de las proteínas, su solubilidad, su susceptibilidad a proteasas, su circulación, su transporte, su compartimentalización, su secreción, el reconocimiento por otras proteínas o factores, su antigenicidad, o su alergenicidad. En consecuencia, un profesional puede elegir una proteína terapéutica con una composición y un patrón de glicosilación específicos, por ejemplo, una composición de glicosilación y un patrón idénticos, o al menos similares, a los producidos en las células humanas o las células con especificidad de especie del animal sujeto previsto.

La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de las de una célula huésped puede llevarse a cabo mediante la modificación genética de la célula huésped para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Usando procedimientos conocidos en la técnica, un profesional puede generar anticuerpos o porciones de unión al antígeno de éstos que presenten la glicosilación de las proteínas humanas. Por ejemplo, se han modificado cepas de levadura para expresar enzimas de glicosilación de origen no natural, tales como las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levaduras que presentan una glicosilación proteica idéntica a aquella de las

células animales, especialmente las células humanas (Patente de los EEUU 7.449.308 y 7.029.872 y Publicación PCT No. WO 2005/100584).

Además de las proteínas de unión, la presente invención también está relacionada con anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) específicos para las proteínas de unión de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con la región de unión al antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id puede prepararse mediante la inmunización de un animal con la proteína de unión o con una región que contenga su CDR. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante, y producirá un anticuerpo anti-Id. Ha de ser evidente que puede ser más fácil generar anticuerpos anti-idiotípicos contra dos o más anticuerpos parentales diferentes incorporados en una molécula de DVD-Ig y confirmarlos mediante estudios de unión, de acuerdo con métodos reconocidos en la técnica (por ejemplo, BIAcore, ELISA), para verificar que los anticuerpos anti-idiotípicos específicos para el idiotipo de cada anticuerpo parental también reconozcan el idiotipo (por ejemplo, el sitio de unión al antígeno) en el contexto de la DVD-Ig. Los anticuerpos anti-idiotípicos específicos para cada uno de los dos o más sitios de unión al antígeno de una DVD-Ig proveerán reactivos ideales para medir las concentraciones de una DVD-Ig humana en el suero de un paciente. Las evaluaciones de la concentración de la DVD-Ig pueden realizarse usando un "formato de ensayo ELISA sándwich", donde se aplica como recubrimiento un anticuerpo contra una primera región de unión al antígeno sobre la fase sólida (por ejemplo, BIAcore chip, placa de ELISA, etcétera), a lo que sigue el lavado con amortiguador de lavado, la incubación con la muestra de suero, otro paso de

lavado, y finalmente la incubación con otro anticuerpo anti-idiotípico contra el otro sitio de unión al antígeno, donde este último está marcado con una enzima para cuantificar la reacción de unión. En una forma de realización, para una DVD-Ig con más de dos sitios de unión diferentes, los anticuerpos anti-idiotípicos contra los dos sitios de unión externos (más distales y proximales respecto de la región constante) no solamente ayudarán a determinar la concentración de DVD-Ig en suero humano, sino que también permitirán documentar la integridad de la molécula *in vivo*. Cada anticuerpo anti-Id también puede ser usado como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en aún otro animal, con lo que se produce lo que se conoce como anticuerpo anti-anti-Id.

Además, aquél versado en la técnica ha de apreciar que es posible expresar una proteína de interés usando una biblioteca de células huésped modificadas genéticamente para expresar distintas enzimas de glicosilación, de modo que los miembros de dicha biblioteca de células huésped produzcan la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Por lo tanto, un profesional puede seleccionar y aislar una proteína de interés con nuevos patrones de glicosilación particulares. En una forma de realización, la proteína que tiene un nuevo patrón de glicosilación particularmente seleccionado presenta propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

III. Usos de la DVD-Ig

Debido a su capacidad de unirse a dos o más antígenos, las proteínas de unión de la invención pueden usase para detectar los antígenos (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero plasma) usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo de inmunoabsorción ligado a

enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o una coloración inmunohistoquímica del tejido. La DVD-Ig se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido no unido. Entre las sustancias detectables apropiadas se incluyen distintas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Entre los ejemplos apropiados de enzimas, se incluye la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β-galactosidasa o la acetilcolinesterasa; entre los ejemplos de grupos prostéticos complejos apropiados, se incluye la estreptavidina/biotina y la avidina/biotina; entre los ejemplos de materiales fluorescentes apropiados, se incluye la umbeliferona, la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la diclorotriazinilamino fluoresceína, el cloruro de dansilo la ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y entre los ejemplos de materiales radioactivos apropiados, se incluyen ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho ^{153}Sm.

En una forma de realización, las proteínas de unión de la invención son capaces de neutralizar la actividad de los antígenos *in vitro* e *in vivo*. Por ende, estas DVD-Ig pueden usarse para inhibir la actividad del antígeno, por ejemplo, en un cultivo de células que contiene los antígenos, en sujetos humanos u otros sujetos mamíferos que presenten antígenos con los que reaccione una proteína de unión de la invención. En otra forma de realización, en la invención se provee un método para reducir la actividad del antígeno en un sujeto que sufre una enfermedad o un trastorno donde la actividad del antígeno es perjudicial. La proteína de unión de la invención puede serle administrada a un sujeto humano con fines terapéuticos.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "un trastorno donde la actividad del antígeno es perjudicial" incluye enfermedades y otros trastornos donde se ha demostrado que la presencia del antígeno en un sujeto que sufre el trastorno es responsable de la patofisiología del trastorno es un factor que contribuye al empeoramiento del trastorno. Por ende, un trastorno donde la actividad del antígeno es perjudicial es uno donde se espera que la reducción de la actividad del antígeno alivie los síntomas y/o el progreso del trastorno. Estos trastornos pueden evidenciarse, por ejemplo, a través de un incremento en la concentración del antígeno en un fluido biológico de un sujeto que sufre el trastorno (por ejemplo, un incremento en la concentración del antígeno en suero, plasma, fluido sinovial del sujeto, etcétera). Entre los ejemplos no limitativos de trastornos que pueden tratarse con las proteínas de unión de la invención, se incluyen aquellos trastornos indicados en la sección anterior y en la sección relacionada con composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

Las DVD-Ig de la invención pueden unirse a un antígeno varios antígenos. Estos antígenos incluyen, sin limitaciones, los blancos que se detallan en las siguientes bases de datos, las cuales se incorporan en la presente a modo de referencia. Las bases de datos de blancos incluyen las que se indican a continuación:

Blancos terapéuticos (http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttd/ttd.asp);

Citoquinas y receptores de citoquinas (http://www.cytokinewebfacts.com/, http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi, y http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html);

Quimioquinas (http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html);

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

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

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

Blancos relacionados con el cáncer (http://cged.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi);

Proteínas secretadas, tales como blancos potenciales de anticuerpos (http://spd.cbi.pku.edu.cn/);

Protein quinasas (http://spd.cbi.pku.edu.cn/), y

Marcadores CD humanos (http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf) y (Zola H, 2005 CD molecules 2005: human cell differentiation molecules Blood, 106:3123-6).

Las DVD-Ig son útiles como agentes terapéuticos para el bloqueo simultáneo de dos blancos diferentes, con el fin de mejorar la eficacia/seguridad y/o incrementar la cobertura del paciente. Estos blancos pueden incluir blancos solubles (TNF) y receptores blanco en la superficie de las células (VEGFR y EGFR). También pueden usarse para inducir una citotoxicidad redirigida entre las células tumorales y las células T (Her2 y CD3) en la terapia del cáncer, o entre células autorreactivas y células efectoras en las enfermedades autoinmunes o los transplantes, o entre cualquier célula

blanco y cualquier célula efectora, para eliminar las células causantes de enfermedades en cualquier enfermedad dada.

Además, cuando se la diseñe para que se dirija a dos epitopes diferentes en el mismo receptor, la DVD-Ig podrá usarse para desencadenar el agrupamiento y la activación de los receptores. Esto puede ser beneficioso para preparar agentes terapéuticos anti-GPCR agónicos y antagónicos. En este caso, la DVD-Ig puede usarse para dirigirla a dos epitopes diferentes (incluyendo epitopes en las regiones de rizo y el dominio extracelular) en una misma célula, para el agrupamiento/la señalización (dos moléculas en la superficie de la célula) o la señalización (en una molécula). De manera similar, una molécula de DVD-Ig puede diseñarse para desencadenar la unión a CTLA-4 y una señal negativa al dirigirla a dos epitopes diferentes (o 2 copias del mismo epitope) del dominio extracelular CTLA-4, lo que resultará en la regulación negativa de la respuesta inmune. CTLA-4 es un blanco convalidado en el campo clínico para el tratamiento terapéutico de una cantidad de trastornos inmunológicos. Las interacciones CTLA-4/B7 ejercen una regulación negativa sobre la activación de las células T al atenuar el progreso del ciclo celular, la producción de IL-2 y la proliferación de las células T después de la activación, y la participación de CTLA-4 (CD152) puede ejercer una regulación negativa sobre 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 mediante la participación de un anticuerpo agónico contra CTLA-4 no ha tenido éxito, ya que, para la activación de CTLA-4, es necesaria la unión. La interacción molecular de CTLA-4/B7 se da en ordenamientos de "cierres oblicuos", lo que puede demostrarse con un análisis de la estructura cristalina

(Stamper 2001 Nature 410:608). Sin embargo, ninguno de los reactivos capaces de unirse a CTLA-4 disponibles en la actualidad tiene propiedades de unión, incluyendo los anticuerpos monoclonales contra anti-CTLA-4. Se ha intentado solucionar este problema en diversas ocasiones. En un caso, se generó un anticuerpo de cadena simple unido a un miembro celular, lo que resultó en una inhibición significativa del rechazo alogénico en ratones (Hwang 2002 JI 169:633). En un caso separado, se generó un anticuerpo de cadena simple APC artificial unido a la superficie contra CTLA-4, y se comprobó que atenuaba las respuestas de las células T (Griffin 2000 JI 164:4433). En ambos casos, la unión a CTLA-4 se obtuvo a través de anticuerpos unidos a miembros localizados en posiciones adyacentes en sistemas artificiales. Si bien con estos experimentos se demostró el concepto de la regulación negativa inmune mediante el desencadenamiento de la regulación negativa de CTLA-4, los reactivos usados en estos trabajos no son apropiados para el uso terapéutico. Con este fin, la unión a CTLA-4 puede efectuarse usando una molécula de DVD-Ig dirigida a dos epitopes diferentes (o 2 copias del mismo epitope) del dominio extracelular de CTLA-4. El fundamento es que la distancia entre los dos sitios de unión de una IgG, aproximadamente 150-170Å, es demasiado grande para que se dé la unión activa de CTLA-4 (30-50 Å entre 2 homodímeros de CTLA-4). Sin embargo, la distancia entre los dos sitios de unión en DVD-Ig (un brazo) es mucho menor, también en el rango de 30-50 Å, lo que facilita la unión apropiada de CTLA-4.

De manera similar, la DVD-Ig puede estar dirigida a dos miembros diferentes de un complejo receptor en la superficie de las células (por ejemplo, IL-12R alfa y beta). Además, la DVD-Ig puede estar dirigida a CR1 y una

proteína/un patógeno soluble, para dirigir una eliminación rápida de la una proteína/el patógeno soluble.

Adicionalmente, las DVD-Ig de la invención pueden emplearse para la administración con especificidad tisular (direccionamiento hacia un marcador tisular y un mediador de enfermedades para obtener una PK local mejorada, lo que resulta en una mayor eficacia y/o una menor toxicidad), incluyendo una administración intracelular (direccionamiento hacia un receptor de internalización y una molécula intracelular), una administración en el interior del cerebro (direccionamiento hacia un receptor de transferrina y un mediador de enfermedades del CNS, para atravesar la barrera hematoencefálica). La DVD-Ig también puede servir como proteína de transporte para administrar un antígeno en una localización específica, por medio de la unión a un epitope no neutralizador de dicho antígeno, y también para incrementar la vida media del antígeno. Además, la DVD-Ig puede diseñarse de manera que esté físicamente unida a dispositivos médicos implantados en los pacientes o se dirija a estos dispositivos médicos (véanse Burke, Sandra E.; Kuntz, Richard E.; Schwartz, Lewis B., Zotarolimus eluting stents. Advanced Drug Delivery Reviews (2006), 58(3), 437-446; Surface coatings for biological activation y functionalization of medical devices, Hildebrand, H. F.; Blanchemain, N.; Mayer, G.; Chai, F.; Lefebvre, M.; Boschin, F., Surface y Coatings Technology (2006), 200(22-23), 6318-6324; Drug/device combinations for local drug therapies y infection prophylaxis, Wu, Peng; Grainger, David W., Biomaterials (2006), 27(11), 2450-2467; Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices., Marques, A. P.; Hunt, J. A.; Reis, Rui L., Biodegradable Systems in Tissue Engineering y Regenerative Medicine (2005), 377-397). En resumen, el

direccionamiento de tipos apropiados de células al sitio del implante médico puede promover la cicatrización y la restauración de la función normal del tejido. Como alternativa, también se provee la inhibición de los mediadores (incluyendo, sin limitaciones, citoquinas) liberados al implantarse el dispositivo por una DVD-Ig unida o dirigida a un dispositivo. Por ejemplo, durante años se han usado stents en la cardiología de intervención para liberar las arterias bloqueadas y mejorar el flujo de sangre hacia el músculo cardiaco. Sin embargo, se ha comprobado que los stents tradicionales, de metal desnudo, provocan restenosis (nuevo angostamiento de la arteria en un área tratada) en algunos pacientes y puede resultar en coágulos de sangre. Recientemente, se ha descripto un stent recubierto con un anticuerpo anti-CD34 que permite reducir la restenosis y previene la aparición de coágulos de sangre en las células progenitoras endoteliales (EPC) que circulan en sangre. Las células endoteliales son las células que recubren los vasos sanguíneos y permiten que la sangre tenga un flujo suave. Las EPC se adhieren a la superficie dura del stent para formar una capa suave, la cual no solamente promueve la cicatrización, sino que también previene la restenosis y los coágulos de sangre, complicaciones asociadas previamente con el uso de stents (Aoji et al. 2005 J Am Coll Cardiol. 45(10):1574-9). Además de mejorar los resultados en los pacientes para los que se requiere el uso de stents, también hay implicaciones para los pacientes para los que se requiere cirugía de derivación cardiovascular. Por ejemplo, un conducto vascular prostético (arteria artificial) recubierto con anticuerpos anti-EPC permitiría eliminar la necesidad de usar arterias de las piernas o los brazos de los pacientes para los injertos en la cirugía de derivación. Esto reduciría la duración de la cirugía y la anestesia, lo

que a su vez, reduciría las muertes relacionadas con la cirugía coronaria. Las DVD-Ig están diseñadas de manera tal que se unan a un marcador en la superficie de las células (tal como CD34), y también a una proteína (o un epitope de cualquier tipo, incluyendo, sin limitaciones, proteínas, lípidos y polisacáridos) que haya sido aplicada como recubrimiento sobre el dispositivo implantado para facilitar el reclutamiento de células. Estos abordajes también pueden aplicarse a los implantes médicos en general. Como alternativa, las DVD-Ig pueden aplicarse como recubrimientos en dispositivos médicos, y al realizarse la implantación y la liberación de todas las DVD-Ig del dispositivo (o cualquier otra aplicación para la que fuera necesaria una DVD-Ig fresca adicional, incluyendo el envejecimiento y la desnaturalización de las DVD-Ig ya cargadas), el dispositivo podría ser recargado mediante la administración sistémica de una DVD-Ig fresca al paciente, donde la DVD-Ig estaría diseñada de manera que se uniera a un blanco de interés (una citoquina, un marcador de la superficie de la célula (tal como CD34), etcétera), con un conjunto de sitios de unión y un blanco aplicados como recubrimiento en el dispositivo (incluyendo una proteína, un epitope de cualquier tipo, incluyendo, sin limitaciones, lípidos, polisacáridos y polímeros). Esta tecnología tiene la ventaja de extender la utilidad de los implantas recubiertos.

A. Uso de las DVD-Ig en diversas enfermedades

Las moléculas de DVD-Ig de la invención también son útiles como moléculas terapéuticas para tratar diversas enfermedades. Estas moléculas de DVD-Ig pueden unirse a uno más blancos que participen en una enfermedad específica. A continuación se describirán ejemplos de estos blancos en diversas enfermedades.

1. Respuesta autoinmune e inflamatoria humana

Muchas proteínas han sido relacionadas con las respuestas autoinmunes e inflamatorias generales, incluyendo C5, CCL1 (I-309), CCL11 (eotaxina), CCL13 (mcp-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL2 (mcp-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (TECK), CCL26, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (mcp-3), CCL8 (mcp-2), CXCL1, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC/IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL2, CXCL3, CXCL5 (ENA-78/LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9, IL13, IL8, CCL13 (mcp-4), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1, IL8RA, XCR1 (CCXCR1), IFNA2, IL10, IL13, IL17C, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL22, IL5, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, SCYE1 (citoquina activadora de los monocitos endoteliales), SPP1, TNF, TNFSF5, IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RA1, IL5RA, IL9, IL9R, ABCF1, BCL6, C3, C4A, CEBPB, CRP, ICEBERG, IL1R1, IL1RN, IL8RB, LTB4R, TOLLIP, FADD, IRAK1, IRAK2, MYD88, NCK2, TNFAIP3, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, CD28, CD3E, CD3G, CD3Z, CD69, CD80, CD86, CNR1, CTLA4, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, FCGR3A, GPR44, HAVCR2, OPRD1, P2RX7, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, BLR1, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCR4, GPR2, SCYE1, SDF2, XCL1, XCL2,

XCR1, AMH, AMHR2, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, C19orf10 (IL27w), CER1, CSF1, CSF2, CSF3, DKFZp451J0118, FGF2, GFI1, IFNA1, IFNB1, IFNG, IGF1, IL1A, IL1B, IL1R1, IL1R2, IL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL4, IL4R, IL5, IL5RA, IL6, IL6R, IL6ST, IL7, IL8, IL8RA, IL8RB, IL9, IL9R, IL10, IL10RA, IL10RB, IL11, IL11RA, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL13RA1, IL13RA2, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17R, IL18, IL18R1, IL19, IL20, KITLG, LEP, LTA, LTB, LTB4R, LTB4R2, LTBR, MIF, NPPB, PDGFB, TBX21, TDGF1, TGFA, TGFB1, TGFB1I1, TGFB2, TGFB3, TGFBI, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TH1L, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF11A, TNFRSF21, TNFSF4, TNFSF5, TNFSF6, TNFSF11, VEGF, ZFPM2, y RNF110 (ZNF144). En un aspecto, en la presente se proveen DVD-Ig capaces de unirse a uno más de los blancos indicados en la presente documentación.

Se contemplan las as DVD Ig capaces de unirse a los siguientes pares de blancos para tratar trastornos inflamatorios: TNF y IL-17A; TNF y RANKL; TNF y VEGF; TNF y SOST (seq. 1); TNF y DKK; TNF y alfaVbeta3; TNF y NGF; TNF y IL-23p19; TNF y IL-6; TNF y SOST (seq. 2); TNF y IL-6R; TNF y CD-20; TNF y LPA; TNF y PGE2; IgE y IL-13 (seq. 1); IL-13 (seq. 1) y IL23p19; IgE y IL-4; IgE y IL-9 (seq. 1); IgE y IL-9 (seq. 2); IgE y IL-13 (seq. 2); IL-13 (seq. 1) y IL-9 (seq. 1); IL-13 (seq. 1) y IL-4; IL-13 (seq. 1) y IL-9 (seq. 2); IL-13 (seq. 2) y IL-9 (seq. 1); IL-13 (seq. 2) y IL-4; IL-13 (seq. 2) y IL-23p19; IL-13 (seq. 2) y IL-9 (seq. 2); IL-6R y VEGF; IL-6R y IL-17A; IL-6R y RANKL; IL-17A y IL-1beta (seq. 1); IL-1beta (seq. 1) y RANKL; IL-1beta (seq. 1) y VEGF; RANKL y CD-20; IL-1alfa y IL-1beta (seq. 1); IL-1alfa y IL-1beta (seq. 2) (ver Ejemplos 2.1 a 2.40).

2. Asma

El asma alérgico se caracteriza por la presencia de eosinofilia, metaplasia de las células caliciformes, alteraciones en las células epiteliales, hiperreactividad de las vías aéreas (AHR), y expresión de las citoquinas Th2 y Th1, así como niveles elevados de IgE en suero. En la actualidad, existe el consenso de que la inflamación de las vías aéreas es el factor clave subyacente de la patogénesis del asma, y comprende una interacción compleja entre las células inflamatorias, tales como células T, célula B, eosinófilos, mastocios y macrófagos, y los mediadores que secretan, incluyendo citoquinas y quimioquinas. Los corticosteroides constituyen el tratamiento antiinflamatorio más importante para el asma en la actualidad, pero su mecanismo de acción no es específico e implica riesgos de seguridad, especialmente en la población de pacientes juveniles. Por lo tanto, se necesita el desarrollo de terapias más específicas y dirigidas. Existen caza vez más evidencias de que, en ratones, la IL-13 imita muchas de las características del asma, incluyendo la AHR, la hipersecreción de mucus y la fibrosis de las vías aéreas, independientemente de la inflamación eosinofílica (Finotto et al., International Immunology (2005), 17(8), 993-1007; Padilla et al., Journal of Immunology (2005), 174(12), 8097-8105).

La IL-13 ha sido implicada como poseedora de una función clave, debido a que provoca las respuestas patológicas asociadas con el asma. El desarrollo de una terapia con anticuerpos monoclonales anti-IL-13 para reducir los efectos de la IL-13 en los pulmones es un abordaje novedoso, excitante y prometedor como nuevo tratamiento para el asma. Sin embargo, también hay otros mediadores de las vías inmunológicas diferenciales que participan en la

patogénesis del asma, y el bloqueo de estos mediadores, además del de la IL-13, puede ofrecer un beneficio terapéutico adicional. Estos pares de blancos incluyen, sin limitaciones, IL-13 y una citoquina proinflamatoria, tal como el factor de necrosis tumoral α (TNF-α). TNF-α puede amplificar la respuesta inflamatoria en el asma, y puede estar relacionado con la severidad de la enfermedad (McDonnell, et al., Progress in Respiratory Research (2001), 31 (New Drugs for Asthma, Allergy y COPD), 247-250). Esto permite inferir que el bloqueo de IL-13 y TNF-α puede tener efectos beneficiosos, particularmente en las enfermedades severas de las vías aéreas. En otra forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a los blancos IL-13 y TNFα, y se la usa para tratar el asma.

Los modelos animales, tales como el modelo de asma inducido por OVA en ratones, donde puede evaluarse la inflamación y la AHR, son conocidos en la técnica y pueden usarse para determinar la capacidad de diversas moléculas de DVD-Ig de tratar el asma. Se describen modelos animales para estudiar el asma en Coffman, et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201(12), 1875-1879; Lloyd, et al., Advances in Immunology (2001), 77, 263-295; Boyce et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201(12), 1869-1873; y Snibson, et al., Journal of the British Society for Allergy y Clinical Immunology (2005), 35(2), 146-52. Además de las evaluaciones de seguridad de rutina de estos pares de blancos específicos, pueden proveerse pruebas específicas para determinar el grado de inmunosupresión que sean útiles para seleccionar los mejores pares de blancos (véanse Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77

99-102; Hart et al., Journal of Allergy y Clinical Immunology (2001), 108(2), 250-257).

Sobre la base del fundamento descripto en la presente documentación, y con el uso del mismo modelo para evaluar la eficacia y la seguridad, podrán determinarse otros pares de blancos con los que puedan unirse las moléculas de DVD-Ig que puedan ser útiles para tratar el asma. En una forma de realización, estos blancos incluyen, sin limitaciones, IL-13 e IL-1beta, ya que la IL-1beta también participa en la respuesta inflamatoria en el asma; IL-13 y las citoquinas y las quimioquinas que participan en la inflamación, tales como IL-13 e IL-9; IL-13 e IL-4; IL-13 e IL-5; IL-13 e IL-25; IL-13 y TARC; IL-13 y MDC; IL-13 y MIF; IL-13 y TGF-β; IL-13 y un agonista de LHR; IL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; e IL-13 y ADAM8. En la presente invención también se proveen DVD-Ig capaces de unirse a uno más blancos que participen en el asma seleccionados del grupo que consiste en CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFNA1, IFNB1, IFNG, histamina y receptores de histamina, IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, KITLG, PDGFB, IL2RA, IL4R, IL5RA, IL8RA, IL8RB, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24,CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNF, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, y quitinasa.

3. Artritis reumática

La artritis reumática (RA), una enfermedad sistémica, se caracteriza por una reacción inflamatoria crónica en el sinovio de las articulaciones, y está asociada con la degeneración del cartílago y la erosión del hueso yuxtaarticular. Muchas citoquinas proinflamatorias, incluyendo el TNF, las quimioquinas y los factores de crecimiento, se expresan en las articulaciones enfermas. Se ha demostrado que la administración sistémica de un anticuerpo anti-TNF o una proteína de fusión sTNFR en modelos de RA en ratones tiene efectos antiinflamatorios y de protección de las articulaciones. En investigaciones clínicas donde se bloqueó la actividad del TNF en pacientes con RA con infliximab, un anticuerpo monoclonal anti-TNF quimérico, administrado por vía intravenosa (Harriman G, Harper LK, Schaible TF. 1999 Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment. Ann Rheum Dis 58 Supl. 1:I61-4), se obtuvieron evidencias de que TNF regula la producción de IL-6, IL-8, MCP-1 y VEGF, el reclutamiento de células inmunes e inflamatorias hacia las articulaciones, la angiogénesis, y la reducción de las metaloproteinasas de matriz 1 y 3 en los vasos sanguíneos. Una mejor comprensión de la vía inflamatoria en la artritis reumática ha permitido identificar otros blancos terapéuticos en la artritis reumática. Ya se han evaluado tratamientos prometedores, tales como los antagonistas de la interleuquina-6 (anticuerpo contra el receptor de IL-6 MRA, desarrollado por Chugai, Roche (véase Nishimoto, Norihiro et al., Arthritis & Rheumatism (2004), 50(6), 1761-1769), CTLA4Ig (abatacept, Genovese Mc et al 2005 Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. N Engl J Med. 353:1114-23) y la terapia con anti-células B

(rituximab, Okamoto H, Kamatani N. 2004 Rituximab for rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 351:1909), en pruebas controladas con distribución al azar durante el año anterior. Se han identificadotras citoquinas que han resultado ser beneficiosas en modelos animales, incluyendo la interleuquina-15 (anticuerpo terapéutico HuMax-IL_15, AMG 714, véase Baslund, Bo et al., Arthritis & Rheumatism (2005), 52(9), 2686-2692), la interleuquina-17 y la interleuquina-18, y actualmente se están realizando pruebas clínicas con estos agentes. La terapia con anticuerpos con especificidad dual, donde se combina anti-TNF y otro mediador, tiene un gran potencial para mejorar la eficacia clínica y/o la cobertura del paciente. Por ejemplo, el bloqueo de TNF y VEGF potencialmente puede erradicar la inflamación y la angiogénesis, procesos relacionados con la patofisiología de la RA. También se contempla el bloqueo de otros pares de blancos que participan en la RA, incluyendo, sin limitaciones, TNF e IL-18; TNF e IL-12; TNF e IL-23; TNF e IL-1beta; TNF y MIF; TNF e IL-17; TNF e IL-15, con DVD-Ig específicas. Además de las evaluaciones de rutina de estos pares de blancos, pueden proveerse pruebas específicas para determinar el grado de inmunosupresión que sean útiles para seleccionar los mejores pares de blancos (véanse Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Hart et al., Journal of Allergy y Clinical Immunology (2001), 108(2), 250-257). Puede establecerse si una molécula de DVD-Ig será útil para el tratamiento de la artritis reumática usando modelos animales de RA pre-clínica, tales como el modelo de artritis inducida por colágeno en ratón. Otros modelos útiles también son bien conocidos en la técnica (véase Brand DD., Comp Med. (2005) 55(2):114-22). Sobre la base de la reactividad de los anticuerpos parentales

con ortólogos humanos y de ratón (por ejemplo, la reactividad con TNF humano y de ratón, IL-15 humana y de ratón, etcétera), pueden realizarse estudios de convalidación en el modelo de CIA en ratón con moléculas de DVD-Ig derivadas de un "anticuerpo de reemplazo coincidente". En resumen, puede hacerse coincidir una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos blanco específicos de ratón, en la mayor medida posible, con las características de los anticuerpos parentales humanos o humanizados usados para la construcción de DVD-Ig humanas (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar, etcétera).

4. SLE

La característica distintiva inmunopatogénica del SLE es la activación de las células B policlonales, lo que resulta en hiperglobulinemia, producción de autoanticuerpos y formación de complejos inmunes. La anormalidad fundamental parece ser la incapacidad de las células T de suprimir los clones prohibidos de células B debido a la desregulación generalizada de las células T. Además, la interacción entre las células B y T se ve facilitada por varias citoquinas, tales como IL-10, y también por moléculas co-estimulatorias, tales como CD40 y CD40L, B7 y CD28 y CTLA-4, que inician la segunda señal. Estas interacciones, junto con la eliminación por fagocitosis reducida de los complejos inmunes y el material apoptótico, perpetúan la respuesta inmune, lo que resulta en lesiones en los tejidos. Los siguientes blancos pueden participar en el SLE y pueden ser usados para un abordaje de intervención terapéutica con DVD-Ig: 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, CD1C, CHST10, HLA-A, HLA-DRA y NT5E; señales de co-estimulación: CTLA4 o B7.1/B7.2; inhibición de la supervivencia de las células B: BlyS, BAFF; activación del complemento: C5; modulación de las citoquinas: el principio clave es que la respuesta biológica neta en cualquier tejido es el resultado del equilibrio entre los niveles locales de citoquinas proinflamatorias o antiinflamatorias (véase Sfikakis PP et al 2005 Curr Opin Rheumatol 17:550-7). Se considera que el SLE es una enfermedad dirigida por Th-2, con elevaciones documentadas de IL-4, IL-6 e IL-10 en suero. También se contemplan las DVD-Ig capaces de unirse a uno más blancos seleccionados del grupo que consiste en IL-4, IL-6, IL-10, IFN-α y TNF-α. La combinación de los blancos que se describen en la presente permitirá mejorar la eficacia de las terapias para el SLE, lo que podrá ser evaluado en una cantidad de modelos de lupus preclínico (véase Peng SL (2004) Methods Mol Med.;102:227-72). Sobre la base de la reactividad de los anticuerpos parentales con ortólogos humanos y de ratón (por ejemplo, la reactividad con CD20 humano y de ratón, interferón alfa humano y de ratón, etcétera), pueden realizarse estudios de convalidación en un modelo de lupus en ratón con moléculas de DVD-Ig derivadas de un "anticuerpo de reemplazo coincidente". En resumen, puede hacerse coincidir una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos blanco específicos de ratón, en la mayor medida posible, con las características de los anticuerpos parentales

humanos o humanizados usados para la construcción de DVD-Ig humanas (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar, etcétera).

5. Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad humana compleja de tipo autoinmune que posee una etiología predominantemente desconocida. La destrucción inmunológica de la proteína básica de la mielina (MBP) en el sistema nervioso es la patología más saliente de la esclerosis múltiple. La MS es una enfermedad con patologías complejas, que comprende la infiltración por células T CD4+, CD8+ y de respuesta dentro del sistema nervioso central. En la MS se ha descripto la expresión de citoquinas en el CNS, las especies de nitrógeno reactivas y las moléculas coestimulatorias. Son de mayor consideración los mecanismos inmunológicos que contribuyen al desarrollo de autoinmunidad. En particular, la expresión de antígenos, las interacciones entre las citoquinas y los leucocitos, y las células T reguladoras, que ayudan a balancear/modular otras células T, tales como células Th1 y Th2, son áreas importantes para la identificación de blancos para la terapia.

La IL-12 es una citoquina proinflamatoria que es producida por el APC y promueve la diferenciación de las células efectoras Th1. La IL-12 es producida en las lesiones en desarrollo de pacientes con MS, y también en los animales afectados por EAE. Con anterioridad, se demostró que la interferencia en las vías de IL-12 permitía prevenir de manera efectiva la EAE, y que la neutralización in vivo de IL-12p40 con un anticuerpo monoclonal anti-IL-12 tenía efectos beneficiosos en el modelo de EAE inducida por mielina en monos tití.

TWEAK es un miembro de la familia de los TNF que es expresado de manera constitutiva en el sistema nervioso central (CNS), cuyos efectos proinflamatorios, proliferativos o apoptóticos dependen de los tipos celulares. Su receptor, Fn14, es expresado en el CNS por las células endoteliales, los astrocitos reactivos y las neuronas. La expresión de ARNm de TWEAK y Fn14 se halla incrementada en la médula espinal durante la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE). El tratamiento con anticuerpos anti-TWEAK en la EAE inducida por la glicoproteína de los oligodendrocitos de la mielina (MOG) en ratones C57BL/6 resultó en una reducción de la severidad de la enfermedad y la infiltración de leucocitos cuando se trataron los ratones después de la fase de cebado.

Un aspecto de la invención se relaciona con moléculas de DVD-Ig capaces de unirse a uno más, por ejemplo, dos blancos seleccionados del grupo que consiste en IL-12, TWEAK, IL-23, CXCL13, CD40, CD40L, IL-18, VEGF, VLA-4, TNF, CD45RB, CD200, IFNgamma, GM-CSF, FGF, C5, CD52 y CCR2. En una forma de realización, se incluye una DVD-Ig con especificidad dual anti-IL-12/TWEAK como agente terapéutico beneficioso para el tratamiento de la MS.

En la técnica se conocen varios modelos animales para evaluar la utilidad de las moléculas de DVD-Ig para tratar la MS (véanse Steinman L, et al., (2005) Trends Immunol. 26(11):565-71; Lublin FD., et al., (1985) Springer Semin Immunopathol.8(3):197-208; Genain CP, et al., (1997) J Mol Med. 75(3):187-97; Tuohy VK, et al., (1999) J Exp Med. 189(7):1033-42; Owens T, et al., (1995) Neurol Clin.13(1):51-73; y 't Hart BA, et al., (2005) J Immunol 175(7):4761-8). Sobre la base de la reactividad de los anticuerpos parentales

con ortólogos humanos y de ratón (por ejemplo, la reactividad con IL-12 humana y de ratón, TWEAK humano y de ratón, etcétera), pueden realizarse estudios de convalidación en el modelo de EAE en ratón con moléculas de DVD-Ig derivadas de un "anticuerpo de reemplazo coincidente". En resumen, puede hacerse coincidir una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos blanco específicos de ratón, en la mayor medida posible, con las características de los anticuerpos parentales humanos o humanizados usados para la construcción de DVD-Ig humanas (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar, etcétera). El mismo concepto se aplica a modelos animales en otras especies distintas de roedores, donde se seleccionaría una DVD-Ig derivada de un "anticuerpo de reemplazo coincidente" para los estudios anticipados de farmacología, y posiblemente seguridad. Además de las evaluaciones de seguridad de rutina de estos pares de blancos específicos, pueden proveerse pruebas específicas para determinar el grado de inmunosupresión que sean útiles para seleccionar los mejores pares de blancos (véanse Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Jones O. 2000 Rovelizumab (ICOS Corp). IDrugs.3(4):442-6).

6. Sepsis

La patofisiología de la sepsis es iniciada por los componentes de la membrana externa de los organismos gram-negativos (lipopolisacárido [LPS], lípido A, endotoxina) y los organismos gram-positivos (ácido lipoteicoico, peptidoglicano). Estos componentes de la membrana externa pueden unirse al receptor de CD14 en la superficie de los monocitos. Los receptores activables descriptos con anterioridad permiten que posteriormente se transmita una señal

hacia la célula, lo que resultará en la producción eventual de las citoquinas proinflamatorias factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) e interleuquina-1 (IL-1). Las respuestas inflamatorias e inmunes avasalladoras son características esenciales del choque séptico, y tienen una participación clave en la patogénesis del daño en los tejidos, el fallo de múltiples órganos y la muerte inducida por sepsis. Se ha demostrado que las citoquinas, especialmente el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina (IL-1), son mediadores críticos del choque séptico. Estas citoquinas tienen un efecto tóxico directo sobre los tejidos; también activan la fosfolipasa A2. Estos y otros efectos resultan en concentraciones incrementadas del factor activador de las plaquetas, la promoción de la actividad de la óxido nítrico sintetasa, la promoción de la infiltración de los tejidos por neutrófilos, y la promoción de la actividad de los neutrófilos.

El tratamiento de la sepsis y el choque séptico sigue siendo un problema desde el punto de vista clínico, y las pruebas prospectivas recientes con modificadores de la respuesta biológica (es decir, anti-TNF, anti-MIF) dirigidos a la respuesta inflamatoria solamente han presentado beneficios clínicos modestos. Recientemente, el interés se ha desviado hacia las terapias dirigidas a la reversión de los períodos de supresión inmune adjuntos. Con estudios en animales experimentales y pacientes críticamente enfermos, se ha demostrado que la apoptosis incrementada de órganos linfoides y algunos tejidos parenquimáticos contribuyen a la supresión inmune, la anergia y la disfunción de los sistemas de órganos. Durante los síndromes de sepsis, la apoptosis de los linfocitos puede ser desencadenada por la ausencia de IL-2 o la liberación de glucocorticoides, granzimas, o las denominadas citoquinas "de muerte": el

factor de necrosis tumoral alfa o el ligando Fas. La apoptosis procede a través de la auto-activación de las caspasas del citosol y/o las mitocondrias, lo que puede estar influido por los miembros pro y antiapoptóticos de la familia de Bcl-2. En animales experimentales, el tratamiento con inhibidores de la apoptosis no solamente puede prevenir la apoptosis de las células linfoides; sino que también puede mejorar el resultado. Aunque las pruebas clínicas con agentes antiapoptóticos permanecen distantes debido en gran parte a las dificultades técnicas asociadas con su administración y su direccionamiento a los tejidos, la inhibición de la apoptosis de los linfocitos sigue siendo un blanco terapéutico atractivo para el paciente con sepsis. De manera similar, un agente con especificidad dual, dirigido a un mediador inflamatorio y un mediator apoptótico, puede resultar en un beneficio adicional. Un aspecto de la invención se relaciona con DVD-Ig capaces de unirse a uno más blancos que participan en la sepsis, en una forma de realización, dos blancos seleccionados del grupo que consiste en TNF, IL-1, MIF, IL-6, IL-8, IL-18, IL-12, IL-23, FasL, LPS, los receptores activables, TLR-4, el factor tisular, MIP-2, ADORA2A, CASP1, CASP4, IL-10, IL-1B, NFKB1, PROC, TNFRSF1A, CSF3, CCR3, IL1RN, MIF, NFKB1, PTAFR, TLR2, TLR4, GPR44, HMOX1, la midquina, IRAK1, NFKB2, SERPINA1, SERPINE1 y TREM1. La eficacia de estas DVD-Ig para la sepsis puede evaluarse en modelos animales preclínicos conocidos en la técnica (véanse Buras JA, et al.,(2005) Nat Rev Drug Discov. 4(10):854-65 y Calandra T, et al., (2000) Nat Med. 6(2):164-70).

7. Trastornos neurológicos

7.1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas usualmente son crónicas, en cuyo caso son dependientes de la edad, o agudas (por ejemplo, apoplejía, daño cerebral traumático, daño en la columna vertebral, etc.). Están caracterizadas por la pérdida progresiva de funciones neuronales (muerte de células neuronales, desmielinización), pérdida de movilidad y pérdida de memoria. Al incrementarse el conocimiento de los mecanismos subyacentes de las enfermedades neurodegenerativas crónicas (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer), se observa una etiología compleja, y se ha reconocido una variedad de factores que contribuyen a su desarrollo y progreso, por ejemplo, la edad, el estado de glucemia, la producción y la multimerización de amiloides, la acumulación de productos de glucación terminal avanzados (AGE) que se unen a su receptor RAGE (receptor para AGE), el estrés oxidativo incrementado en el cerebro, el flujo de sangre disminuido en el cerebro, la neuroinflamación, incluyendo la liberación de citoquinas y quimioquinas inflamatorias, la disfunción neuronal, y la activación de la microglía. Por ende, estas enfermedades neurodegenerativas crónicas representan una interacción compleja entre múltiples tipos celulares y mediadores. Las estrategias de tratamiento para estas enfermedades son limitadas, y la mayoría comprende el bloqueo de los procesos inflamatorios con agentes antiinflamatorios no específicos (por ejemplo, corticosteroides, inhibidores de la COX) o agentes para prevenir la pérdida de neuronas y/o funciones sinápticas. Con estos tratamientos, no es posible detener el progreso de la enfermedad. A partir de estudios recientes, ha sido posible concluir que las terapias más dirigidas, tales como los anticuerpos contra el péptido A-b soluble (incluyendo las formas oligoméricas A-b) no solamente pueden ayudar a detener el progreso de la

enfermedad, sino que también pueden ayudar a mantener la memoria. Estas observaciones preliminares permiten inferir que, con terapias específicas dirigidas a más de un mediador de las enfermedades (por ejemplo, A-b y una citoquina proinflamatoria, tal como el TNF), sería posible obtener una eficacia terapéutica para las enfermedades neurodegenerativas aún mayor que la observada con el direccionamiento hacia un solo mecanismo de la enfermedad (por ejemplo, A-þalona soluble) En el arte se conocen diferentes modelos animales para evaluar la utilidad de las moléculas DVD-Ig para tratar MS (véase Steinman *et al.* (2005) Trends Immunol. 26(11):565-71; Lublin *et al.* (1985) Springer Semin. Immunopathol. 8(3):197-208; Genain *et al.* (1997) J. Mol. Med. 75(3):187-97; Tuohy *et al.* (1999) J. Exp. Med. 189(7):1033-42; Owens *et al.* (1995) Neurol. Clin. 13(1):51-73; y Hart *et al.* (2005) J. Immunol. 175(7):4761-8. En base a la reactividad cruzada de anticuerpos parentales para especies ortólogas de humano y animal ortólogos (por ejemplo, reactividad para IL-12 de humano y ratón, TWEAK de humano y ratón, etc.), se pueden realizar estudios de validación en el modelo de EAE en ratón con moléculas DVD-Ig derivadas del anticuerpo sustituto correspondiente. Brevemente, una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos específicos de blanco de ratón puede hacerse coincidir todo lo posible a las características de los anticuerpos parentales humanos o humanizados usados para la construcción de DVD-Ig humana (por ejemplo, afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar, etc.). El mismo concepto se aplica a modelos animales en otras especies no roedoras, en donde una DVD-Ig derivada del anticuerpo sustituto correspondiente, se podría seleccionar para la farmacología anticipada y posiblemente estudios seguros. Adicionalmente a evaluaciones de seguridad

de rutina de estos pares blanco, ensayos específicos para el grado de inmunosupresión pueden ser garantizados y útiles en la selección de los mejores pares blanco (véase Luster *et al.* (1994) Toxicol. 92(1-3):229-43; Descotes *et al.* (1992) Devel. Biol. Stand. 77:99-102; Jones (2000) IDrugs 3(4):442-6).

Las moléculas de DVD-Ig de la invención pueden unirse a uno más blancos que participan en las enfermedades neurodegenerativas crónicas, tales como la enfermedad de Alzheimer. Estos blancos incluyen, sin limitaciones, cualquier mediador, soluble o en la superficie de celular, que participe en la patogénesis de la AD, por ejemplo, AGE (S100 A, anfoterina), las citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-1), las quimioquinas (por ejemplo, MCP 1), las moléculas que inhiben la regeneración de los nervios (por ejemplo, Nogo, RGM A), las moléculas que potencian el crecimiento de las neuritas (neurotrofinas) y las moléculas que pueden mediar en el transporte en la barrera sangre-cerebro (por ejemplo receptor de transferrina, receptor de insulina o RAGE). La eficacia de las moléculas de DVD-Ig puede convalidarse en modelos animales preclínicos, tales como los ratones transgénicos donde se sobreexpresa la proteína precursora amiloide o RAGE, en los cuales se desarrollan síntomas similares a los de la enfermedad de Alzheimer. Además, pueden construirse moléculas de DVD-Ig para evaluar su eficacia en los modelos animales, y las mejores DVD-Ig para aplicaciones terapéuticas pueden seleccionarse para evaluaciones en pacientes humanos. Las moléculas de DVD-Ig también pueden emplearse para el tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson. La alfa-sinucleína participa en la patología de la enfermedad de Parkinson. Una DVD-Ig capaz de

dirigirse a la alfa-sinucleína y mediadores inflamatorios como TNF, IL-1 y MCP-1 podría ser efectiva para la terapia de la enfermedad de Parkinson, y está contemplada en la invención.

7.2 Regeneración neuronal y lesiones en la médula espinal

A pesar de un incremento en el conocimiento de los mecanismos patológicos, las lesiones en la médula espinal (SCI) aún son una condición devastadora y representan una indicación médica caracterizada por una elevada necesidad médica. La mayoría de las lesiones en la médula espinal son lesiones por contusión o compresión, y la lesión primaria comúnmente es seguida por mecanismos de lesión secundarios (mediadores inflamatorios, por ejemplo, citoquinas y quimioquinas) que empeoran la lesión inicial y resultan en un agrandamiento significativo del área de la lesión, algunas veces hasta 10 veces. Estos mecanismos primarios y secundarios en las SCI son muy similares a los que presentan las lesiones cerebrales causadas por otros medios, por ejemplo, la apoplejía. No hay un tratamiento satisfactorio, y la inyección de dosis elevadas en bolo de metilprednisolona (MP) es la única terapia usada en un período de tiempo escaso de 8 horas después de la lesión. Sin embargo, este tratamiento solamente tiene por objeto prevenir la lesión secundaria, sin provocar una recuperación funcional significativa. Ha recibido numerosas críticas debido a que carece eficacia inequívoca y presenta efectos adversos severos, por ejemplo, inmunosupresión, con infecciones subsiguientes y alteraciones histopatológicas severas en los músculos. No se han aprobadotras drogas, agentes biológicos o moléculas pequeñas que estimulen el potencial regenerativo endógeno, pero en los años recientes, se han descubierto principios de tratamiento y drogas candidatas prometedores

que presentan eficacia en modelos animales de SCI. En gran medida, la falta de recuperación funcional en las SCI humanas es causada por factores que inhiben el crecimiento de las neuritas en los sitios de las lesiones, el tejido de las cicatrices, la mielina y las células asociadas con la lesión. Estos factores son las proteínas asociadas con la mielina NogoA, OMgp y MAG, RGM A, los CSPG (proteoglicanos de condroitín sulfato) asociados con las cicatrices y los factores inhibidores en los astrocitos reactivos (algunas semaforinas y efrinas). Sin embargo, en el sitio de la lesión no solamente se hallan moléculas inhibidoras, sino también factores que estimulan el crecimiento de las neuritas, tales como neurotrofinas, laminina, L1, y otros. Este conjunto de moléculas inhibidoras y promotoras del crecimiento de las neuritas puede explicar que los factores bloqueadores individuales, tales como NogoA o RGM A, resultaran en una recuperación funcional significativa en modelos de SCI en roedores, debido a que una reducción de las influencias de inhibición podría desviar el equilibrio desde la inhibición del crecimiento hacia la promoción del crecimiento. Sin embargo, las recuperaciones observadas con el bloqueo de una sola molécula inhibidora del desarrollo de las neuritas no fueron completas. Para obtener recuperaciones más veloces y más pronunciadas, se desearían dos moléculas bloqueadoras del desarrollo de las neuritas, por ejemplo, Nogo y RGM A, o una molécula bloqueadora del desarrollo de las neuritas y una molécula potenciadora de las funciones de las moléculas bloqueadoras del desarrollo de las neuritas, por ejemplo, Nogo y las neurotrofinas, o una molécula bloqueadora del desarrollo de las neuritas por ejemplo, Nogo, y una molécula proinflamatoria, por ejemplo, TNF (véanse McGee AW, et al., Trends Neurosci. 2003;26:193; Marco Domeniconi, et al., J Neurol Sci. 2005;233:43; Milan

Makwana1, et al., FEBS J. 2005;272:2628; Barry J. Dickson, Science. 2002;298:1959; Felicia Yu Hsuan Teng, et al., J Neurosci Res. 2005;79:273; Tara Karnezis, et al., Nature Neuroscience 2004; 7, 736; Gang Xu, et al., J. Neurochem. 2004; 91; 1018).

En un aspecto, se proveen DVD-Ig capaces de unirse a pares de blancos, tales como NgR y RGM A; NogoA y RGM A; MAG y RGM A; OMGp y RGM A; RGM A y RGM B; CSPGs y RGM A; agrecán, midquina, neurocán, versicán, fosfacán, Te38 y TNF-α; anticuerpos específicos para globulómeros Aβ combinados con anticuerpos promotores de la brotación de dendritas y axones. La patología de las dendritas es una señal muy temprana de la AD, y se sabe que NOGO A restringe el crecimiento de las dendritas. Es posible combinar este tipo de anticuerpos con cualquiera de los anticuerpos candidatos para las SCI (proteínas de la mielina). Otras DVD-Ig blanco pueden incluir cualquier combinación de NgR-p75, NgR-Troy, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR-Lingo, Lingo-Troy, Lingo-p75, MAG u Omgp. Adicionalmente, los blancos también pueden incluir cualquier mediador, soluble o de la superficie celular, que participe en la inhibición de las neuritas, por ejemplo, Nogo, Ompg, MAG, RGM A, semaforinas, efrinas, A-b soluble, citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-1), quimioquinas (por ejemplo, MIP 1a), moléculas que inhiben la regeneración de los nervios. La eficacia de moléculas anti-nogo/anti-RGM A o moléculas de DVD-Ig similares puede convalidarse en modelos animales preclínicos de lesiones en la médula espinal. Además, pueden construirse moléculas de DVD-Ig para evaluar su eficacia en los modelos animales, y las mejores DVD-Ig para aplicaciones terapéuticas pueden seleccionarse para evaluaciones en pacientes humanos. Además, pueden construirse moléculas

de DVD-Ig dirigidas a dos sitios de unión a ligandos diferentes en un mismo receptor, por ejemplo, el receptor Nogo, que se une a tres ligandos Nogo, Ompg y MAG, y RAGE, que se une a A-b y S100 A. Además, los inhibidores del desarrollo de las neuritas, por ejemplo, nogo y el receptor de nogo, también pueden participar en la prevención de la regeneración de los nervios en enfermedades inmunológicas como la esclerosis múltiple. Se ha demostrado que la inhibición de la interacción entre nogo y el receptor de nogo mejora la recuperación en modelos animales de esclerosis múltiple. Entonces, las moléculas de DVD-Ig que puedan bloquear la función de un mediador inmune, por ejemplo, una citoquina como IL-12, y una molécula inhibidora del desarrollo de las neuritas, por ejemplo, nogo RGM, podrán ofrecer mayor velocidad y eficacia que el bloqueo separado inmune o de una molécula inhibidora del desarrollo de las neuritas.

En general, los anticuerpos no atraviesan la barrera hematoencefálica (BBB) de un modo eficaz y relevante. Sin embargo, en ciertas enfermedades neurológicas, por ejemplo, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática, esclerosis múltiple, etc., la BBB puede estar comprometida y permitir una penetración aumentada de DVD-Igs y anticuerpos al cerebro. En otras condiciones neurológicas, en donde no ocurre la filtración de BBB, uno puede emplear la selección de blanco de sistemas de transporte endógeno, que incluyen transportadores mediados por transportador tales como transportadores de glucosa y aminoácidos y estructuras/receptores celulares mediadores de transcitosis mediada por receptor en el endotelio vascular de la BBB, permitiendo de este modo el transporte trans-BBB de las DVD-Ig. Las estructuras en la BBB que permiten dicho transporte incluyen a modo de

ejemplo ilustrativo al receptor de insulina, receptor de transferrina, LRP y RAGE. Adicionalmente, estrategias permiten el uso de DVD-Igs también como transportes para transportar drogas potenciales en el SNC que incluye drogas de bajo peso molecular, nanopartículas y ácidos nucleicos (Coloma MJ, *et al.* (2000) Pharm Res. 17(3):266-74; Boado RJ, *et al.* (2007) Bioconjug. Chem. 18(2):447-55).

8. Trastornos oncológicos

La terapia con anticuerpos monoclonales ha emergido como una modalidad terapéutica importante para el cáncer (von Mehren M, et al 2003 . Annu Rev Med.;54:343-69). Los anticuerpos pueden presentar efectos antitumorales mediados por la inducción de la apoptosis, la redirección de la citotoxicidad, la interferencia con interacciones entre ligandos y receptores, o la prevención de la expresión de proteínas críticas para el fenotipo neoplástico. Además, los anticuerpos pueden atacar componentes del microambiente tumoral, lo que resulta en la alteración de estructuras vitales, por ejemplo, la formación de vasculatura asociada con los tumores. Los anticuerpos también pueden atacar receptores cuyos ligandos son factores de crecimiento, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico. De esta manera, el anticuerpo inhibe el direccionamiento de los ligandos naturales que estimulan el crecimiento celular hacia las células tumorales. Como alternativa, los anticuerpos pueden inducir una red anti-idiotípica, la citotoxicidad mediada por el complemento la citotoxcidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). El uso de anticuerpos con especificidad dual dirigidos a dos mediadores tumorales separados probablemente tenga beneficios adicionales, en comparación con una terapia monoespecífica.

En otra forma de realización, una DVD-Ig de la invención es capaz de unirse al VEGF y la fosfatidilserina; VEGF y ErbB3; VEGF y PLGF; VEGF y ROBO4; VEGF y BSG2; VEGF y CDCP1; VEGF y ANPEP; VEGF y c-MET; HER-2 y ERB3; HER-2 y BSG2; HER-2 y CDCP1; HER-2 y ANPEP; EGFR y CD64; EGFR y BSG2; EGFR y CDCP1; EGFR y ANPEP; IGF1R y PDGFR; IGF1R y VEGF; IGF1R y CD20; CD20 y CD74; CD20 y CD30; CD20 y DR4; CD20 y VEGFR2; CD20 y CD52; CD20 y CD4; HGF y c-MET; HGF y NRP1; el HGF y la fosfatidilserina; ErbB3 e IGF1R; ErbB3 e IGF1,2; c-Met y Her-2; c-Met y NRP1; c-Met e IGF1R; IGF1,2 y PDGFR; IGF1,2 y CD20; IGF1,2 e IGF1R; IGF2 y EGFR; IGF2 y HER2; IGF2 y CD20; IGF2 y VEGF; IGF2 e IGF1R; IGF1 e IGF2; PDGFRa y VEGFR2; PDGFRa y PLGF; PDGFRa y VEGF; PDGFRa y c-Met; PDGFRa y EGFR; PDGFRb y VEGFR2; PDGFRb y c-Met; PDGFRb y EGFR; RON y c-Met; RON y MTSP1; RON y MSP; RON y CDCP1; VGFR1 y PLGF; VGFR1 y RON; VGFR1 y EGFR; VEGFR2 y PLGF; VEGFR2 y NRP1; VEGFR2 y RON; VEGFR2 y DLL4; VEGFR2 y EGFR; VEGFR2 y ROBO4; VEGFR2 y CD55; LPA y S1P; EPHB2 y RON; CTLA4 y VEGF; CD3 y EPCAM; CD40 e IL6; CD40 e IGF; CD40 y CD56; CD40 y CD70; CD40 y VEGFR1; CD40 y DR5; CD40 y DR4; CD40 y APRIL; CD40 y BCMA; CD40 y RANKL; CD28 y MAPG; CD80 y CD40; CD80 y CD30; CD80 y CD33; CD80 y CD74; CD80 y CD2; CD80 y CD3; CD80 y CD19; CD80 y CD4; CD80 y CD52; CD80 y VEGF; CD80 y DR5; CD80 y VEGFR2; CD22 y CD20; CD22 y CD80; CD22 y CD40; CD22 y CD23; CD22 y CD33; CD22 y CD74; CD22 y CD19; CD22 y DR5; CD22 y DR4; CD22 y VEGF; CD22 y CD52; CD30 y CD20; CD30 y CD22; CD30 y CD23; CD30 y CD40; CD30 y VEGF; CD30 y CD74; CD30 y CD19; CD30 y DR5; CD30 y DR4; CD30 y VEGFR2; CD30 y CD52; CD30 y

CD4; CD138 y RANKL; CD33 y FTL3; CD33 y VEGF; CD33 y VEGFR2; CD33 y CD44; CD33 y DR4; CD33 y DR5; DR4 y CD137; DR4 e IGF1,2; DR4 e IGF1R; DR4 y DR5; DR5 y CD40; DR5 y CD137; DR5 y CD20; DR5 y EGFR; DR5 e IGF1,2; DR5 e IGFR, DR5 y HER-2, EGFR y DLL4. Otras combinaciones de blancos incluyen uno más miembros de la familia del EGF/erb-2/erb-3. Otros blancos (uno más) que participan en enfermedades oncológicas a los que pueden unirse las DVD-Ig incluyen, sin limitaciones los que se seleccionan del grupo que consiste en CD52, CD20, CD19, CD3, CD4, CD8, BMP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, TNF, TNFSF10, BMP6, EGF, FGF1, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GRP, IGF1, IGF2, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, INHA, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, VEGF, CDK2, FGF10, FGF18, FGF2, FGF4, FGF7, IGF1R, IL2, BCL2, CD164, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, GNRH1, IGFBP6, IL1A, IL1B, ODZ1, PAWR, PLG, TGFB1I1, AR, BRCA1, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, E2F1, EGFR, ENO1, ERBB2, ESR1, ESR2, IGFBP3, IGFBP6, IL2, INSL4, MYC, NOX5, NR6A1, PAP, PCNA, PRKCQ, PRKD1, PRL, TP53, FGF22, FGF23, FGF9, IGFBP3, IL2, INHA, KLK6, TP53, CHGB, GNRH1, IGF1, IGF2, INHA, INSL3, INSL4, PRL, KLK6, SHBG, NR1D1, NR1H3, NR1I3, NR2F6, NR4A3, ESR1, ESR2, NR0B1, NR0B2, NR1D2, NR1H2, NR1H4, NR1I2, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR5A1, NR5A2, NR6A1, PGR, RARB, FGF1, FGF2, FGF6, KLK3, KRT1, APOC1, BRCA1, CHGA, CHGB, CLU, COL1A1, COL6A1, EGF, ERBB2, ERK8, FGF1, FGF10, FGF11, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF2, FGF20,

FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GNRH1, IGF1, IGF2, IGFBP3, IGFBP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, INSL3, INSL4, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, MMP2, MMP9, MSMB, NTN4, ODZ1, PAP, PLAU, PRL, PSAP, SERPINA3, SHBG, TGFA, TIMP3, CD44, CDH1, CDH10, CDH19, CDH20, CDH7, CDH9, CDH1, CDH10, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH7, CDH8, CDH9, ROBO2, CD44, ILK, ITGA1, APC, CD164, COL6A1, MTSS1, PAP, TGFB1I1, AGR2, AIG1, AKAP1, AKAP2, CANT1, CAV1, CDH12, CLDN3, CLN3, CYB5, CIC1, DAB2IP, DES, DNCL1, ELAC2, ENO2, ENO3, FASN, FLJ12584, FLJ25530, GAGEB1, GAGEC1, GGT1, GSTP1, HIP1, HUMCYT2A, IL29, K6HF, KAI1, KRT2A, MIB1, PART1, PATE, PCA3, PIAS2, PIK3CG, PPID, PR1, PSCA, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, STEAP, STEAP2, TPM1, TPM2, TRPC6, ANGPT1, ANGPT2, ANPEP, ECGF1, EREG, FGF1, FGF2, FIGF, FLT1, JAG1, KDR, LAMA5, NRP1, NRP2, PGF, PLXDC1, STAB1, VEGF, VEGFC, ANGPTL3, BAI1, COL4A3, IL8, LAMA5, NRP1, NRP2, STAB1, ANGPTL4, PECAM1, PF4, PROK2, SERPINF1, TNFAIP2, CCL11, CCL2, CXCL1, CXCL10, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL9, IFNA1, IFNB1, IFNG, IL1B, IL6, MDK, EDG1, EFNA1, EFNA3, EFNB2, EGF, EPHB4, FGFR3, HGF, IGF1, ITGB3, PDGFA, TEK, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFBR1, CCL2, CDH5, COL18A1, EDG1, ENG, ITGAV, ITGB3, THBS1, THBS2, BAD, BAG1, BCL2, CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CDH1 (E-caderina), CDKN1B (p27Kip1), CDKN2A (p16INK4a), COL6A1, CTNNB1 (b-catenina), CTSB (catepsina B), ERBB2 (Her-2), ESR1, ESR2, F3 (TF), FOSL1 (FRA-1), GATA3, GSN (gelsolina), IGFBP2, IL2RA, IL6, IL6R, IL6ST (glicoproteína 130), ITGA6 (integrina a6), 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, AZGP1 (cinc-a-glicoproteína), BPAG1 (plectina), CDKN1A (p21Wap1/Cip1), CLDN7 (claudina-7), CLU (clusterina), ERBB2 (Her-2), FGF1, FLRT1 (fibronectina), GABRP (GABAa), GNAS1, ID2, ITGA6 (integrina a6), ITGB4 (integrina b 4), KLF5 (GC Box BP), KRT19 (queratina 19), KRTHB6 (queratina específica para el cabello tipo II), MACMARCKS, MT3 (metalotionectina-III), MUC1 (mucina), PTGS2 (COX-2), RAC2 (p21Rac2), S100A2, SCGB1D2 (lipofilina B), SCGB2A1 (mamaglobina 2), SCGB2A2 (mamaglobina 1), SPRR1B (Spr1), THBS1, THBS2, THBS4, y TNFAIP2 (B94), RON, c-Met, CD64, DLL4, PLGF, CTLA4, fosfatidilserina, ROBO4, CD80, CD22, CD40, CD23, CD28, CD80, CD55, CD38, CD70, CD74, CD30, CD138, CD56, CD33, CD2, CD137, DR4, DR5, RANKL, VEGFR2, PDGFR, VEGFR1, MTSP1, MSP, EPHB2, EPHA1, EPHA2, EpCAM, PGE2, NKG2D, LPA, SIP, APRIL, BCMA, MAPG, FLT3, PDGFR alfa, PDGFR beta, ROR1, PSMA, PSCA, SCD1 y CD59.

IV. Composiciones farmacéuticas

En la invención también se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden las peroteínas de unión de la invención son para usar, sin limitaciones, en el diagnóstico, la detección o el monitoreo de un trastorno, en la prevención, el tratamiento, el manejo el alivio de un trastorno, o uno más de sus síntomas, y/o en la investigación. En una forma de realización específica, una composición comprende una o más proteínas de unión de la invención. En

otra forma de realización, la composición farmacéutica comprende una o más proteínas de unión de la invención, y uno más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de las proteínas de unión de la invención, para tratar un trastorno. En una forma de realización, los agentes profilácticos o terapéuticos conocidos por ser de utilidad o que se han usado que actualmente se usan en la prevención, el tratamiento, manejo alivio de un trastorno uno más síntomas de éste. De acuerdo con estas formas de realización, la composición puede comprender además un vehículo, diluyente o excipiente.

Las proteínas de unión de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende una proteína de unión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como lo se usa en la presente documentación, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los solventes, los medios de dispersión, los recubrimientos, los agentes antibacterianos y antifúngicos, los agentes isotónicos y los agentes que demoran de absorción, y semejantes, que sean compatibles con el uso fisiológico. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno más entre agua, salina, salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y semejantes, así como combinaciones éstos. En algunas formas de realización, en la composición se incluyen agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o soluciones amortiguadoras, que mejoran la vida útil o eficacia del anticuerpo una porción de anticuerpo.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar uno más anticuerpos de la invención o la combinación de uno más anticuerpos de la invención y un agente profiláctico agente terapéutico de utilidad para prevenir, manejar, tratar o aliviar un trastorno uno más síntomas de éste, por ejemplo, encapsulamiento en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por un receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Además, puede emplearse la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o un nebulizador, y la formulación con un agente para una aplicación en aerosol. Véase, por ejemplo, las Patentes de los EEUU Nº 6019968 5985320 5985309 5934272 5874064 5855913 5290540 y 4880078; y las Publicaciones PCT Nº WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903. En una forma de realización, se administra una proteína de unión de la invención, una terapia combinada o una composición de la invención usando la tecnología de liberación pulmonar de drogas Alquermes AIR® (Alquermes, Inc., Cambridge, Mass). En una forma de realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse por cualquier ruta apropiada, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc), y

pueden administrarse en combinación con otros agentes con actividad biológica. La administración puede ser sistémica o local.

En una forma de realización, puede usarse la unión específica de nanotubos de carbono unidos a anticuerpos (CNT) a células tumorales in vitro, seguida por su ablación altamente específica con luz infrarroja cercana (NIR), para realizar el direccionamiento hacia las células tumorales. Por ejemplo, pueden usarse lípidos polares biotinilados para preparar dispersiones estables, biocompatibles y no citotóxicas de CNT, las cuales posteriormente son unidas a uno dos DVD-Ig neutralizadoras derivatizadas con avidina, dirigidas contra uno más antígenos tumorales (por ejemplo, CD22) (Chakravarty, P. et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:8697-8702.

En una forma de realización específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención localmente en el área que necesita del tratamiento; esto puede efectuarse, por ejemplo, y sin limitaciones, mediante infusión local, inyección o por medio de un implante, donde dicho implante es de un material poroso no poroso, incluyendo membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel®) o matrices de colágeno. En una forma de realización, se administra una cantidad eficaz de uno más anticuerpos de la invención antagonistas localmente en el área afectada a un sujeto para prevenir, tratar, manejar y/o aliviar un trastorno un síntoma de éste. En otra forma de realización, se administra una cantidad eficaz de uno más anticuerpos de la invención localmente en el área afectada en combinación con una cantidad eficaz de una o más terapias (por ejemplo, uno más agentes profilácticos o terapéuticos) distintas de la proteína de unión de la invención de

un sujeto para prevenir, tratar, manejar y/o aliviar un trastorno uno más síntomas de éste.

En otra forma de realización, el agente profiláctico terapéutico puede liberarse en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida. En una forma de realización, puede usarse una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (véase Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra forma de realización, pueden usarse materiales poliméricos para efectuar la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véanse, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (editores), CRC Pres., Boca Raton, FL (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (editores), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; véanse también Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 7 1:105); la Patente de los EEUU Nº 5679377; la Patente de los EEUU Nº 5916597; la Patente de los EEUU Nº 5912015; la Patente de los EEUU Nº 5989463; la Patente de los EEUU Nº 5128326; la Publicación PCT Nº WO 99/15154; y la Publicación PCT Nº WO 99/20253. Entre los ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida, se incluyen, sin limitaciones, poli(2-hidroxietilmetacrilato), poli(metilmetacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etilen-co-vinilacetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilácticos (PLA), poli(láctido-co-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. En una forma de realización, el polímero usado en la

formulación de liberación sostenida es inerte, está libre de impurezas lixiviables, el estable al almacenamiento, estéril y biodegradable. »En aún otra forma de realización, puede colocarse un sistema de liberación controlada o sostenida en la proximidad de un blanco profiláctico terapéutico, de modo que se requiera solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, mencionado con anterioridad, volumen 2, páginas 115-138 (1984)).

Los sistemas de liberación controlada se describen en la revisión de Langer (1990, *Science* 249:1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por aquellos versados en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno más agentes terapéuticos de la invención. Véanse, por ejemplo, la Patente de los EEUU N° 4526938, la Publicación PCT WO 91/05548, la Publicación PCT WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotheraphy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Largo-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polimeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, y Lam *et al.*, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759- 760.

En una forma de realización específica, cuando la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico terapéutico, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión del

agente profiláctico terapéutico que codifica si se lo construye como parte de un vector de expresión de ácidos nucleicos apropiado y se lo administra de modo de que se torne intracelular, por ejemplo, con el uso de un vector retroviral (véase la Patente de los EEUU Nº 4980286), por inyección directa, usando un bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont) o un recubrimiento con lípidos o receptores superficiales celulares o agentes de transfección, o administrándolo en combinación con un péptido semejante a homeobox del que se sepa que ingresa al núcleo (véase, por ejemplo, Joliot *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868). Como alternativa, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente y puede incorporarse en el ADN de la célula huésped para su expresión mediante recombinación de homólogos.

La composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su ruta de administración pretendida. Entre los ejemplos de rutas de administración, se incluyen, sin limitaciones, la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, por inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosal, y rectal. En una forma de realización específica, la composición se formula de acuerdo con los procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a sujetos humanos. Típicamente, las composiciones para una administración intravenosa son soluciones en solución amortiguadora acuosa isotónica estéril. Cuando fuera necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico local, tal como lignocamina, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la invención serán administradas tópicamente, las composiciones pueden formularse en la forma de un ungüento, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, spray, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por aquellos versados en la técnica. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences y Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19ª edición, Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). En una forma de realización, para las formas de dosificación tópica no atomizables, se emplean formas entre viscosas y semisólidas o sólidas, que comprenden un vehículo uno más excipientes compatibles con la aplicación tópica, y que tienen una viscosidad dinámica mayor que el agua. Entre las formulaciones apropiadas se incluyen, sin limitaciones, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, bálsamo, y semejantes, que son, se desea, esterilizados o mezclados con agentes auxiliares por ejemplo, preservantes, estabilizadores, agentes de humectación, amortiguadores o sales) para afectar distintas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica apropiadas incluyen preparaciones rociables en aerosol donde el ingrediente activo, en una forma de realización, en combinación con un vehículo inerte sólido líquido, está envasado con una sustancia volátil a presión (por ejemplo, un propelente gaseoso, tal como freón), o se halla en una botella que puede accionarse a presión. Si se lo desea, también pueden agregarse hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación. Los ejemplos de dichos ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si el método de la invención comprende una administración intranasal de una composición, la composición pueden formularse en la forma de un

aerosol, rocío, niebla o en la forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para su uso de acuerdo con la presente invención pueden administrarse convenientemente bajo la forma de una presentación como rocío en aerosol, a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente apropiado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede ser determinada con una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos (compuestos, por ejemplo, por gelatina) pueden formularse para usar en un inhalador o un insuflador que contenga una mezcla del polvo del compuesto con una base de polvo apropiada, tal como lactosa o almidón.

Si el método de la invención comprende la administración oral, las composiciones pueden formularse por vía oral en forma de tabletas, cápsulas, sellos, cápsulas de gelatina, soluciones, suspensiones, y semejantes. Las tabletas o las cápsulas pueden prepararse por medios convencionales, con agentes excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato ácido de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de papa o glicolato sodio de almidón); o agentes de humectación (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Las tabletas pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de soluciones, jarabes o suspensiones, sin

limitaciones, o pueden presentarse como un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo apropiado antes de usarlas. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse utilizando medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tal como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para una administración oral pueden formularse convenientemente para una liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de uno más agentes profilácticos o terapéuticos.

El método de la invención puede comprender la administración pulmonar, por ejemplo, con el uso de un inhalador o un nebulizador, de una composición formulada con un agente para la aplicación en aerosol. Véase, por ejemplo, las Patentes de los EEUU Nº 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 y 4880078; y las Publicaciones PCT Nº WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903. En una forma de realización específica, se administra una proteína de unión de la invención, una terapia combinada y/o una composición de la invención usando la tecnología de liberación pulmonar de drogas Alquermes AIR® (Alquermes, Inc., Cambridge, Mass).

El método de la invención puede comprender la administración de una composición formulada para la administración parenteral por inyección (por

ejemplo, por inyección en bolo infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o recipientes con dosificaciones múltiples) con adición de un conservante. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos al aceite o acuosos, y pueden contener agentes de la formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el principio activo puede tomar la forma de un polvo para reconstituir con un vehículo apropiado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de usarlo.

Además, los métodos de la invención pueden comprender la administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, en forma subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos apropiados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles (por ejemplo, como una sal moderadamente soluble).

Los métodos de la invención abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen aquellas formadas con aniones, tales como aquellos derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etcétera, y aquellos formados con cationes, tales como aquellos derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etcétera.

Por lo general, los ingredientes de las composiciones se proveen en forma separada o mezclados en una unidad de forma de dosificación, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco un concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o un saché donde se indica la cantidad de agente activo. En los casos en que el modo de administración sea la infusión, la composición podrá administrarse con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando el modo de administración es por inyección, puede proveerse una ampolla de agua para inyección o salina estéril para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En particular, en la invención también se provee uno más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención envasadas en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o saché donde se indica la cantidad del agente. En una forma de realización, dichos uno más agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas, de la invención, son suministrados como un polvo liofilizado seco esterilizado un concentrado sin agua en un recipiente herméticamente sellado y puede reconstituirse (por ejemplo, con agua o salina) a la concentración apropiada para su administración a un sujeto. En una forma de realización, uno más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención son suministrados como un polvo liofilizado seco estéril en un recipiente herméticamente sellado a una unidad dosificación de al menos 5 mg, al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las

composiciones farmacéuticas de la invención deberían guardarse a una temperatura entre 2° C y 8° C en su recipiente original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas, de la invención deberían administrarse dentro de una 1 semana, por ejemplo, dentro de los 5 días, dentro de las 72 horas, dentro de las 48 horas, dentro de las 24 horas, dentro de las 12 horas, dentro de las 6 horas, dentro de las 5 horas, dentro de las 3 horas o dentro de 1 hora después de su reconstitución. En una forma de realización alternativa, uno más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención, se proveen en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente en el que se indica la cantidad y la concentración del agente. En una forma de realización, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente herméticamente sellado a por lo menos 0,25 mg/ml, al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe almacenarse a una temperatura de entre 2°C y 8°C en su recipiente original.

Las proteínas de unión de la invención pueden incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para una administración parenteral. En una forma de realización, el anticuerpo las porciones de anticuerpos se prepararán como una solución inyectable que contiene 0,1-250 mg/ml de proteína de unión. La solución inyectable puede estar compuesta por una forma de dosificación líquida o liofilizada en un recipiente, una ampolla o una jeringa de color sílex o ámbar llenada con antelación. La solución amortiguadora puede ser L-histidina (entre 1 y 50 mM), óptimamente entre 5 y 10 mM, a pH

entre 5,0 y 7,0 (óptimamente a pH 6,0). Otras soluciones amortiguadoras adecuadas incluyen, sin limitaciones, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio fosfato de potasio. Puede usarse cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución, en una concentración de entre 0 y 300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Pueden incluirse crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente sacarosa en una proporción de entre 0 y 10% (óptimamente entre 0,5 y 1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Pueden incluirse agentes de relleno para una forma de dosificación liofilizada, principalmente manitol 1-10% (preferiblemente 2-4%). Pueden usarse estabilizadores en formas de dosificación líquidas y liofilizadas, principalmente L-metionina 1-50 mM (preferiblemente 5-10 mM). Otros agentes de relleno adecuados incluyen glicina y arginina, que pueden incluirse en ambos casos a una concentración de 0-0,05%, y polisorbato-80 (preferiblemente incluido en una concentración de 0,005-0,01%). La composición farmacéutica que comprende las proteínas de unión de la invención preparadas como una solución inyectable para una administración parenteral, pueden comprender además un agente de utilidad como un adyuvante, tal como los que se usan para incrementar la absorción, o dispersión de una proteína terapéutica (por ejemplo, un anticuerpo). En particular, un adyuvante útil es la hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa recombinante humana). La adición de hialuronidasa a la solución inyectable mejora la biodisponibilidad para los humanos después de la administración parenteral, particularmente la administración subcutánea. »También permite volúmenes mayores en el sitio de inyección (es decir, más

de 1 ml) con menos dolor e incomodidad, y una incidencia mínima de reacciones en el sitio de la inyección. (véanse W02004078140, US2006104968).

Las composiciones de esta invención pueden encontrarse en diversas formas. Éstas incluyen, por ejemplo, las formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como las soluciones líquidas (por ejemplo, las soluciones inyectables y para infusión), las dispersiones o las suspensiones, las tabletas, las píldoras, los polvos, los liposomas y los supositorios. La forma elegida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica pretendidas. Las composiciones típicas toman la forma de soluciones inyectables o para infusión, tales como composiciones similares a las que se usan para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El modo de administración elegido es el parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En una forma de realización, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra forma de realización, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Típicamente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables bajo las condiciones de elaboración y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración de droga alta. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles por incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno una combinación de los ingredientes enumerados en la presente, según necesidad, seguido por filtración estéril. Por lo general, las dispersiones se preparan

mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes que necesarios enumerados en la presente. En el caso de polvos liofilizados estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado por vacío y secado por aspersión que permite obtener un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada de forma estéril de ésta. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante el uso de agentes tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede efectuarse incluyendo en la composición un agente que demora la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las proteínas de unión de la presente invención pueden administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, en una forma de realización, la ruta/el modo de administración es la inyección subcutánea, la inyección intravenosa o la infusión. Como han de poder apreciarlo aquellos versados en la técnica, la ruta y/o modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. En ciertas formas de realización, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá el compuesto de la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tal como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico.

Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o generalmente son conocidos por aquellos versados en la técnica. Véase, por ejemplo, *Sustained y Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.O. Robinson, editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En determinadas formas de realización, la proteína de unión de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se lo desea) también pueden incluirse en cápsulas de gelatina dura o blanda, presionar en comprimidos o incorporar directamente a la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y usar en la forma de tabletas masticables, tabletas para disolución bucal, comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y semejantes. Para administrar un compuesto de la invención por otra vía que no sea la parenteral puede ser necesario recubrir el compuesto coadministrar el compuesto con un material que impida su inactivación.

También pueden incorporarse compuestos activos adicionales en las composiciones. En determinadas formas de realización, una proteína de unión de la invención se coformula y/o se coadministra con uno más agentes terapéuticos que son útiles para tratar trastornos con una proteína de unión de la invención. Por ejemplo, una proteína de unión de la invención puede coformularse y/o coadministrarse con uno más anticuerpos adicionales que se unen a otros blancos (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citoquinas o que se unen a moléculas de la superficie celular). Aún más, puede usarse uno más anticuerpos de la invención en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos precedentes. Dichas terapias combinadas pueden

emplear ventajosamente dosificaciones menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de esa manera posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En determinadas formas de realización, una proteína de unión está unida a un vehículo extensor de la vida media conocido en la técnica. Dichos vehículos incluyen, sin limitaciones, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Dichos vehículos se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de los EEUU con Nº de Acta 09/428082 y la publicación de Solicitud PCT Nº WO 99/25044.

En una forma de realización específica, las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de unión de la invención u otro agente profiláctico terapéutico de la invención son administradas con el fin de tratar, prevenir, manejar o aliviar un trastorno uno más síntomas de éste por medio de una terapia de genes. La terapia de genes hace referencia a una terapia que comprende la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado que puede expresarse. En esta forma de realización de la invención, los ácidos nucleicos producen el anticuerpo el agente profiláctico terapéutico de la invención codificado, que produce un efecto profiláctico terapéutico.

Pueden usarse cualquiera de los métodos de terapia de genes disponibles en la técnica de acuerdo con la presente invención. Para hallar revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926- 932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; Mayo, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215. Los métodos comúnmente

conocidos en la técnica para la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel et al. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &Sons, Nueva York (1993); y Kriegler, Gene Transfer y Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, Nueva York (1990). Se presenta una descripción detallada de los distintos métodos de terapia génica en US20090297514.

Las proteínas de unión de la invención son útiles para tratar diversas enfermedades donde son perjudiciales los blancos que son reconocidos por las proteínas de unión. Tales trastornos incluyen, sin limitaciones, artritis, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de intestino inflamatoria, diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis, escleroderma, enfermedad de injerto versus huésped, rechazo de transplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con el transplante de órganos, sarcoidosis, ateroesclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis crónica activa, uveítis, shock séptico, síndrome de shock tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, accidente cerebrovascular, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, formas malignas, insuficiencia cardiaca, infarto de miocardio, enfermedad de Addison,

esporádica, deficiencia poliglandular tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria de adultos (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriática, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropática, artropatía asociada con clamidia, yersinia y salmonella, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arterioesclerosis, alergia atópica, enfermedad bullosa autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliácea, penfigoide, enfermedad por IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica Coombs positiva, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad *Royal Free*, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, síndrome de la enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, hepatitis B, hepatitis C, inmunodeficiencia común variada (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, esterilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, pneumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedades del tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada con enfermedades del tejido conectivo mixtas, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémicas, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada con 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 inducida por drogas, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterans, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar linfocítica infiltrante, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo-1 (hepatitis autoinmune o lupoide clásica), hepatitis autoinmune tipo-2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM), hipoglucemia autoinmune, resistencia a insulina tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con el transplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada con el transplante de órganos, osteoartrosis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, esterilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad al esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria a una enfermedad del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjorgren, enfermedad de Takayasu/arteritis, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroide autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primaria, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitiligo, enfermedad hepática aguda, enfermedad hepática crónica, cirrosis alcohólica, daño hepático inducido por alcohol, colestasis, enfermedad hepática idiosincrática, hepatitis inducida por drogas, esteatohepatitis no alcohólica,

alergia y asma, infección por estreptococos grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas por tipo Th2 y tipo Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), y distintos tipos de cáncer tales como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal y formas malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma), abetalipoproteinemia, acrocianosis, aguda y procesos parasitarios o infecciosos crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos aéreos, complejo de demencia del SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis por contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo a aloinjertos, déficit de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina pectoris, degeneración de células del asta anterior, terapia anti cd3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arterioesclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), taquicardia auricular, bloqueo aurículoventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto óseo, rechazo de transplante de médula ósea (BMT), bloqueo de ramas de haz de His, linfoma de Burkitt, acidez estomacal, arritmias cardiacas, síndrome de *atontamiento* cardiaco, tumores cardiacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación a una derivación [*bypass*] cardiopulmonar, rechazo al transplante de cartílago, degeneraciones de la corteza del cerebelo, trastornos del cerebelo, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados con una quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia

linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), intoxicación crónica por salicilato, carcinoma colorrectal, insuficiencia cardiaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis por contacto, cor pulmonale, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis con cultivo negativo, fibrosis quística, trastornos asociados con una terapia con citoquinas, demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre hemorrágica del dengue, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad ateriosclerótica diabética, enfermedad de cuerpos difusos de Lewy, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos del ganglio basal, síndrome de Down en la edad madura, trastornos del movimiento inducidos por drogas que bloquean los receptores de dopamina del CNS, sensibilidad a drogas, eczema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por el virus Epstein-Barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y del cerebelo, linfohistiocitosis hematofagocítica familiar, rechazo al implante de timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos funcionales de las arterias periféricas, sepsis fúngicas, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo a injertos de cualquier órgano tejido, sepsis Gram-negativa, sepsis Gram-positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hallerrorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre del heno, rechazo al transplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias del haz de His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimientos hiperquinéticos, reacciones de hipersensibilidad, pneumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos de movimientos hipoquinéticos,

evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, toxicidad mediada por anticuerpos, astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza a, exposición a radiación ionizante, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesiones por reperfusión isquémica, accidente cerebrovascular isquémico, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo al transplante de riñón, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo al transplante de hígado, linfedema, malaria, linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococcemia, metabólica/idiopática, migraña cefalea, trastorno mitocondrial multisistémico, enfermedad del tejido conectivo mixto, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, síndrome mielodiplástico, infarto de miocardio, trastornos isquémicos del miocardio, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar neonatal crónica, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofias musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma no Hodgkin, oclusión de la aorta abdominal y ramas de ésta, trastornos arteriales oclusivos, terapia okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo al transplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna, rechazo al transplante de paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad del pericardio, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía neumocistitis carinii,

neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal y síndrome de cambios de piel), síndrome de post-perfusión, síndrome postbomba, síndrome de cardiotomía post-MI, preeclampsia, parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación, fenómeno y enfermedad de Raynaud, enfermedad de Raynaud, enfermedad de Refsums, taquicardia por QRS estrecho regular, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, demencia senil de tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, shock, anemia de células falsiformes, rechazo de aloinjertos de piel, síndrome de cambios de piel, rechazo al transplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelosas, miositis estreptococcica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxia sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumatoide juvenil de comienzo sistémico, células T o FAB ALL, telangiectasia, tromboangitis obliterans, trombocitopenia, toxicidad, transplantes, traumatismo/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades de las válvulas cardiacas, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis vital/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico asociado a virus, síndrome Wernicke-Korsakoff, síndrome Wilson, rechazo a xenoinjertos de cualquier órgano tejido (véanse Peritt et al., Publicación PCT N°

WO2002097048A2, Leonard et al., Publicación PCT Nº WO9524918 A1, y Salfeld et al., Publicación PCT Nº WO00/56772A1).

Las DVD-Igs de la invención también pueden tratar una o más de las siguientes enfermedades: síndromes coronarios agudos, polineuritis idiopática aguda, poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still de adultos, alopecia areata, anafilaxis, síndrome anticuerpo anti-fosfolipídico, anemia aplástica, arteriosclerosis, eczema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con infección por estreptococo, pérdida auditiva autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, trombocitopenia autoinmune (AITP), blefaritis, bronquiectasis, penfigoide ampolloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolipídico catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, penfigoide cicatricial, síndrome aislado clínico (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno psiquiátrico al inicio de la infancia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, Diabetes mellitus, hernia de disco, prolapsos de disco, anemia hemolítica inmune inducida por drogas, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, Episcleritis, Eritema multiforme, eritema multiforme mayor, pengifoide gestacional, síndrome de Guillain-Barré (GBS), Fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad idiopática de Parkinson, pneumonia idiopática intersticial, alergia mediada por IgE, anemia hemolítica inmune, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad inflamatoria ocular infecciosa, enfermedad desmielinizante inflamatoria, enfermedad inflamatoria del corazón, enfermedad inflamatoria del riñón, IPF/UIP, Iritis, queratitis, queratoconjuntivitis

seca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, histiocitosis de células de Langerhan, reticularis Livedo, degeneración macular, cánceres, poliangitis microscópica, Morbus Bechterev, trastornos neuromotores, pengifoide de membrana mucosa, falla multiorgánica, Miastenia Gravis, síndrome mielodisplásico, miocarditis, trastornos de las raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis no A no B, neuritis óptica, osteolisis, cáncer de ovario, ARJ pauciarticular, enfermedad oclusiva de arteria periférica (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad arterial periférica (PAD), flebitis, Poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), Policondritis, Polimialgia reumática, Poliosis, ARJ poliarticular, síndrome de deficiencia poliendócrina, Polimiositis, polimialgia reumática (PMR), síndrome postbomba, parkinsonismo primario, cáncer de próstata y rectal y cánceres hematopoyéticos (leucemia y linfoma), prostatitis, aplasia pura de glóbulos rojos, insuficiencia adrenal primaria, neuromielitis óptica recurrente, restenosis, enfermedad cardíaca reumática, SAPHO (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostosis, y osteitis), escleroderma, amiloidosis secundaria, pulmón de shock, escleritis, ciática, insuficiencia adrenal secundaria, enfermedad de tejido conectivo asociado a siliconas, dermatosis de Sneddon-Wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrolisis epidérmica tóxica, mielitis transversa, TRAPS (receptor del factor de necrosis tumoral, reacción alérgica Tipo 1, diabetes tipo II, urticaria, pneumonia intersticial común (UIP), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH), degeneración macural húmeda, y sanado de heridas.

Las proteínas de unión de la invención pueden usarse para tratar seres humanos que sufren de enfermedades autoinmunes, en particular las que están asociadas con una inflamación, incluyendo, artritis reumatoide, espondilitis, alergia, diabetes autoinmune, uveítis autoinmune. En una forma de realización, las proteínas de unión de la invención, o las porciones de unión al antígeno de éstas, se usan para tratar artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de insulina y psoriasis.

En una forma de realización, las enfermedades que pueden ser tratadas o diagnosticadas con las composiciones y los métodos de la invención incluyen, sin limitaciones, cánceres primarios y metastáticos, 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 cuello uterino, útero y ovarios, y también el coriocarcinoma y la enfermedad trofoblástica gestacional), tracto genital masculino (incluyendo próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de las células germinales), glándulas endocrinas (incluyendo las glándulas tiroides, adrenal y pituitaria), y piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluyendo los que surgen de tejidos óseos y blandos, y también el sarcoma de Kaposi), tumores de cerebro, los nervios, los ojos y las meninges (incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, Schwannomas y meningiomas), tumores sólidos que surgen de tumores malignos hematopoyéticos, tales como leucemias y linfomas (linfomas de Hodgkin y no Hodgkin).

En una forma de realización, los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión al antígeno de éstos, se usan para tratar un cáncer o en la prevención de metástasis de los tumores que se describen en la presente documentación, ya sea solos o en combinación con radioterapia y/u otros agentes quimioterapéuticos.

En otra forma de realización, una DVD-Ig de la invención se une a un agente profiláctico o terapéutico y una proteína celular, proveyendo de este modo la administración de droga localizada a un órgano, tejido o célula, o clase de tejidos o células blanco específico. En una forma de realización, la DVD-Ig se une a un antígeno de superficie celular y un agente profiláctico o terapéutico. El agente profiláctico o terapéutico es útil para prevenir, manejar, tratar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, por ejemplo, partículas liposomales, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que tienen la capacidad de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, células madre, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432), péptido, ácido nucleico (por ejemplo, ADN antisentido o ARN u otras terapias genéticas), ácido nucleico peptídico (PNA), nanopartícula, agente radioterapéutico, retrovirus u otro vector, antibacteriano, antiviral, antiparasitario, u otro agente antifúngico, agentes antineoplásicos, agente quimioterapéutico, tal como agentes alquilantes de ADN, cisplatino, carboplatino, agentes antitubulina, paclitaxel, docetaxel, taxol, doxorubicina, gemcitabina, gemzar, antraciclinas, adriamicina, inhibidores de topoisomerasa I, inhibidores de topoisomerasa II, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorin, irinotecan, inhibidores de receptor tirosina quinasa (por ejemplo, erlotinib, gefitinib), inhibidores de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), inhibidores

de quinasa, y siRNA, droga(s) antiinflamatoria(s) supresora(s) de citoquinas (CSAIDs).

En una forma de realización, las DVD-Igs de la invención se unen a metotrexato, 6-MP, azatioprina sulfasalazina, mesalazina, olsalazina cloroquinina/hidroxicloroquina, pencilamina, aurotiomalato, azatioprina, colchicina, corticosteroides, agonistas de adrenoreceptor beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeteral), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromil, ketotifeno, ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetilo, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tal como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con señalización por citoquinas proinflamatorias tales como TNF-α o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de IRAK, NIK, IKK , p38 o MAP kinase), inhibidores de enzima convertidora de IL-1b, inhibidores de enzima convertidora de TNFα (TACE), inhibidores de señalización de células T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquinas y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores solubles de p55 o p75 TNF y los derivados p75TNFRIgG (EnbrelTM y p55TNFRIgG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), factores de crecimiento, citoquinas, proteínas citotóxicas (por ejemplo, TNF), citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFb), celecoxib, ácido fólico, sulfato de hidroxicloroquina, rofecoxib, anticuerpos o un derivado o conjugado del mismo (por ejemplo, infliximab o rituximab), naproxeno, valdecoxib, sulfasalazina, metilprednisolona, meloxicam,

acetato de metilprednisolona, tiomalato sódico de oro, aspirina, triamcinolona acetonida, propoxifeno napsilato/apap, folato, nabumetona, diclofenac, piroxicam, etodolac, diclofenac sódico, oxaprozin, oxicodona HCl, hidrocodona bitartrato/apap, diclofenac sódico/misoprostol, fentanilo, anaquinra, recombinante humano, tramadol HCl, salsalato, sulindac, cianocobalamina/fa/piridoxina, acetaminofeno, alendronato sódico, prednisolona, sulfato de morfina, clorhidrato de lidocaína, indometacina, sulfato de glucosamina/condroitin, amitriptilina HCl, sulfadiazina, oxicodona HCl/acetaminofeno, olopatadina HCl, 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.

En otra forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a droga(s) antiinflamatoria(s) no esteroidea(s) (NSAIDs); droga(s) antiinflamatoria(s) supresoras de citoquinas (CSAIDs); anticuerpos o derivados o conjugados de los mismos [por ejemplo, CDP-571/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNFα humanizado; Celltech/Bayer); cA2/infliximab (anticuerpos anti-TNFα quimérico; Centocor); 75 kdTNFR-IgG/etanercept (75 kD proteína fusión receptor de TNF-IgG; Immunex); 55 kdTNF-IgG (55 kD TNF proteína fusión receptor-IgG; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (anticuerpo anti-CD4 primatizado no deplecionante; IDEC/SmithKline; DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteínas de fusión IL-2; Seragen); Anti-Tac (anti-IL-2Ra humanizado; Protein Design Labs/Roche)]; IL-4 (citoquina antiinflamatoria; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante, citoquina antiinflamatoria; DNAX/Schering); IL-4; agonistas de IL-10 y/o IL-4 (por ejemplo, anticuerpos

agonistas); IL-1RA (antagonista de receptor de IL-1; Synergen/Amgen); anaquinra (Kineret®/Amgen); TNF-bp/s-TNF (proteína de unión a TNF soluble); R973401 (inhibidor de fosfodiesterasa Tipo IV); MK-966 (inhibidor de COX-2); Iloprost; metotrexato; talidomida y drogas relacionadas con talidomida (por ejemplo, Celgen); leflunomida (antiinflamatoria e inhibidor de citoquina); ácido tranexámico (inhibidor de activación de plasminógeno); T-614 (inhibidor de citoquina); prostaglandina E1); Tenidap (droga antiinflamatoria no esteroide); Naproxeno (droga antiinflamatoria no esteroide); Meloxicam (droga antiinflamatoria no esteroide); Ibuprofeno (droga antiinflamatoria no esteroide); Piroxicam (droga antiinflamatoria no esteroide); Diclofenac (droga antiinflamatoria no esteroide); Indometacina (droga antiinflamatoria no esteroide); Sulfasalazina; Azatioprina); inhibidor de ICE inhibidor (inhibidor de enzima convertidora de enzima interleuquina-1b); inhibidor de zap-70 y/o lck (inhibidor de la tirosina quinasa zap-70 o lck); inhibidor de VEGF y/o inhibidor de VEGF-R (inhibidores del factor de crecimiento celular endotelial vascular o receptor del factor de crecimiento celular endotelial vascular; inhibidores de angiogénesis); drogas antiinflamatorias corticosteroides (por ejemplo, SB203580); inhibidores de TNF-convertasa; anticuerpos anti-IL-12 o anti-IL-18 o derivados o conjugados de los mismos; interleuquina-11; interleuquina-13; inhibidores de interleuquina-17; oro; penicilamina; cloroquina; clorambucilo; hidroxicloroquina; ciclosporina; ciclofosfamida; irradiación linfoide total; globulina anti-timocito o anticuerpos anti-CD4 o derivados o conjugados de los mismos; CD5-toxinas; péptidos administrados oralmente y colágeno; lobenzarit disódico; agentes reguladores de citoquinas (CRAs) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); fosforotioato oligo-desoxinucleótidos ICAM-1

antisentido (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor soluble 1 del complemento (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; polisulfato de glicosaminoglicano; minociclina; anticuerpos anti-IL2R o derivados o conjugados del mismo; lípidos marinos y botánicos (ácidos grasos de peces y semillas de plantas; véase por ejemplo, DeLuca *et al.* (1995) Rheum. Dis. Clin. North Am. 21:759-777); auranofina; fenilbutazona; ácido meclofenámico; ácido flufenámico; inmunoglobulina intravenosa; zileuton; azaribina; ácido micofenólico (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicina); amiprilos (terafectina); cladribina (2-clorodeoxiadenosina); metotrexato; inhibidores de Bcl-2 (véase Bruncko, Milan *et al.*, Journal of Medicinal Chemistry (2007), 50(4), 641-662); agentes antivirales y inmunomoduladores.

En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a uno de los siguientes agentes para el tratamiento de artritis reumatoide, por ejemplo, pequeña molécula inhibidora de KDR, pequeña molécula inhibidora de Tie-2; metotrexato; prednisona; celecoxib; ácido fólico; sulfato de hidroxicloroquina; rofecoxib; etanercept o infliximab o derivados o conjugados de los mismos; leflunomida; naproxeno; valdecoxib; sulfasalazina; metilprednisolona; ibuprofeno; meloxicam; acetato de metilprednisolona; tiomalato sódico de oro; aspirina; azatioprina; triamcinolona acetonida; propoxifeno napsilato/apap; folato; nabumetona; diclofenac; piroxicam; etodolac; diclofenac sódico; oxaprozin; oxicodona HCl; hidrocodona bitartrato/apap; diclofenac sódico/misoprostol; fentanilo; anaquinra, recombinante humana; tramadol HCl; salsalato; sulindac; cianocobalamina/fa/piridoxina; acetaminofeno; alendronato sódico; prednisolona; sulfato de morfina; clorhidrato de lidocaína; indometacina; sulfato de glucosamina/condroitin; amitriptilina HCl; sulfadiazina; oxicodona

HCl/acetaminofeno; olopatadina HCl; misoprostol; naproxeno sódico; omeprazol; micofenolato de mofetilo, ciclofosfamida; rituximab o derivados o conjugados del mismo; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-Ig o derivados o conjugados del mismo; IL-18 BP; IL-12/23; anti-IL-18 o derivados o conjugados del mismo; anti-IL15 o derivados o conjugados del mismo; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; Roflumilast; IC-485; CDC-801; y mesopram.

En otra forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para la enteropatía inflamatoria, por ejemplo, budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipoxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas de receptores de IL-1; mAbs anti-IL-1b o derivados o conjugados del mismo; mAbs anti-IL-6 o derivados o conjugados del mismo; factores de crecimiento; inhibidores de elastasa; compuestos piridinil-imidazol; anticuerpos contra o antagonistas de otras citoquinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF o derivados o conjugados de los mismos.

En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69 como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con señalización por citoquinas

proinflamatorias tales como TNF-α o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de IRAK, NIK, IKK , p38 o MAP kinase), inhibidores de enzima convertidora de IL-1b, inhibidores de enzima convertidora de TNFα (TACE), inhibidores de señalización de células T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquinas y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores solubles de p55 o p75 TNF, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) y citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFb), e inhibidores de Bcl-2.

En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para la enfermedad de Crohn, por ejemplo, antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, Adalimumab (Publicación PCT No. WO 97/29131; Humira), CA2 (Remicade), CDP 571, construcciones TNFR-Ig, (p75TNFRIgG (Enbrel) y p55TNFRIgG (Lenercept)) inhibidores o derivados o conjugados de los mismos e inhibidores de PDE4. En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a corticosteroides, por ejemplo, budenosida y dexametasona. En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico y olsalazina, y agentes que interfieren con la síntesis o acción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1b y IL-1ra. En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a inhibidores de la señalización de células T, por ejemplo, 6-mercaptopurinas inhibidoras de tirosina quinasa. En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a IL-11. En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a mesalamina, prednisona, azatioprina, mercaptopurina, infliximab o derivados o

conjugados de los mismos, succinato de metilprednisolona sódica, difenoxilato/atrop sulfato, clorhidrato de loperamida, metotrexato, omeprazol, folato, ciprofloxacina/dextrosa-agua, bitartrato de hidrocodona/apap, clorhidrato de tetraciclina, fluocinonida, metronidazol, timerosal/ácido bórico, colestiramina/sacarosa, clorhidrato de ciprofloxacina, sulfato de hiosciamina, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de midazolam, oxicodona HCl/acetaminofeno, clorhidrato de prometazina, fosfato sódico, sulfametoxazol/trimetoprim, celecoxib, policarbopilo, napsilato de propoxifeno, hidrocortisona, multivitaminas, balsalazida disódica, fosfato de codeína/apap, colesevelam HCl, cianocobalamina, ácido fólico, levofloxacin, metilprednisolona, natalizumab o derivados o conjugados de los mismos e interferón-alfa, interferón-beta, e interferón-gamma.

En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para esclerosis múltiple, por ejemplo, corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón-b1a (AVONEX; Biogen); interferón-b1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferón a-n3) (Interferon Sciences/Fujimoto), interferón-a (Alfa Wassermann/J&J), interferón b1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), Peginterferón a 2b (Enzon/Schering-Plough), Copolímero 1 (Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; clabribina; anticuerpos contra o antagonistas de otras citoquinas humanas o factores de crecimiento 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 o derivados o conjugados de los mismos. En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a

moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con señalización por citoquinas proinflamatorias tales como TNF-α o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de IRAK, NIK, IKK , p38 o MAP kinase), inhibidores de enzima convertidora de IL-1b, inhibidores TACE, inhibidores de señalización de células T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima convertidora de angiotensina, receptores solubles de citoquinas y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores solubles de p55 o p75 TNF, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) y citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFb), e inhibidores de Bcl-2.

En otra forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para esclerosis múltiple, por ejemplo, interferón-b, por ejemplo, IFNb1a y IFNb1b; copaxona, corticosteroides, inhibidores de caspasa, por ejemplo inhibidores de caspasa-1, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF, y anticuerpos dirigidos contra CD40 y CD80, y derivados o conjugados de los mismos.

En otra forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a los siguientes agentes o derivados o conjugados de los mismos: alemtuzumab, dronabinol, Unimed, daclizumab, mitoxantrona, clorhidrato de xaliprodeno,

fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinnabidol, a-inmunoquina NNSO3, ABR-215062, AnergiX.MS, antagonistas de receptores de quimoquinas, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulado en liposomas), THC.CBD (agonistas canabinoides) MBP-8298, mesopram (inhibidor de PDE4), MNA-715, anticuerpo anti-receptor de IL-6, neurovax, pirfenidona allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, talampanel, teriflunomida, TGF-beta2, tiplimotida, antagonistas de VLA-4 (por ejemplo, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), antagonistas de interferón gamma, agonistas de IL-4.

En otra forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para angina de pecho, por ejemplo, nitroglicerina, mononitrato de isosorbida, succinato de metoprolol, atenolol, tartrato de metoprolol, besilato de amlodipina, clorhidrato de diltiazem, dinitrato de isosorbida, bisulfato de clopidogrel, nifedipina, atorvastatin cálcico, cloruro de potasio, furosemida, simvastatin, verapamil HCl, digoxina, clorhidrato de propranolol, carvedilol, lisinopril, espironolactona, hidroclorotiazida, maleato de enalapril, nadolol, ramipril, enoxaparina sódica, heparina sódica, valsartan, clorhidrato de sotalol, fenofibrato, ezetimibe, bumetanida, losartan potásico, lisinopril/ hidroclorotiazida, felodipina, captopril, fumarato de bisoprolol.

En otra forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para espondilitis anquilosante, por ejemplo, ibuprofeno, diclofenac y misoprostol, naproxeno, meloxicam, indometacina, diclofenac, celecoxib, rofecoxib, Sulfasalazina, Metotrexato, azatioprina, minociclina, prednisona, etanercept, infliximab, y derivados o conjugados de los mismos.

En otra forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para asma, por ejemplo, albuterol, salmeterol/fluticasona, montelukast sódico, propionato de fluticasona, budesonida, prednisona, xinafoateo de salmeterol, levalbuterol HCl, sulfato de albuterol/ipratropio, fosfato de prednisolona sódica, triamcinolona acetonida, dipropionato de beclometasona, bromuro de ipratropio, azitromicina, acetato de pirbuterol, prednisolona, teofillina anhidra, succinato de metilprednisolona, claritromicina, zafirlukast, fumarato de formoterol, vacuna de virus influenza, metilprednisolona, trihidrato de amoxicilina, flunisolida, inyección para alergia, cromolin sódico, clorhidrato de fexofenadina, flunisolida/mentol, amoxicilina/clavulanato, levofloxacina, promotor de la inhalación, guaifenesina, fosfato de dexametasona sódica, moxifloxacina HCl, hiclato de doxiciclina, guaifenesina/d-metorfano, p-efedrina/cod/clorfenir, gatifloxacina, clorhidrato de cetirizina, furoato de mometasona, xinafoato de salmeterol, benzonatato, cefalexina, pe/hidrocodona/clorfenir, cetirizina HCl/pseudoefedrina, fenilefrina/cod/prometazina, codeína/prometazina, cefprozil, dexametasona, guaifenesina/pseudoefedrina, clorfeniramina/hidrocodona, nedocromil sódico, sulfato de terbutalina, epinefrina, metilprednisolona, sulfato de metaproterenol.

En otra forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para EPOC, por ejemplo, sulfato de albuterol/ipratropio, bromuro de ipratropio, salmeterol/fluticasona, albuterol, xinafoato salmeterol, propionato de fluticasona, prednisona, teofilina anhidra, succinato de metilprednisolona sódica, montelukast sódico, budesonida, fumarato de formoterol, triamcinolona acetonida, levofloxacina, guaifenesina, azitromicina, dipropionato de beclometasona, levalbuterol HCl, flunisolida, ceftriaxona sódica, 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, Roflumilast.

En otra forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para HCV, por ejemplo, Interferón-alfa-2a, Interferón-alfa-2b, Interferón-alfa con1, Interferón-alfa-n1, interferon-alfa-2a tratado con PEG, interferón-alfa-2b tratado con PEG, ribavirina, interferón alfa-2b tratado con PEG + ribavirina, ácido ursodesoxicólico, ácido glicirrízico, Timalfasina, Maxamina, VX-497 y cualquier compuesto que es usado para tratar HCV por medio de la intervención con los siguientes blancos: polimerasa de HCV, proteasa de HCV, helicasa de HCV, IRES (sitio interno de entrada ribosomal) de HCV.

En otra forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para fibrosis pulmonar idiopática, por ejemplo, prednisona, azatioprina, albuterol, colchicina, sulfato de albuterol, digoxina, interferón gamma, succinato de metilprednisolona sódica, lorazepam, furosemida, lisinopril, nitroglicerina, espironolactona, ciclofosfamida, bromuro de ipratropio, actinomicina d, alteplasa, propionato de fluticasona, levofloxacina, sulfato de metaproterenol, sulfato de morfina, oxicodona HCl, cloruro de potasio, triamcinolona acetonida, tacrolimus anhidro, calcio, interferón-alfa, metotrexato, micofenolato de mofetilo, Interferón-gamma-1a.

En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para Infarto de miocardio, por ejemplo, aspirina, nitroglicerina,

tartrato de metoprolol, enoxaparina sódica, heparina sódica, bisulfato de clopidogrel, carvedilol, atenolol, sulfato de morfina, succinato de metoprolol, warfarina sódica, lisinopril, mononitrato de isosorbide, digoxina, furosemida, simvastatina, ramipril, tenecteplasa, maleato de enalapril, torsemida, retavasa, losartan potásico, quinapril hcl/mag carb, bumetanida, alteplasa, enalaprilat, clorhidrato de amiodarona, tirofiban hcl m-hidrato, clorhidrato de diltiazem, captopril, irbesartan, valsartan, clorhidrato de propranolol, fosinopril sódico, clorhidrato de lidocaína, eptifibatida, cefazolin sódico, sulfato de atropina, ácido aminocaproico, espironolactona, interferón, clorhidrato de sotalol, cloruro de potasio, docusato sódico, dobutamina hcl, alprazolam, pravastatina sódica, atorvastatina cálcica, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de meperidina, dinitrato de isosorbide, epinefrina, clorhidrato de dopamina, bivalirudina, rosuvastatina, ezetimibe/simvastatina, avasimibe, cariporida, células madres cardiacas, y factores de crecimiento.

En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para Psoriasis, por ejemplo, una molécula pequeña inhibidora de KDR, molécula pequeña inhibidora de Tie-2, calcipotrieno, propionato de clobetasol, acetonida de triamcinolona, propionato de halobetasol, tazaroteno, metotrexato, fluocinonida, betametasona diprop aumentada, acetonida de fluocinolona, acitretina, champú de alquitrán, valerato de betametasona, furoato de mometasona, quetoconazol, pramoxina/fluocinolona, valerato de hidrocortisona, flurandrenolida, urea, betametasona, propionato de clobetasol /emoll, propionato de fluticasona, azitromicina, hidrocortisona, fórmula humectante, acido fólico, desonida, pimecrolimus, brea de carbón, diacetato de diflorasona, folato de etanercept, ácido láctico, metoxsalena, hc/bismuto

subgal/znox/resor, acetato de metilprednisolona, prednisona, pantalla solar, halcinonida, ácido salicílico, antralina, pivalato de clocortolona, extracto de carbón, brea de carbón/ácido salicílico, brea de carbón/ácido salicílico/azufre, desoximetasona, diazepam, emollient, fluocinonida/emollient, aceite mineral/aceite de castor/na lact, aceite mineral/aceite de maní, petróleo/miristato de isopropilo, psoralena, ácido salicílico, jabón/tribromsalan, timerosal/ácido bórico, celecoxib, infliximab, ciclosporina, alefacept, efalizumab, tacrolimus, pimecrolimus, PUVA, UVB, sulfasalazina.

En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para Artritis Osoriática, por ejemplo, metotrexato, etanercept, rofecoxib, celecoxib, ácido fólico, sulfasalazina, naproxen, leflunomida, acetato de metilprednisolona, indometacina, sulfato de hidroxicloroquina, prednisona, sulindac, betametasona diprop aumentada, infliximab, metotrexato, folato, acetonida de triamcinolona, diclofenac, dimetilsulfóxido, piroxicam, diclofenac sódico, ketoprofen, meloxicam, metilprednisolona, nabumetona, tolmetina sódica, calcipotrieno, ciclosporina, diclofenac sódico/misoprostol, fluocinonida, sulfato de glucosamine, tiomalato sódico oro, bitartrato de hidrocodona/apap, ibuprofeno, risedronato sódico, sulfadiazina, tioguanina, valdecoxib, alefacept, efalizumab e inhibidores de bcl-2, o derivados o conjugados de los mismos.

En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para Restenosis, por ejemplo, sirolimus, paclitaxel, everolimus, tacrolimus, Zotarolimus, acetaminofeno.

En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes terapéuticos para Ciática, por ejemplo, bitartrato de hidrocodona/apap, rofecoxib, ciclobenzaprina hcl, metilprednisolona, naproxeno, ibuprofeno,

oxicodona hcl/acetaminofeno, celecoxib, valdecoxib, acetato de metilprednisolona, prednisona, fosfato de codeína /apap, tramadol hcl/acetaminofeno, metaxalona, meloxicam, metocarbamol, clorhidrato de lidocaína, diclofenac sódico, gabapentina, dexametasona, carisoprodol, quetorolac trometamina, indometacina, acetaminofeno, diazepam, nabumetona, oxicodona hcl, tizanidina hcl, diclofenac sódico/misoprostol, propoxifeno napsilato/apap, asa/oxicod/oxicodono ter, ibuprofeno/hidrocodona bit, tramadol hcl, etodolac, propoxifeno hcl, amitriptilina hcl, carisoprodol/codeína fos/asa, sulfato de morfina, multivitaminas, naproxeno sódico, citrato de orfenadrina, temazepam.

En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a agentes para SLE (Lupus), por ejemplo, NSAIDS, por ejemplo, diclofenac, naproxeno, ibuprofeno, piroxicam, indometacina; inhibidores de COX2, por ejemplo, Celecoxib, rofecoxib, valdecoxib; anti-malaria, por ejemplo, hidroxicloroquina; Esteroides, por ejemplo, prednisona, prednisolona, budenosida, dexametasona; citotóxicos, por ejemplo, azatioprina, ciclofosfamida, mofetilo de micofenolato, metotrexato; inhibidores de PDE4 o inhibidor de síntesis de purinas, por ejemplo Cellcept. En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a sulfasalazina, ácido 5-amino salicílico, olsalazina, Imuran y agentes que interfieren con la síntesis, producción o acción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de caspasa como inhibidores de enzima convertidora IL-1b y IL-1ra. En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a inhibidores de señalización de células T, por ejemplo, inhibidores de tirosina quinasa; o moléculas que se dirigen a moléculas de activación de células T, por ejemplo, anticuerpos de la familia de CTLA-4-Ig o

B7, o la familia PD-1. En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a anticuerpos anti IL-11 o anticitoquina, por ejemplo, fonotolizumab (anticuerpo anti-IFNg), o anticuerpos anti-receptor, por ejemplo, anticuerpo anti-receptor de IL-6 y anticuerpos anti moléculas de superficie de células B. En una forma de realización, la DVD-Ig de la invención se une a LJP 394 (abetimus), agentes que reducen o inactivan a células B, por ejemplo, anticuerpo anti-CD20, y BlyS, TNF e inhibidores de bcl-2, debido a que la sobreexpresión de bcl-2 en ratones transgénicos ha demostrado causar un fenotipo similar a lupus (véase Marquina et al. (2004) J. Immunol. 172(11), 7177-7185), por lo tanto se espera que su inhibición tenga efectos terapéuticos.

Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión al antígeno de éstos, pueden combinarse con agentes que incluyen, sin limitaciones, agentes antineoplásticos, radioterapia, quimioterapia, por ejemplo, con agentes alquilantes del ADN, cisplatina, carboplatina, agentes anti-tubulina, paclitaxel, docetaxel, taxol, doxorrubicina, gemcitabina, gemzar, antraciclinas, adriamicina, inhibidores de la topoisomerasa I, inhibidores de la topoisomerasa II, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, irinotecano, inhibidores de la tirosin quinasa receptora (por ejemplo, erlotinib, gefitinib), inhibidores de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), inhibidores de quinasas y ARNpi.

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

Una proteína de unión de la invención puede usarse sola o en combinación para tratar dichas enfermedades. Ha de comprenderse que las proteínas de unión pueden usarse solas o en combinación con un agente

adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, donde alguien con experiencia puede seleccionar dicho agente adicional según el propósito que se le desea dar. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica como útil para tratar la enfermedad o condición que se está tratando con el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que afecta la viscosidad de la composición.

También ha de comprenderse que las combinaciones que se van a incluir en la presente invención son aquellas combinaciones útiles para el propósito que se le desea dar. Los agentes que se establecen más adelante se dan con propósitos de ilustración y no con intención de ser taxativos. Las combinaciones que son parte de esta invención pueden comprender los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional elegido entre las listas que se presentarán más adelante. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición que se forma puede llevar a cabo la función que se le ha destinado.

Las combinaciones para tratar enfermedades autoinmunes e inflamatorias comprenden una o más drogas antiinflamatorias no esteroidales, también conocidas como NSAID, que incluyen drogas como el ibuprofeno. Otras combinaciones comprenden corticosteroides, incluyendo prednisolona. Los efectos colaterales bien conocidos del uso de los esteroides pueden reducirse o incluso eliminarse limitando la dosis de esteroides requerida cuando se tratan pacientes en combinación con las DVD Ig de esta invención.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para artritis reumatoide con los cuales pueden combinarse un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: droga(s) antiinflamatoria(s) supresor(as) de citoquina (CSAIDs); anticuerpos para otras citoquinas o factores de crecimiento humanos o antagonistas de éstos, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-23, interferones, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Las proteínas de unión de la invención, o las porciones de unión al antígeno de éstas, pueden combinarse con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA o sus ligandos, incluyendo CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones de agentes terapéuticos pueden interferir en distintos puntos en la cascada autoinmune e inflamatoria subsiguiente. Los ejemplos incluyen antagonistas de TNF, como anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos contra TNF, ADALIMUMAB, (Publicación PCT Nº WO 97/29131), CA2 (Remicade™), CDP 571 y receptores de TNF solubles de p55 o p75, derivados de éstos (p75TNFR1gG (Enbrel™) o p55TNFR1gG (Lenercept), y también inhibidores de la enzima convertidora de TNFα (TACE); de manera similar, inhibidores de IL-1 (inhibidores de la enzima convertidora de interleuquina-1, IL-1RA, etcétera), que pueden ser eficaces por la misma razón. Otras combinaciones incluyen la interleuquina 11. Aún otra combinación incluye participantes clave de la respuesta autoinmune que pueden actuar en paralelo, de manera dependiente o en concierto con la función de IL-12, especialmente los antagonistas de IL-18, incluyendo los anticuerpos contra IL-18 o los receptores solubles de IL-18, o las proteínas de unión a IL-18. Se ha

demostrado que la IL-12 y la IL-18 tienen funciones distinguibles superpuestas, y una combinación de antagonistas de ambas sería muy eficaz. Aún otra combinación es una de inhibidores no agotadores anti-CD4. Aún otras combinaciones incluyen antagonistas de la vía coestimulatoria de CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2), incluyendo anticuerpos, receptores solubles o ligandos antagonistas.

La proteínas de unión de la invención también pueden combinarse con agentes, tales como metotrexato, 6-MP, azatioprina, sulfasalazina, mesalazina, olsalazina, cloroquinina/hidroxicloroquina, pencilamina, aurotiomalato (intramuscular y oral), azatioprina, cochicina, corticosteroides (orales, inhalados y por inyección local), agonistas del adrenorreceptor beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeteral), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromil, cetotifeno, ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato, mofetil, leflunomida, NSAID, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides, tales como prednisolona, inhibidores de la fosfodiesterasa, agonistas de la adensosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización de citoquinas proinflamatorias, tales como TNF□ o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 o la MAP quinasa), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β, inhibidores de la enzima convertidora de TNFα (TACE), inhibidores de la señalización de las células T, tales como inhibidores de quinasas, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquinas solubles y derivados de éstos (por ejemplo, receptores solubles de p55 o p75 TNF, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citoquinas

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, oro, tiomalato de sodio, aspirina, triamcinolona, acetonida, propoxifeno, napsilato/apap, folato, nabumetona, diclofenac, piroxicam, etodolac, diclofenac sodio, oxaprozina, oxicodona HCl, bitartrato de hidrocodona/apap, diclofenac sodio/misoprostol, fentanilo, tramadol HCl, salsalato, sulindac, cianocobalamin/fa/piridoxina, acetaminofeno, alendronato sodio, prednisolona, sulfato de morfina, clorhidrato de lidocaína, indometacina, glucosamina sulf/condroitín, amitriptilina HCl, sulfadiazina, oxicodona HCl/acetaminofeno, olopatadina HCl, misoprostol, naproxeno sodio, omeprazol, ciclofosfamida, rituximab, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, anti-IL-18, Anti-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, Roflumilast, IC-485, CDC-801, y Mesopram. Las combinaciones incluyen metotrexato leflunomida, y en casos de artritis moderada o severa, ciclosporina.

Los agentes adicionales no limitativos que también pueden usarse para tratar la artritis reumática incluyen, sin limitaciones, sin limitaciones, las siguientes drogas antiinflamatorias no esteroidales (NSAID): drogas aintiinflamatorias supresoras de citoquinas (CSAID); CDP-571/BAY-10-3356 (anticuerpo humanizado anti-TNFα; Celltech/Bayer); cA2/infliximab (anticuerpo quimérico anti-TNFα; Centocor); 75 kdTNFR-IgG/etanercept (proteína de fusión de 75 kD del receptor de TNF-IgG; Immunex; véanse, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, página 295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 55 kdTNF-IgG (proteína de fusión de 55 kD del receptor de TNF-IgG; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (anticuerpo no agotador

promatizado anti-CD4; IDEC/SmithKline; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1995) Vol. 38, página 185); DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteínas de fusión de IL-2; Seragen; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1993) Vol. 36, 1223); Anti-Tac (proteína humanizada anti-IL-2Rα; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (citoquina antiinflamatoria; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante, citoquina antiinflamatoria; DNAX/Schering); IL-4; agonistas de IL-10 y/o IL-4 (por ejemplo, anticuerpos agonistas); IL-1RA (antagonista del receptor de IL-1; Synergen/Amgen); anakinra (Kineret®/Amgen); TNF-bp/s-TNF (proteína de unión a TNF soluble; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 284; *Amer. J. Physiol. - Heart y Circulatory Physiology* (1995) Vol. 268, pp. 37-42); R973401 (inhibidor de la fosfodiesterasa Tipo IV; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 282); MK-966 (inhibidor de COX-2; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 81); Iloprost (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 82); metotrexato; talidomida (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 282) y drogas relacionadas con la talidomida (por ejemplo, Celgen); leflunomida (antiinflamatorio e inhibidor de citoquinas; véanse, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 131; *Infammation Research* (1996) Vol. 45, páginas 103-107); ácido tranexámico (inhibidor de la activación de plasminógeno; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 284); T-614 (inhibidor de citoquina; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 282); prostaglandina E1 (véase, por ejemplo,

Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 282); Tenidap (droga antiinflamatoria no esteroidal; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 280); Naproxeno (droga antiinflamatoria no esteroidal; véase, por ejemplo, *Neuro Report* (1996) Vol. 7, páginas 1209-1213); Meloxicam (droga antiinflamatoria no esteroidal); Ibuprofeno (droga antiinflamatoria no esteroidal); Piroxicam (droga antiinflamatoria no esteroidal); Diclofenac (droga antiinflamatoria no esteroidal); Indometacina (droga antiinflamatoria no esteroidal); Sulfasalazina (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 281); Azatioprina (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 281); inhibidor de ICE (inhibidor de la enzima convertidora de interleuquina-1β); inhibidor de zap-70 y/o lck (inhibitor de la tirosin quinasa zap-70 o lck); inhibidor de VEGF y/o inhibidor de VEGF-O (inhibidores del factor de crecimiento del endotelio vascular o el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular; inhibidores de la angiogénesis); drogas antiinflamatorias corticosteroidales (por ejemplo, SB203580); inhibidores de la TNF-convertasa; anticuerpos anti-IL-12; anticuerpos anti-IL-18; interleuquina-11 (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 296); interleuquina-13 (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 308); inhibidores de la interleuquina-17 (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, Nº 9 (suplemento), página 120); oro; penicilamina; cloroquina; clorambucil; hidroxicloroquina; ciclosporina; ciclofosfamida; irradiación linfoide total; globulina anti-timocitos; anticuerpos anti-CD4; toxinas CD5; péptidos y colágeno de administración oral; lobenzarit disodio; los agentes reguladores de

citoquinas (CRA) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc); ICAM-1, fosforotioatoligo-desoxinucleótidos antisentido (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc); receptor soluble de complemento 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc); prednisona; orgoteína; polisulfato de glicosaminoglican; anticuerpos anti-minociclina; anticuerpos anti-IL2R; lípidos marinos y botánicos (ácidos grasos de peces y semillas de plantas; véase, por ejemplo, DeLuca *et al.* (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-777); auranofina; fenilbutazona; ácido meclofenámico; ácido flufenámico; globulina inmune intravenosa; zileuton; azaribina; ácido micofenólico (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicina); amiprilosa (terafectina); cladribina (2-clorodeoxiadenosina); metotrexato; inhibidores de bcl-2 (véase Bruncko, Milan et al., Journal of Medicinal Chemistry (2007), 50(4), 641-662); antivirales y agentes moduladores inmunes.

En una forma de realización, la proteína de unión o la porción de unión al antígeno de ésta se administra en combinación con uno de los siguientes agentes para el tratamiento de artritis reumatoide: inhibidor de moléculas pequeñas de KDR, inhibidor de moléculas pequeñas de Tie-2; metotrexato; prednisona; celecoxib; ácido fólico; sulfato de hidroxicloroquina; rofecoxib; etanercept; infliximab; lefunomida; naproxeno; valdecoxib; sulfasalazina; metilprednisolona; ibuprofeno; meloxicam; acetato de metilprednisolona; tiomalato de oro y sodio; aspirina; azatioprina; triamcinolona acetonida; napsilato de propoxifeno/apap; folato; nabumetona; diclofenac; piroxicam; etodolac; diclofenac sodio; oxaprozina; clorhidrato de oxicodona; bitartrato de hidrocodona/apap; diclofenac sodio/misoprostol; fentanilo; anakinra recombinante humano; clorhidrato de tramadol; salsalato; sulindac;

cianocobalamina/fa/piridoxina; acetaminofeno; alendronato sodio; prednisolona; sulfato de morfina; clorhidrato de lidocaína; indometacina; sulfato de glucosamina/condroitina; ciclosporina; clorhidrato de amitriptilina; sulfadiazina; clorhidrato de oxicodona/acetaminofeno; clorhidrato de olopatadina; misoprostol; naproxeno sodio; omeprazol; micofenolato mofetil; ciclofosfamida; rituximab; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-IG; IL-18 BP; IL-12/23; anti-IL 18; anti-IL 15; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; Roflumilast; IC-485; CDC-801; y mesopram.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la enfermedad intestinal inflamatoria con los cuales puede combinarse una proteína de unión de la invención incluyen los siguientes: budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de la lipooxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores del tromboxano; antagonistas del receptor de IL-1; anticuerpos monoclonales anti-IL-1β; anticuerpos monoclonales anti-IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de la elastasa; compuestos de piridinil-imidazol; anticuerpos o antagonistas de otras citoquinas o factores de crecimiento humanos, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión al antígeno de éstos, pueden combinarse con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular, tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión al antígeno de éstos, también pueden combinarse con agentes tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, mofetil micofenolato,

leflunomida, NSAID, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides, tales como prednisolona, inhibidores de la fosfodiesterasa, agonistas de la adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización de citoquinas proinflamatorias, tales como TNFα o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 o la MAP quinasa), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β, inhibidores de la enzima convertidora de TNFα, inhibidores de la señalización de las células T, tales como inhibidores de quinasas, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquinas solubles y derivados de éstos (por ejemplo, receptores solubles de p55 o p75 TNF, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), y citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ), e inhibidores de bcl-2.

Los ejemplos de agentes terapéuticos para la enfermedad de Crohn con los cuales puede combinarse una proteína de unión incluyen los siguientes: antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, ADALIMUMAB (Publicación PCT Nº WO 97/29131; HUMIRA), CA2 (REMICADE), CDP 571, construcciones de TNFR-Ig, inhibidores de p75TNFRIgG (ENBREL) y p55TNFRIgG (LENERCEPT), e inhibidores de PDE4. Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión al antígeno de éstos, pueden combinarse con corticosteroides, por ejemplo, budenosida y dexametasona. Las proteínas de unión de la invención, o las porciones de unión al antígeno de éstas, también pueden combinarse con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico y olsalazina, y agentes que interfieren con la síntesis o la acción de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de la

enzima convertidora de IL-1β e IL-1ra. Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión al antígeno de éstos, también pueden usarse con inhibidores de la señalización de las células T, por ejemplo, tirosin quinasas inhibidoras de 6-mercaptopurinas. Las proteínas de unión de la invención, o las porciones de unión al antígeno de éstas, pueden combinarse con IL-11. Las proteínas de unión de la invención, o las porciones de unión al antígeno de éstas, pueden combinarse con mesalamina, prednisona, azatioprina, mercaptopurina, infliximab, metilprednisolonsuccinato de sodio, difenoxilato/sulfato de atropina, clorhidrato de loperamida, metotrexato, omeprazol, folato, ciprofloxacina/dextrosa-agua, bitartrato de hidrocodona/apap, clorhidrato de tetraciclina, fluocinonida, metronidazol, timerosal/ácido bórico, colestiramina/sacarosa, clorhidrato de ciprofoxacina, sulfato de hiosciamina, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de oxicodona/acetaminofeno, clorhidrato de prometazina, fosfato de sodio, sulfametoxazol/trimetoprim, celecoxib, policarbofilo, napsilato de propoxifeno, hidrocortisona, multivitaminas, balsalazida disódica, fosfato de codeína/apap, clorhidrato de colesevelam, cianocobalamina, ácido fólico, levofloxacina, metilprednisolona, natalizumab e interferón-gamma.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple con los cuales pueden combinarse las proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón-β1a (AVONAX; Biogen); interferón-β1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferón α-n3) (Interferon Sciences/Fujimoto), interferón-α (Alfa Wassermann/J&J), interferón β1A-IF (Serono/Inhale

Terapeutics), Peg-interferón α 2b (Enzon/Schering-Plough), copolímero 1 (Cop-1; COPAXONA; Teva Pharmaceutical Industries, Inc); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; cladribina; anticuerpos o antagonistas de otras citoquinas o factores de crecimiento humanos, y sus receptores, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Las proteínas de unión de la invención pueden combinarse con anticuerpos contra 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 invención también pueden combinarse con agentes tales como el metotrexato, la ciclosporina, FK506, la rapamicina, el micofenolato de mofetil, la leflunomida, los NSAID, por ejemplo, el ibuprofeno, los corticosteroides, tales como la prednisolona, los inhibidores de la fosfodiesterasa, los agonistas de la adensosina, los agentes antitrombóticos, los inhibidores del complemento, los agentes adrenérgicos, los agentes que interfieren con la señalización por citoquinas proinflamatorias, tales como TNFα o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de las quinasas IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP), los inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β, inhibidores de TACE, los inhibidores de la señalización de las células T, tales como los inhibidores de quinasas, los inhibidores de metaloproteínasas, la sulfasalazina, la azatioprina, las 6-mercaptopurinas, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, los receptores de citoquinas solubles, y sus derivados (por ejemplo, receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), y las citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-13 y TGFβ) e inhibidores de bcl-2.

Los ejemplos de agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple con los cuales pueden combinarse las proteínas de unión de la invención incluyen el interferón-β, por ejemplo, IFNβ1a e IFNβ1b; la copaxona, los corticosteroides, los inhibidores de la caspasa, por ejemplo, los inhibidores de la caspasa 1, los inhibidores de IL-1, los inhibidores de TNF y los anticuerpos contra los ligandos CD40 y CD80.

Las proteínas de unión de la invención también pueden combinarse con agentes tales como alemtuzumab, dronabinol, unimed, daclizumab, mitoxantrona, clorhidrato de xaliproden, fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinnabidol, a-inmunoquina NNSO3, ABR-215062, AnergiX.MS, antagonistas del receptor de quimioquina, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulada en liposomas), THC.CBD (agonista de canabinoides) MBP-8298, mesopram (inhibidor de PDE4), MNA-715, anticuerpo contra el receptor de anti-IL-6, neurovax, pirfenidone allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, talampanel, teriflunomida, TGF-beta2, tiplimotida, antagonistas de VLA-4 (por ejemplo, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), antagonistas del interferón gamma, agonistas de IL-4.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la angina con los cuales pueden combinarse proteínas de unión de la invención incluyen los que siguen: aspirina, nitroglicerina, mononitrato de isosorbida, succinato de metoprolol, atenolol, tartrato de metoprolol, besilato de amlodipina, clorhidrato de diltiazem, dinitrato de isosorbida, bisulfato de clopidogrel, nifedipina, atorvastatina cálcica, cloruro de potasio, furosemida, simvastatina, clorhidrato de verapamil, digoxina, clorhidrato de propranolol, carvedilol, lisinopril, espironolactona, hidroclorotiazida, maleato de enalapril, nadolol, ramipril,

enoxaparina sódica, heparina sódica, valsartán, clorhidrato de sotalol, fenofibrato, ezetimibe, bumetanida, losartán potásica, lisinopril/hidroclorotiazida, felodipina, captopril, fumarato de bisoprolol.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la espondilitis anquilosante con los cuales pueden combinarse proteínas de unión de la invención incluyen los que siguen: ibuprofeno, diclofenac y misoprostol, naproxeno, meloxicam, indometacina, diclofenac, celecoxib, rofecoxib, sulfasalazina, metotrexato, azatioprina, minociclina, prednisona, etanercept, infliximab.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para el asma con los cuales pueden combinarse las proteínas de unión de la invención incluyen los que siguen: albuterol, salmeterolfluticasona, montelukast sodio, propionato de futicasona, budesonida, prednisona, xinafoato de salmeterol, clorhidrato de levalbuterol, sulfato de albuterol/ipratropio, prednisolona fosfato sodio, triamcinolona acetonida, dipropionato de beclometasona, bromuro de ipratropio, azitromicina, acetato de pirbuterol, prednisolona, teofilina anhidra, metilprednisolona succinato sodio, claritromicina, zafirlukast, fumarato de formoterol, vacuna del virus de la influenza, metilprednisolona, amoxicilina trihidrato, funisolida, inyección por alergia, cromolin sodio, clorhidrato de fexofenadina, funisolida/mentol, amoxicilina/clavulanato, levofloxacina, dispositivo asistente de inhaladores, guaifenesina, dexametasona fosfato sodio, clorhidrato de moxifloxacina, doxiciclina hidrato, guaifenesina/d-metorfan, p-efedrina/cod/clorfenir, gatifloxacina, clorhidrato de cetirizina, furoato de mometasona, xinafoato de salmeterol, benzonatato, cefalexina, pe/hidrocodona/clorfenir, clorhidrato de cetirizina/pseudoefedrina,

fenilefrina/cod/prometazina, codeína/prometazina, cefprozil, dexametasona, guaifenesina/pseudoefedrina, clorfeniramina/hidrocodona, nedocromil sodio, sulfato de terbutalina, epinefrina, metilprednisolona, sulfato de metaproterenol.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la COPD con los cuales pueden combinarse proteínas de unión de la invención incluyen los que siguen: sulfato de albuterol/ipratropio, bromuro de ipratropio, salmeterol/futicasona, albuterol, xinafoato de salmeterol, propionato de fluticasona, prednisona, teofilina anhidra, metilprednisolona succinato sodio, montelukast sodio, budesonida, fumarato de formoterol, triamcinolona acetonida, levofoxacina, guaifenesina, azitromicina, dipropionato de beclometasona, clorhidrato de levalbuterol, flunisolida, ceftriaxona sódica, amoxicilina trihidrato, gatifoxacina, 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, (O,O)-formoterol, TgAAT, cilomilast, rofumilast.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para el HCV con los cuales pueden combinarse proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: interferón-α-2a, interferón-α-2b, interferón-α con1, interferón-α-n1, interferón-α-2a tratado con PEG, interferón-α-2b tratado con PEG, ribavirina, peginterferon alfa-2b + ribavirina, ácido ursodesoxicólico, ácido glicirrícico, timalfasina, Maxamina, VX-497 y cualquier compuesto que se utilice para tratar HCV con intervención con los siguientes objetivos: polimerasa del HCV, proteasa del HCV, helicasa del HCV, e IRES del HCV (sitio de entrada interna del ribosoma).

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la fibrosis pulmonar idiopática con los cuales pueden combinarse proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: prednisona, azatioprina, albuterol, colchicina, albuterol sulfato, digoxina, gamma interferón, metilprednisolona sod succ, lorazepam, furosemide, lisinoprilo, nitroglicerina, espironolactona, ciclofosfamida, bromuro de ipratropio, actinomicina d, alteplase, propionato de fluticasona, levofloxacina, metaproterenol sulfato, sulfato de morfina, oxicodona HCl, cloruro de potasio, triancinolona acetonida, tacrolimus anhidro, calcio, interferón-α, metotrexato, micofenolato mofetilo, interferón-gamma-1β.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para el infarto de miocardio con los cuales pueden combinarse proteínas de unión de la invención incluyen los que siguen: aspirina, nitroglicerina, tartrato de metoprolol, enoxaparina sódica, heparina sódica, bisulfato de clopidogrel, carvedilol, atenolol, sulfato de morfina, succinato de metoprolol, warfarina sódica, lisinopril, mononitrato de isosorbida, digoxina, furosemida, simvastatina, ranapril, tenecteplase, maleato de enalapril, torsemida, retavase, losartán potásica, clorhidrato de quinapril/mag carb, bumetanida, alteplase, enalaprilat, clorhidrato de amiodarona, clorhidrato de tirofiban m-hidrato, clorhidrato de diltiazem, captopril, irbesartán, valsartán, clorhidrato de propranolol, fosinopril sodio, clorhidrato de lidocaína, eptifibatida, cefazolina sódica, sulfato de atropina, ácido aminocaproico, espironolactona, interferón, clorhidrato de sotalol, cloruro de potasio, docusato sodio, clorhidrato de dobutamina, alprazolam, pravastatina sódica, atorvastatina cálcica, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de meperidina, dinitrato de isosorbida, epinefrina,

clorhidrato de dopamina, bivalirudina, rosuvastatina, ezetimibe/simvastatina, avasimibe, cariporida.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la psoriasis con los cuales pueden combinarse proteínas de unión de la invención incluyen los que siguen: inhibidor de moléculas pequeñas de KDR, inhibidor de moléculas pequeñas de Tie-2, calcipotrieno, propionato de clobetasol, triamcinolona acetonida, propionato de halobetasol, tazaroteno, metotrexato, fluocinonida, dipropionato de betametasona aumentada, fluocinolona acetonida, acitretina, champú de alquitrán, valerato de betametasona, furoato de mometasona, ketoconazol, pramoxina/fuocinolona, valerato de hidrocortisona, furandrenolida, urea, betametasona, propionato de clobetasol/emoll, propionato de fluticasona, azitromicina, hidrocortisona, fórmula humectante, ácido fólico, desonida, pimecrolimus, alquitrán de carbón, diacetato de diforasona, folato de etanercept, ácido láctico, metoxsalén, hc/bismuto subgal/znox/resor, acetato de metilprednisolona, prednisona, pantalla solar, halcinonida, ácido salicílico, antralina, pivalato de clocortolona, extracto de carbón, alquitrán de carbón/ácido salicílico, alquitrán de carbón/ácido salicílico/azufre, desoximetasona, diazepam, emoliente, fluocinonida/emoliente, aceite mineral/aceite de castor/na lact, aceite mineral/aceite de maní, petróleo/miristato de isopropilo, psoralén, ácido salicílico, jabón/tribromsalán, timerosal/ácido bórico, celecoxib, infiximab, ciclosporina, alefacept, efalizumab, tacrolimus, pimecrolimus, PUVA, UVB, sulfasalazina.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la artritis psoriásica con los cuales pueden combinarse proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: metotrexato, etanorcept, rofecoxib, celecoxib,

ácido fólico, sulfasalazina, naproxeno, leflunomide, acetato de metilprednisolona, indometacina, sulfato de hidroxicloroquina, prednisona, sulindac, betametasona diprop aumentada, infliximab, metotrexato, folato, triancinolona acetonida, diclofenac, dimetilsulfóxido, piroxicam, diclofenac sodio, ketoprofeno, meloxicam, metilprednisolona, nabumetona, tolmetín sodio, calcipotrieno, ciclosporina, diclofenac sodio/misoprostol, fluocinonide, sulfato de glucosamina, tiomalato sodio con oro, hidrocodona bitartrato/apap, ibuprofeno, risedronato sodio, sulfadiazina, tioguanina, valdecoxib, alefacept y efalizumab e inhibidores de bcl-2.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la restenosis con los cuales pueden combinarse las proteínas de la invención incluyen los siguientes: sirolimus, paclitaxel, everolimus, tacrolimus, Zotarolimus, acetaminofeno.

Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la ciática con los cuales pueden combinarse proteínas de unión de la invención incluyen los siguientes: hidrocodona bitartrato/apap, rofecoxib, ciclobenzaprina HCl, metilprednisolona, naproxeno, ibuprofeno, oxicodona HCl/acetaminofeno, celecoxib, valdecoxib, acetato de metilprednisolona, prednisona, fosfato de codeína/apap, tramadol HCl/acetaminofeno, metaxalona, meloxicam, metocarbamol, clorhidrato de lidocaína, diclofenac sodio, gabapentin, dexametasona, carisoprodol, ketorolac trometamina, indometacina, acetaminofeno, diazepam, nabumetona, oxicodona HCl, tizanidina HCl, diclofenac sodio/misoprostol, propoxifeno napsilato/apap, asa/oxicod/oxicodona ter, ibuprofeno/hidrocodona bit, tramadol HCl, etodolac, propoxifeno HCl,

amitriptilina HCl, carisoprodol/codeína fos/asa, sulfato de morfina, multivitaminas, naproxeno sodio, citrato de orfenadrina, temazepam.

Los ejemplos de agentes terapéuticos para SLE (lupus) con los cuales pueden combinarse proteínas de unión de la invención incluyen los que siguen: NSAID, por ejemplo, diclofenac, naproxeno, ibuprofeno, piroxicam, indometacina; inhibidores de COX_2, por ejemplo, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib; drogas anti-malaria, por ejemplo, hidroxicloroquina; esteroides, por ejemplo, prednisona, prednisolona, budenosida, dexametasona; citotóxicos, por ejemplo, azatioprina, ciclofosfamida, micofenolato mofetil, metotrexato; inhibidores de PDE4 o un inhibidor de la síntesis de purina, por ejemplo Cellcept. Las proteínas de unión de la invención también pueden combinarse con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, olsalazina, Imuran y agentes que interfieren con la síntesis, producción o acción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de caspasa como inhibidores de la enzima convertidora de IL-1β e IL-1ra. Las proteínas de unión de la invención también pueden usarse con inhibidores de la señalización de las células T, por ejemplo, inhibidores de la tirosin quinasa, o moléculas dirigidas a la activación de las células T, por ejemplo, CTLA-4-IgG o anticuerpos de la familia anti-B7, anticuerpos de la familia anti-PD-1. Las proteínas de unión de la invención pueden combinarse con IL-11 o anticuerpos anti-citoquinas, por ejemplo, fonotolizumab (un anticuerpo anti-IFNg) o anticuerpos anti-receptores, por ejemplo, un anticuerpo anti-receptor de IL-6 y anticuerpos contra moléculas en la superficie de las células B. Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión al antígeno de éstos, también pueden usarse con LJP 394 (abetimus), agentes que agotan o inactivan las células B,

por ejemplo, Rituximab (un anticuerpo anti-CD20), linfostat-B (un anticuerpo anti-BlyS), antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, Adalimumab (Publicación PCT Nº WO 97/29131; HUMIRA), CA2 (REMICADE), CDP 571, construcciones de TNFR-Ig (p75TNFRIgG (ENBREL) y p55TNFRIgG (LENERCEPT)), e inhibidores de bcl-2, ya que se ha demostrado que la sobreexpresión de bcl-2 en ratones transgénicos provoca un fenotipo similar al lupus (véase Marquina, Regina et al., Journal of Immunology (2004), 172(11), 7177-7185), por lo que se espera que su inhibición tenga efectos terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad eficaz para el uso terapéutico" o una "cantidad eficaz para el uso profiláctico" de una proteína de unión de la invención. Una "cantidad eficaz para el uso terapéutico" hace referencia a una cantidad eficaz, con las dosificaciones y por los períodos de tiempo necesarios para obtener el resultado terapéutico deseado. Aquellos versados en la técnica han de poder determinar la cantidad eficaz para el uso terapéutico de la proteína de unión, la cual puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y peso del individuo, y la capacidad de la proteína de unión de generar la respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz para el uso terapéutico también es una con la que cualquier efecto tóxico perjudicial del anticuerpo la porción de anticuerpo será superado por los efectos terapéuticos beneficiosos. Una "cantidad eficaz para el uso profiláctico" hace referencia a una cantidad eficaz, con las dosificaciones y por los períodos de tiempo necesarios para obtener el resultado profiláctico deseado. Típicamente, debido a que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes o en una etapa más temprana de la

enfermedad, la cantidad eficaz para el uso profiláctico será menor que la cantidad eficaz para el uso terapéutico.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proveer la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente, según lo indican las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y mayor uniformidad de dosificación. La forma de dosificación individual, como se la usa en la presente documentación, hace referencia a unidades físicamente discretas, apropiadas para dosificaciones individuales en los sujetos mamíferos a tratar; donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico que se requiera. La especificación para la forma de dosificación individual de la invención está dictada y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico profiláctico particular que se desea obtener, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de las composiciones de un compuesto activo tal para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Un ejemplo de rango no limitativo de una cantidad eficaz para el uso terapéutico profiláctico de una proteína de unión de la invención comprende 0,1-20 mg/kg, por ejemplo, 1-10 mg/kg. Se debe tener en cuenta que los valores de la dosificación pueden variar con el tipo y la severidad de la condición a aliviar. También ha de comprenderse que, para un sujeto en

particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el correr del tiempo, de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación que se indican en la presente solamente se presentan a modo de ejemplo y no tienen la intención de limitar el alcance o la práctica de la composición que se reivindica.

Para aquellos versados en la técnica, ha de ser evidente que es posible realizar modificaciones y adaptaciones apropiadas a los métodos de la invención que se describen en la presente usando equivalentes apropiados, sin apartarse del alcance de la invención o las formas de realización que se describen en la presente documentación. La presente invención ha sido descripta en detalle, y será más fácil de comprender al hacer «referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen solamente con fines ilustrativos y no para limitar la invención.

V. Diagnóstico

La exposición de la presente documentación también provee aplicaciones diagnósticas. Esto se explica con mayor detalle a continuación.

I. Método de Ensayo

La presente exposición también provee un método para determinar la presencia, cantidad o concentración de un analito (o fragmento del mismo) en una muestra de prueba usando al menos una DVD-Ig como se describe en la presente documentación. En el método se puede usar cualquier ensayo apropiado conocido en el arte. Entre los ejemplos se incluye a, pero no como limitación, inmunoensayo, tal como inmunoensayo en sandwich (por ejemplo, inmunoensayos en sandwich monoclonal, policlonal y/o con DVD-Ig o cualquier

variación de los mismos (por ejemplo, monoclonal/DVD-Ig, DVD-Ig/policlonal, etc.), incluyendo la detección con radioisótopos (radioinmunoensayo (RIA)) y detección enzimática (inmunoensayo enzimático (EIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (por ejemplo, ensayos de Quantikine ELISA, O&D Systems, Minneapolis, MN))), inmunoensayo de inhibición competitiva (por ejemplo, directa y reversa), inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA), técnica de inmunoensayo multiplicado por enzima (EMIT), transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET), y ensayo quimioluminiscente homogéneo, etc. En un inmunoensayo basado en SELDI, se adhiere un reactivo de captura que une específicamente un analito (o un fragmento del mismo) de interés a la superficie de una sonda para espectrometría de masa, tal como un arreglo en chip de proteína preactivada. El analito (o fragmento del mismo) se captura entonces específicamente sobre el biochip, y se detecta el analito capturado (o fragmento del mismo) mediante espectrometría de masa. Como alternativa, el analito (o fragmento del mismo) se puede eluir desde el reactivo de captura y detectarse mediante MALDI tradicional (desorción/ ionización láser asistida por matriz) o mediante SELDI. Un inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscente, en particular uno que emplea el analizador automático ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), es un ejemplo de un inmunoensayo preferido.

En la práctica de la presente exposición se usan métodos bien conocidos en el arte para colectar, manipular y procesar orina, sangre, suero y plasma y otros fluidos corporales, como por ejemplo, cuando se emplea una DVD-Ig como se describe en la presente documentación como reactivo de

inmunodiagnóstico y/o en un conjunto de componentes para inmunoensayo de analito. La muestra de prueba puede comprender otros grupos además del analito de interés, tales como anticuerpos, antígenos, haptenos, hormonas, drogas, enzimas, receptores, proteínas, péptidos, polipéptidos, oligonucleótidos y/o polinucleótidos. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de sangre completa obtenida de un sujeto. Puede ser necesario deseable que una muestra de prueba, en particular la sangre completa, se trate antes del inmunoensayo como se describe en la presente documentación, por ejemplo, con un reactivo de pretratamiento. Incluso en los casos en lo que no es necesario un pretratamiento (por ejemplo, en la mayoría de las muestras de orina), opcionalmente se puede hacer un pretratamiento (por ejemplo, como parte de un régimen en una plataforma comercial).

El reactivo de pretratamiento puede ser cualquier reactivo apropiado para usar con el inmunoensayo y los conjuntos de componentes de la invención. El pretratamiento comprende opcionalmente: (a) uno más solventes (por ejemplo, metanol y etilenglicol) y opcionalmente, sal, (b) uno más solventes y sal, y opcionalmente, detergente, (c) detergente, o (d) detergente y sal. Los reactivos de pretratamiento son conocidos en el arte, y dicho pretratamiento se puede emplear, por ejemplo, como se usa para los ensayos en analizadores Abbott TDx, AxSYM®, y ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), como se describe en la literatura (véase, por ejemplo, Yatscoff et al., Abbott TDx Monoclonal Antibody Assay Evaluated for Measuring Cyclosporine in Whole Blood, Clin. Chem. 36: 1969-1973 (1990), y Wallemacq et al., Evaluation of the New AxSYM Cyclosporine Assay: Comparison with TDx Monoclonal Whole Blood y EMIT Cyclosporine Assays, Clin. Chem. 45: 432-

435 (1999)), y/o como los comercialmente disponibles. Además, el pretratamiento se puede hacer como se describe en la Patente de los EE.UU. No. 5.135.875, la Pub. de Pat. Europea No. EU0471293, la Patente de los EEUU No. 6.660.843 y la Solicitud de Patente de los EEUU No. 20080020401.. El reactivo de pretratamiento puede ser un reactivo heterogéneo un agente homogéneo.

Con el uso de un reactivo de pretratamiento heterogéneo, el reactivo de pretratamiento precipita la proteína de unión al analito (por ejemplo, la proteína que puede unir a un analito a un fragmento del mismo) presente en la muestra. Dicho paso de pretratamiento comprende eliminar cualquier proteína de unión al analito mediante la separación de la proteína de unión al analito precipitada del sobrenadante de la mezcla que se forma mediante el agregado del agente de pretratamiento a la muestra. De dicho modo, en el ensayo se usa el sobrenadante de la mezcla carente de cualquier proteína de unión, procediendo directamente al paso de captura con anticuerpo.

Con el uso de un reactivo de pretratamiento homogéneo no existe dicho paso de separación. Se ponen en contacto la mezcla entera de muestra de prueba y reactivo de pretratamiento con un miembro marcado de unión específica para el analito (o fragmento de la misma), tal como un anticuerpo anti-analito (o fragmento antigénicamente reactivo del mismo) marcado. El reactivo de pretratamiento que se emplea para dicho ensayo típicamente se diluye en la mezcla con muestra de prueba pretratada, ya sea antes o durante la captura mediante el primer miembro de unión específica. A pesar de dicha dilución, aun hay presente (o permanece) una cierta cantidad del reactivo de pretratamiento en la mezcla de muestra de prueba durante la captura. De

acuerdo a la invención, el miembro de unión específica marcada puede ser una DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma).

En un formato heterogéneo, luego de que se obtiene la muestra de prueba de un sujeto, se prepara una primera mezcla. La mezcla contiene la muestra de prueba que se está evaluando para la presencia de un analito (o fragmento del mismo) y un primer miembro de unión específica, en donde el primer miembro de unión específica y cualquier analito contenido en la muestra de prueba forman un complejo de primer miembro de unión específica y analito. Preferentemente, el primer miembro de unión específica es un anticuerpo anti-analito fragmento del mismo. El primer miembro de unión específica puede ser una DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma) como se describe en la presente documentación. El orden en que se agregan la muestra de prueba y el primer miembro de unión específica, para formar la mezcla, no es crítico. Preferentemente, el primer miembro de unión específica se inmoviliza sobre una fase sólida. La fase sólida que se usa en el inmunoensayo (para el primer miembro de unión específica y, opcionalmente, el segundo miembro de unión específica) puede ser cualquier fase sólida conocida en el arte, tal como, pero no como limitación, una partícula magnética, una esfera, un tubo de ensayo, una placa de microtitulación, una cubeta, una membrana, una molécula de andamiaje, una película, un papel de filtro, un disco y un chip.

Luego de que se forma la mezcla que contiene el complejo de primer miembro de unión específica y analito, se elimina cualquier analito sin unir del complejo usando cualquier técnica conocida en el arte. Por ejemplo, el analito

sin unir se puede eliminar mediante lavado. Deseablemente, sin embargo, el primer miembro de unión específica está presente en exceso sobre cualquier analito presente en la muestra de prueba, de tal forma que todo el analito presente en la muestra de prueba se une al primer miembro de unión específica.

Luego de eliminar cualquier analito sin unir, se agrega un segundo miembro de unión específica a la mezcla para formar un complejo de primer miembro de unión específica-analito-segundo miembro de unión específica. El segundo miembro de unión específica preferentemente es un anticuerpo anti-analito que se une a un epitope sobre el analito que difiere del epitope del analito que está unido al primer miembro de unión específica. Más aun, también preferentemente, el segundo miembro de unión específica se marca con, o contiene, una marca detectable como se describe previamente. El segundo miembro de unión específica puede ser una DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma) como se describe en la presente documentación.

Se puede usar cualquier marca detectable apropiada conocida en el arte. Por ejemplo, la marca detectable puede ser una marca radiactiva (tal como ^{3}H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, ^{32}P, y ^{33}P), una marca enzimática (tal como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, glucosa 6-fosfato dehidrogenasa, y similares), una marca quimioluminiscente (tal como ésteres de acridina, tioésteres, o sulfonamidas; luminol, isoluminol, ésteres de fenantridino, y similares), una marca fluorescente (tal como fluoresceína (por ejemplo, 5-fluoresceínaa, 6-carboxifluoresceína, 3'6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexaclorofluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, y

similares)), rhodamina, ficobiliproteínas, O-ficoeritrina, *quantum dots* (por ejemplo, seleniuro de cadmio enchapado con sulfuro de zinc), una marca termométrica, o una marca de immunoreacción en cadena de polimerasa. La introducción a marcas, procedimientos de marcaje y detección de marcas se encuentra en Polak y Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry,* 2da ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), y en Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes y Research Chemicals* (1996), que es una combinación de manual y catálogo publicado por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon. Se puede usar una marca fluorescente en FPIA (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.593.896, 5.573.904, 5.496.925, 5.359.093, y 5.352.803). Se puede usar un compuesto de acridinio como marca detectable en un ensayo quimioluminiscente homogéneo heterogéneo (véase, por ejemplo, Adamczyk et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 16: 1324-1328 (2006); Adamczyk et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 4: 2313-2317 (2004); Adamczyk et al., Biorg. Med. Chem. Lett. 14: 3917-3921 (2004); y Adamczyk et al., Org. Lett. 5: 3779-3782 (2003)).

Un compuesto de acridinio preferido es una acridinio-9-carboxamida. Los métodos para preparar acridinio 9-carboxamidas se describen en Mattingly, J. Biolumin. Chemilumin. 6: 107-114 (1991); Adamczyk et al., J. Org. Chem. 63: 5636-5639 (1998); Adamczyk et al., Tetrahedron 55: 10899-10914 (1999); Adamczyk et al., Org. Lett. 1: 779-781 (1999); Adamczyk et al., Bioconjugate Chem. 11: 714-724 (2000); Mattingly et al., In *Luminescence Biotechnology: Instruments y Applications;* Dyke, K. V. Ed.; CRC Press: Boca Raton, pp. 77–105 (2002); Adamczyk et al., Org. Lett. 5: 3779-3782 (2003); y en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.468.646, 5.543.524 y 5.783.699. Otro compuesto de acridinio preferido es un éster de acridinio-9-carboxilato de arilo. Un ejemplo de

un éster de acridinio-9-carboxilato de arilo es el fluorosulfonato de 10-metil-9-(fenoxicarbonil)acridinio (disponible de Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Los métodos para preparar ésteres de acridinio-9-carboxilato de arilo se describen en McCapra et al., Photochem. Photobiol. 4: 1111-21 (1965); Razavi et al., Luminescence 15: 245-249 (2000); Razavi et al., Luminescence 15: 239-244 (2000); y en la Patente de los EE.UU. No. 5.241.070. Otros detalles con respecto al éster de acridinio-9-carboxilato de arilo y su uso se establecen en US 2008-0248493.

Los ensayos quimioluminiscentes (por ejemplo, usando acridinio como se describe previamente u otros agentes quimioluminiscentes) se pueden llevar a cabo de acuerdo con los métodos que se describen en Adamczyk et al., Anal. Chim. Acta 579(1): 61-67 (2006). Mientras que se puede usar cualquier formato de ensayo apropiado, un quimioluminómetro de microplacas (Mithras LB-940, Berthold Technologies U.S.A., LLC, Oak Ridge, TN) permite el ensayo de múltiples muestras de volúmenes pequeños rápidamente.

El orden en que se agregan la muestra de prueba y lo(s) miembro(s) de unión específica para formar la mezcla para el ensayo quimiluminiscente no es crítico. Si el primer miembro de unión específica está marcado en forma detectable con un agente quimiluminiscente tal como un compuesto de acridinio, se forman complejos detectablemente marcados del primer miembro de unión específica y analito. Como alternativa, si se usa un segundo miembro de unión específica y el segundo miembro de unión específica está detectablemente marcado con un agente quimiluminiscente tal como un compuesto de acridinio, se forman complejos detectablemente marcados del primer miembro de unión específica-analito-segundo miembro de unión

específica. Se puede eliminar cualquier miembro de unión específica no unido, esté marcado no, a partir de la mezcla usando cualquier técnica conocida en el arte, tal como un lavado.

Se puede generar peróxido de hidrógeno *in situ* en la mezcla o se puede proveer o proporcionar a la mezcla (por ejemplo, en donde la fuente de peróxido de hidrógeno es uno más amortiguadores u otras soluciones que se sabe que contienen peróxido de hidrógeno) antes, simultáneamente con, o luego del agregado de uno de los antes descritos compuestos de acridinio. El peróxido de hidrogeno se puede generar *in situ* de varias maneras tales como será evidente para un versado en la técnica.

Junto con el simultáneo subsiguiente agregado de al menos una solución básica a la muestra, se genera una señal detectable, como por ejemplo, una señal quimioluminiscente, lo que es indicativo de la presencia de analito. La solución básica contiene al menos una base y tiene un pH mayor o igual que 10, preferentemente, mayor o igual que 12. Entre los ejemplos de soluciones básicas se incluye a, pero no como limitación, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de amonio, hidróxido de magnesio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, y bicarbonato de calcio. La cantidad de solución básica que se agrega a la muestra depende de la concentración de la solución básica. En base a la concentración de la solución básica que se usa, un versado en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de solución básica a agregar a la muestra.

La señal quimioluminiscente que se genera se puede detectar usando técnicas de rutina conocidas por los expertos en la materia. En base a la

intensidad de la señal que se genera, se puede cuantificar la cantidad de analito en la muestra. Específicamente, la cantidad de analito en la muestra es proporcional a la intensidad de la señal que se genera. La cantidad de analito presente se puede cuantificar mediante la comparación de la cantidad de luz que se genera con una curva estándar para el analito mediante comparación con un estándar de referencia. La curva estándar se puede generar usando diluciones seriadas o soluciones de concentración conocida de analito mediante espectroscopia de masa, métodos gravimétricos, y otras técnicas conocidas en el arte. Mientras que lo anterior se describe con énfasis en el uso de un compuesto de acridinio como agente quimiluminiscente, cualquier versado en la técnica puede adaptar fácilmente esta descripción para usar con otros agentes quimioluminiscentes.

Por lo general los inmunoensayos analíticos se pueden llevar a cabo usando cualquier formato conocido en el arte, tal como, pero no como limitación, un formato en sándwich. Específicamente, en un formato de inmunoensayo, se emplean al menos dos anticuerpos para separar y cuantificar analito, tal como analito humano, o fragmento del mismo en una muestra. Más específicamente, los al menos dos anticuerpos se unen a diferentes epitopes sobre el analito (o fragmento del mismo) formando un complejo inmune, que se denomina como "sandwich". Por lo general, en los inmunoensayos se pueden usar uno más anticuerpos para capturar el analito (o fragmento del mismo) en la muestra de prueba (estos anticuerpos se denominan con frecuencia como un anticuerpo de "captura" o anticuerpos de "captura") y se pueden usar uno más anticuerpos para unir una marca detectable (o sea, cuantificable) al sandwich (estos anticuerpos se denominan

frecuentemente como "anticuerpo de detección," "anticuerpos de detección," "conjugado," o "conjugados"). Por consiguiente, en el contexto de un inmunoensayo en formato de sandwich, se puede usar una DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma) como se describe en la presente documentación como anticuerpo de captura, anticuerpo de detección, o ambos. Por ejemplo, se puede usar una DVD-Ig que tiene un dominio que puede unir un primer epitope sobre un analito (o fragmento del mismo) como anticuerpo de captura y/otra DVD-Ig que tiene un dominio que puede unir un segundo epitope sobre un analito (o fragmento del mismo) como anticuerpo de detección. Con respecto a esto, se puede usar una DVD-Ig que tiene un primer dominio que puede unir un primer epitope sobre un analito (o fragmento del mismo) y un segundo domino que puede unir un segundo epitope sobre un analito (o fragmento del mismo) como anticuerpo de captura y/o como anticuerpo de detección. Como alternativa, se puede usar una DVD-Ig que tiene un primer dominio que puede unir un epitope sobre un primer analito (o fragmento del mismo) y un segundo domino que puede unir un epitope sobre un segundo analito (o fragmento del mismo) como anticuerpo de captura y/o como anticuerpo de detección para detectar, y opcionalmente cuantificar, dos o más analitos. En el caso en que un analito pueda estar presente en la muestra en más de una forma, tal como una forma monomérica y una forma dimérica/multimérica, que puede ser homomérica o heteromérica, se puede usar una DVD-Ig que tiene un dominio que puede unir un epitope que solo está expuesto sobre la forma monomérica y otra DVD-Ig que tiene un dominio que puede unir un epitope sobre una parte diferente de una forma dimérica/multimérica, como anticuerpos de captura y/o anticuerpos de

detección, permitiendo por lo tanto la detección y la cuantificación opcional de diferentes formas de un analito dado. Más aun, el empleo de DVD-Igs con afinidades diferenciales dentro de una sola DVD-Ig y/o entre diferentes DVD-Igs puede proveer una ventaja de avidez. En el contexto de los inmunoensayos como se describen en la presente documentación, por lo general puede ser útil o deseable incorporar uno más conectores dentro de una estructura de una DVD-Ig. Cuando está presente, óptimamente el conector debe ser de longitud y flexibilidad estructural suficiente para permitir la unión de un epitope mediante los dominios internos así como también la unión de otro epitope mediante los dominios externos. Con respecto a esto, si una DVD-Ig puede unir dos analitos diferentes y un analito es más grande que el otro, deseablemente el analito más grande se une mediante los dominios externos.

Hablando en forma general, una muestra que se está ensayando para (por ejemplo, por ser sospechosa de contener) la presencia de un analito (o fragmento del mismo) se puede poner en contacto con al menos un anticuerpo (o anticuerpos) de captura y al menos un anticuerpo de detección (que puede ser un segundo anticuerpo de detección o un tercer anticuerpo de detección o incluso un anticuerpo numerado sucesivamente, por ejemplo, como en el caso en que el anticuerpo de captura y/o detección comprenda anticuerpos múltiples) ya sea en forma simultánea o en forma secuencial y en cualquier orden. Por ejemplo, la muestra de prueba se puede poner en contacto primero con al menos un anticuerpo de captura y luego (en forma secuencial) con al menos un anticuerpo de detección. Como alternativa, la muestra de prueba se puede poner en contacto primero con al menos un anticuerpo de detección y luego (en forma secuencial) con al menos un anticuerpo de captura. En aun

otra alternativa, la muestra de prueba se puede poner en contacto en forma simultánea con un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección.

En el formato de ensayo en sandwich, una muestra que se sospecha que contiene analito (o fragmento del mismo) primero se pone en contacto con al menos un primer anticuerpo de captura bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de primer anticuerpo/analito. Si se usan más de un anticuerpo de captura, se forma un primer complejo de anticuerpo de captura/analito que comprende dos o más anticuerpos de captura. En un ensayo en sandwich, los anticuerpos, o sea, preferentemente, el al menos un anticuerpo de captura, se usan en cantidades en exceso molar sobre la cantidad máxima de analito (o fragmento del mismo) esperada en la muestra de prueba. Por ejemplo, se puede usar entre alrededor de 5 µg y alrededor de 1 mg de anticuerpo por ml de amortiguador (por ejemplo, amortiguador de recubrimiento de micropartículas).

Los inmunoensayos de inhibición competitiva, los que se emplean con frecuencia para medir analitos pequeños debido a que se requiere la unión mediante solo un anticuerpo, comprenden formatos secuenciales o clásicos. En un inmunoensayo de inhibición competitiva secuencial se recubre un pocillo de una placa de microtitulación u otro soporte sólido con un anticuerpo de captura hacia un analito de interés. Cuando se agrega la muestra que contiene el analito de interés al pocillo, el analito de interés se une al anticuerpo de captura. Luego de lavar, se agrega una cantidad conocida de analito marcado (por ejemplo, con biotina o peroxidasa de rábano (HRP)) al pocillo. Se necesita un sustrato para la marca enzimática para poder generar una señal. Un ejemplo de un sustrato apropiado para HRP es la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

(TMB). Luego de lavar, se mide la señal generada por el analito marcado y la misma es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra. En un inmunoensayo de inhibición competitiva clásico, se recubre un soporte sólido con un anticuerpo hacia un analito de interés (por ejemplo, un pocillo de una placa de microtitulación). Sin embargo, a diferencia del inmunoensayo de inhibición competitiva secuencial, se agregan la muestra y el analito marcado al pocillo en el mismo momento. Cualquier analito que haya en la muestra compite con el analito marcado por la unión con el anticuerpo de captura. Luego de lavar, se mide la señal generada por el analito marcado y la misma es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra.

Opcionalmente, antes de poner en contacto la muestra de prueba con el al menos un anticuerpo de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura), se puede unir el al menos un anticuerpo de captura a un soporte sólido, que facilita la separación del primer complejo de anticuerpo/analito (o fragmento del mismo) de la muestra de prueba. El sustrato al que se une el anticuerpo de captura puede ser cualquier soporte sólido apropiado fase sólida que facilite la separación del complejo de anticuerpo de captura-analito de la muestra.

Entre los ejemplos se incluye a un pocillo de una placa, tal como una placa de microtitulación, un tubo de ensayo, un gel poroso (por ejemplo, gel de sílice, agarosa, dextrano, o gelatina), una película polimérica (por ejemplo, poliacrilamida), esferas (por ejemplo, esferas de poliestireno esferas magnéticas), una tira de filtro/membrana (por ejemplo, nitrocelulosa o nylon), micropartículas (por ejemplo, partículas de látex, micropartículas magnetizables (por ejemplo, micropartículas que tienen núcleos de óxido férrico u óxido de

cromo y recubrimientos homo heteropoliméricos, y radios de aproximadamente entre 1 y 10 micrones). El sustrato puede comprender un material poroso apropiado con una afinidad de superficie apropiada para unir antígenos y porosidad suficiente para permitir el acceso por parte de los anticuerpos de detección. Por lo general se prefiere un material microporoso, a pesar de que se puede usar un material gelatinoso en un estado hidratado. Dichos sustratos porosos están preferentemente en la forma de hojas con un espesor de entre alrededor de 0,01 y alrededor de 0,5 mm, preferentemente de aproximadamente 0,1 mm. Mientras que el tamaño de poro puede variar un poco, el tamaño de poro preferentemente es de entre alrededor de 0,025 y alrededor de 15 micrones, más preferentemente entre alrededor de 0,15 y alrededor de 15 micrones. La superficie de dichos sustratos se puede activar mediante procesos químicos que causan una unión covalente del anticuerpo al sustrato. Por lo general se obtiene una unión irreversible, mediante adsorción a través de fuerzas hidrofóbicas, del antígeno del anticuerpo y el sustrato; como alternativa, se puede usar un agente de acoplamiento químico u otros medios para unir covalentemente el anticuerpo al sustrato, con la condición de que dicha unión no interfiera con la habilidad del anticuerpo para unir al analito. Como alternativa, se puede unir el anticuerpo con micropartículas, las cuales han sido previamente recubiertas con estreptavidina (por ejemplo, DYNAL® Magnetic Beads, Invitrogen, Carlsbad, CA) o biotina (por ejemplo, micropartículas recubiertas con estreptavidina usando Power-BindTM-SA-MP (Seradyn, Indianapolis, IN)) o anticuerpos monoclonales específicos anti-especie. Si es necesario, se puede derivatizar el sustrato para permitir su reactividad con diferentes grupos funcionales sobre el anticuerpo. Dicha

derivatización requiere el uso de ciertos agentes de acoplamiento, entre los ejemplos de los cuales se incluye a, pero no como limitación, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida, y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Si se desea, se puede adherir uno más de los reactivos de captura, tal como los anticuerpos (o fragmentos de los mismos), cada uno de los cuales es especifico para el(los) analito(s), a fases sólidas en diferentes ubicaciones físicas o localizables (por ejemplo, tal como en una configuración en biochip (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 6.225.047; la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 99/51773; la Patente de los EE.UU. No. 6.329.209; la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 00/56934, y la Patente de los EE.UU. No. 5.242.828). Si el reactivo de captura se adhiere a una sonda para espectrometría de masa como soporte sólido, la cantidad de analito que se une a la sonda se puede detectar mediante espectrometría de masa de desorción e ionización láser. Como alternativa, se puede empaquetar una columna individual con diferentes esferas, que se derivatizan con uno más reactivos de captura, capturando de ese modo el analito en un solo lugar (véase, tecnologías de derivatización de anticuerpos, en base a esferas, por ejemplo, la tecnología xMAP de Luminex (Austin, TX)).

Luego de que la muestra de prueba que se está ensayando para la presencia de analito (o fragmento del mismo) se puso en contacto con el al menos un anticuerpo de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura), se incuba la mezcla con el objetivo de permitir la formación de un complejo de primer anticuerpo (o anticuerpo múltiple)-analito (o fragmento del mismo). La incubación se puede llevar a cabo a un pH de entre alrededor de 4,5 y alrededor de 10,0, a una temperatura de entre alrededor de 2°C y alrededor de

45°C, y durante un periodo de al menos entre alrededor de (1) minuto y alrededor de dieciocho (18) horas, preferentemente entre alrededor de 1 y alrededor de 24 minutos, más preferentemente entre alrededor de 4 y alrededor de 18 minutos. El inmunoensayo que se describe en la presente documentación se puede llevar a cabo en un paso (lo que significa que se agregan la muestra de prueba, al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo de detección en forma secuencial o en forma simultánea a un recipiente de reacción) o en más de un paso, tal como dos pasos, tres pasos, etc.

Luego de la formación del complejo de (primero múltiple) anticuerpo de captura/analito (o fragmento del mismo), el complejo se pone entonces en contacto con al menos un anticuerpo de detección bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de (primero múltiple) anticuerpo de captura/analito (o fragmento del mismo)/segundo anticuerpo de detección. Mientras que por claridad se le pone el título de "segundo" anticuerpo (por ejemplo, segundo anticuerpo de detección), de hecho, en el caso en el que se usan anticuerpos múltiples para la captura y/o detección, el al menos un anticuerpo de detección puede ser el segundo, tercero, cuarto, etc. anticuerpo que se use en el inmunoensayo. Si el complejo de anticuerpo de captura/analito (o fragmento del mismo) se pone en contacto con más de un anticuerpo de detección, entonces se forma un complejo de (primero múltiple) anticuerpo de captura/analito (o fragmento del mismo)/(múltiple) anticuerpo de detección. Como en el caso del anticuerpo de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura), cuando se pone en contacto el al menos un (por ejemplo, segundo y cualquier subsiguiente) anticuerpo de detección con el

complejo de anticuerpo de captura/analito (o fragmento del mismo), se requiere un periodo de incubación bajo condiciones similares a las que se describieron previamente para la formación del complejo (primero múltiple) anticuerpo de captura/analito (o fragmento del mismo)/(segundo múltiple) anticuerpo de detección. Preferentemente, al menos un anticuerpo de detección contiene una marca detectable. La marca detectable se puede unir con el al menos un anticuerpo de detección (por ejemplo, el segundo anticuerpo de detección) antes de, en forma simultánea con, o luego de la formación del complejo de (primero múltiple) anticuerpo de captura/analito (o fragmento del mismo)/(segundo múltiple) anticuerpo de detección. Se puede usar cualquier marca detectable conocida en el arte (véase la discusión previa, incluyendo las referencias de Polak y Van Noorden (1997) y Haugland (1996)).

La marca detectable se puede unir a los anticuerpos ya sea en forma directa o a través de un agente de acoplamiento. Un ejemplo de un agente de acoplamiento que se puede usar es el EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, clorhidrato), que está comercialmente disponible en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Se conocen en el arte otros agentes de acoplamiento que se puede usar. Los métodos para unir una marca detectable a un anticuerpo son conocidos en el arte. Además, se puede adquirir o sintetizar cualquier marca detectable que ya contenga grupos terminales que faciliten el acoplamiento de la marca detectable al anticuerpo, tal como CPSP-Acridinium Ester (o sea, 9-[N-tosil-N-(3-carboxipropil)]-10-(3-sulfopropil)acridinio carboxamida) o SPSP-Acridinium Ester (o sea, N10-(3-sulfopropil)-N-(3-sulfopropil)-acridinio-9-carboxamida).

El complejo de (primero múltiple) anticuerpo de captura/analito/(segundo múltiple) anticuerpo de detección se puede, aunque no en forma obligatoria, separar del resto de la muestra de prueba antes de la cuantificación de la marca. Por ejemplo, si el al menos un anticuerpo de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura) se une a un soporte sólido, tal como un pocillo una esfera, se puede llevar a cabo la separación mediante la eliminación del fluido (de la muestra de prueba) que está en contacto con el soporte sólido. Como alternativa, si el al menos primer anticuerpo de captura se une a un soporte sólido, el mismo se puede poner en contacto en forma simultánea con la muestra que contiene analito y el al menos un segundo anticuerpo de detección para formar un complejo de primer (múltiple) anticuerpo/analito/segundo (múltiple) anticuerpo, seguido por la eliminación del fluido (muestra de prueba) que está en contacto con el soporte sólido. Si el al menos un primer anticuerpo de captura no está unido a un soporte sólido, entonces el complejo (primero múltiple) anticuerpo de captura/analito/(segundo múltiple) anticuerpo de detección no tiene que ser eliminado de la muestra de prueba para la cuantificación de la cantidad de marca.

Luego de la formación del complejo marcado de anticuerpo de captura/analito/anticuerpo de detección (por ejemplo, el complejo de primer anticuerpo de captura/analito/segundo anticuerpo de detección), se cuantifica la cantidad de marca en el complejo usando técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, si se usa una marca enzimática, se hace reaccionar el complejo marcado son un sustrato para la marca que da una reacción cuantificable tal como un desarrollo de color. Si la marca es una marca radiactiva, se cuantifica la marca usando medios apropiados, tal como un contador de centelleo. Si la

marca es una marca fluorescente, se cuantifica la marca mediante la estimulación de la marca con una luz de un color (que se conoce como la "longitud de onda de excitación") y detectandotro color (que se conoce como "longitud de onda de emisión") que es emitida por la marca en respuesta a la estimulación. Si la marca es una marca quimioluminiscente, se cuantifica la marca mediante la detección de la luz emitida ya sea en forma visual o mediante el uso de luminómetros, películas de rayos X, películas fotográficas de alta velocidad, cámara CCD, etc. Una vez que se ha cuantificado la cantidad de marca en el complejo, se determina la concentración de analito fragmento del mismo en la muestra de prueba mediante medios apropiados, tal como mediante el uso de una curva estándar que se ha generado usando concentraciones seriadas de analito fragmento del mismo de concentración conocida. Además de generar la curva estándar usando diluciones seriadas de analito fragmento del mismo, se la puede generar gravimétricamente, mediante espectroscopía de masa y mediante otras técnicas conocidas en el arte.

En un ensayo quimioluminiscente de micropartículas que emplea el analizador ARCHITECT®, el pH del diluyente del conjugado debe ser de aproximadamente 6,0 +/- 0,2, el amortiguador de recubrimiento de micropartículas se debe mantener a alrededor de temperatura ambiente (o sea, a entre alrededor de 17 y alrededor de 27 □C), el pH del amortiguador de recubrimiento de las micropartículas debe ser de aproximadamente 6,5 +/- 0,2, y el pH del diluyente de las micropartículas debe ser de aproximadamente 7,8 +/- 0,2. Los sólidos preferentemente son menos que alrededor de 0,2%, tal como menos que alrededor de 0,15%, menos que alrededor de 0,14%, menos

que alrededor de 0,13%, menos que alrededor de 0,12%, o menos que alrededor de 0,11%, tal como aproximadamente 0,10%.

Los FPIAs se basan en los principios de los inmunoensayos de unión competitiva. Un compuesto marcado fluorescentemente, cuando se excita mediante una luz linealmente polarizada, emitirá fluorescencia con un grado de polarización inversamente proporcional a su tasa de rotación. Cuando se excita un complejo trazador fluorescentemente marcado-anticuerpo mediante una luz linealmente polarizada, la luz emitida permanece altamente polarizada debido a que el fluoróforo está restringido en su rotación entre el tiempo en que se absorbe la luz y el tiempo en que se emite la luz. Cuando se excita un compuesto trazador "libre" (o sea, un compuesto que no está unido a un anticuerpo) mediante luz linealmente polarizada, su rotación es mucho más rápida que el correspondiente conjugado de trazador-anticuerpo que se produce en un inmunoensayo de unión competitiva. Los FPIAs son más ventajosos que los RIAs en vista de que no hay sustancias radiactivas que requieran una manipulación y una eliminación especial. Además, los FPIAs son ensayos homogéneos que se pueden llevar a cabo fácilmente y rápidamente.

En vista de lo anterior, se provee un método para determinar la presencia, cantidad o concentración de analito (o fragmento del mismo) en una muestra de prueba. El método comprende ensayar la muestra de prueba para investigar un analito (o fragmento del mismo) mediante un ensayo (i) que emplea (i') al menos uno de un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que puede unir a un analito, una variante de un anticuerpo que puede unir a un analito, un fragmento de una variante de un anticuerpo que puede unir a un analito, y una DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una

variante de la misma) que puede unir a un analito, y (ii') al menos una marca detectable y (ii) que comprende comparar una señal generada por la marca detectable como indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración de un analito (o fragmento del mismo) en la muestra de prueba con una señal generada como indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración de analito (o fragmento del mismo) en un control o calibrador. Opcionalmente el calibrador es parte de una serie de calibradores, en donde cada uno de los calibradores difiere de los otros calibradores en su concentración de analito.

El método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un primer miembro de unión específica al analito (o fragmento del mismo) que se elige del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que puede unir a un analito, una variante de un anticuerpo que puede unir a un analito, un fragmento de una variante de un anticuerpo que puede unir a un analito, y una DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma) que puede unir a un analito de manera de formar un complejo de primer miembro de unión específica/analito (o fragmento del mismo), (ii) poner en contacto el complejo de primer miembro de unión específica/analito (o fragmento del mismo) con al menos un segundo miembro de unión específica al analito (o fragmento del mismo) que se elige del grupo que consiste en un anticuerpo detectablemente marcado anti-analito, un fragmento de un anticuerpo detectablemente marcado anti-analito que puede unir a un analito, un variante de un anticuerpo detectablemente marcado anti-analito que puede unir a un analito, un fragmento de una variante de un anticuerpo detectablemente marcado anti-analito que puede unir a un analito, y

una DVD-Ig detectablemente marcada (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma) de manera de formar un complejo de primer miembro de unión específica/analito (o fragmento del mismo)/segundo miembro de unión específica, y (iii) determinar la presencia, cantidad o concentración de analito en la muestra de prueba mediante la detección o medida de la señal generada por la marca detectable en el complejo de primer miembro de unión específica/analito (o fragmento del mismo)/segundo miembro de unión específica que se formó en (ii). Se puede preferir un método en el cual al menos un primer miembro de unión específica al analito (o fragmento del mismo) y/o al menos un segundo miembro de unión específica al analito (o fragmento del mismo) es una DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma) como se describe en la presente documentación.

Como alternativa, el método puede comprender poner en contacto la muestra de prueba con al menos un primer miembro de unión específica al analito (o fragmento del mismo) que se elige del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que puede unir a un analito, una variante de un anticuerpo que puede unir a un analito, un fragmento de una variante de un anticuerpo que puede unir a un analito, y una DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma) y en forma simultánea o en forma secuencial, en cualquier orden, poner en contacto la muestra de prueba con al menos un segundo miembro de unión específica, que puede competir con el analito (o fragmento del mismo) por la unión con el al menos un primer miembro de unión específica y que se elige del grupo que consiste en un analito detectablemente marcado, un fragmento

detectablemente marcado de un analito que se puede unir al primer miembro de unión específica, una variante detectablemente marcada de analito que se puede unir al primer miembro de unión específica, y un fragmento detectablemente marcado de una variante de un analito que se puede unir al primer miembro de unión específica. Cualquier analito (o fragmento del mismo) que esté presente en la muestra de prueba y el al menos un segundo miembro de unión específica compiten entre ellos para formar un complejo de primer miembro de unión específica/analito (o fragmento del mismo) y un complejo de primer miembro de unión específica/segundo miembro de unión específica, respectivamente. El método además comprende determinar la presencia, cantidad o concentración de analito en la muestra de prueba mediante la detección o medida de la señal generada por la marca detectable en el complejo de primer miembro de unión específica/segundo miembro de unión específica que se formó en (ii), en donde la señal generada por la marca detectable en el complejo de primer miembro de unión específica/segundo miembro de unión específica es inversamente proporcional a la cantidad o concentración de analito en la muestra de prueba.

Los métodos anteriores además pueden comprender diagnosticar, pronosticar, o evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico de un paciente del cual se obtuvo la muestra de prueba. Si el método además comprende evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente del que se obtuvo la muestra de prueba, el métodopcionalmente comprende además modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente según la necesidad para mejorar la eficacia. El método se puede

adaptar para usar en un sistema automatizado en un sistema semiautomatizado.

Más específicamente, se provee un método para determinar la presencia, cantidad o concentración de antígeno (o un fragmento del mismo) en una muestra de prueba. El método comprende ensayar la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo) mediante un inmunoensayo. El inmunoensayo (i) emplea al menos una proteína de unión y al menos una marca detectable y (ii) comprende comparar una señal que se genera mediante la marca detectable como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba con una señal que se genera como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en un control o un calibrador. El calibrador opcionalmente es parte de una serie de calibradores en la cual cada uno de los calibradores difiere de los otros calibradores de la serie en la concentración del antígeno (o un fragmento del mismo). Una de las al menos una proteína de unión (i') comprende una cadena polipeptídica que comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada que se obtuvo de un primer anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada que se obtuvo de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un domino constante de cadena pesada, (X1)n es un adaptador que está opcionalmente presente y, cuando está presente es distinto a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y (ii') puede unir un

par de antígenos. El método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un agente de captura, que se une a un epitope sobre el antígeno (o un fragmento del mismo) de manera de formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), (ii) poner en contacto el complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) con al menos un agente de detección, que comprende una marca detectable y se une a un epitope sobre el antígeno (o un fragmento del mismo) que no está unido al agente de captura, para formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo)/agente de detección, y (iii) determinar la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba en base a la señal que se generó mediante la marca detectable en el complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo)/agente de detección que se formó en (ii), en donde al menos un agente de captura y/o al menos un agente de detección es la al menos una proteína de unión. Como alternativa, el método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un agente de captura, que se une a un epitope sobre el antígeno (o un fragmento del mismo) de manera de formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), y simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, poner en contacto la muestra de prueba con antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo), que puede competir con cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba por la unión con el al menos un agente de captura, en donde cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) que esté presente en la muestra de prueba y el antígeno marcado en forma detectable compiten entre ellos para formar un complejo agente de

captura/antígeno (o un fragmento del mismo) y un complejo agente de captura/antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo), respectivamente, y (ii) determinar la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba en base a la señal que se generó mediante la marca detectable en el complejo agente de captura/antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo) que se formó en (ii), en donde al menos un agente de captura es la al menos una proteína de unión y en donde la señal que se generó mediante la marca detectable en el complejo agente de captura/antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo) es inversamente proporcional a la cantidad o concentración de antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba. La muestra de prueba puede ser de un paciente, en cuyo caso el método además puede comprender diagnosticar, pronosticar o evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente. Si el método además comprende evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente, el método opcionalmente además comprende modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente según sea necesario para mejorar la eficacia. El método se puede adaptar para usar en un sistema automatizado o en un sistema semiautomatizado.

Se provee otro método para determinar la presencia, cantidad o concentración de un antígeno (o un fragmento del mismo) en una muestra de prueba. El método comprende ensayar la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo) mediante un inmunoensayo. El inmunoensayo (i) emplea al menos una proteína de unión y al menos una marca detectable y (ii) comprende comparar una señal que se genera mediante la marca detectable

como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba con una señal que se genera como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en un control o un calibrador. El calibrador opcionalmente es parte de una serie de calibradores en la cual cada uno de los calibradores difiere de los otros calibradores de la serie en la concentración del antígeno (o un fragmento del mismo). Una de las al menos una proteína de unión (i') comprende una cadena polipeptídica que comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer domino variable de cadena liviana que se obtuvo de un primer anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), VD2 es un segundo domino variable de cadena liviana que se obtuvo de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un domino constante de cadena liviana, (X1)n es un adaptador que está opcionalmente presente y, cuando está presente es distinto a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y (ii') puede unir un par de antígenos. El método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un agente de captura, que se une a un epitope sobre el antígeno (o un fragmento del mismo) de manera de formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), (ii) poner en contacto el complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) con al menos un agente de detección, que comprende una marca detectable y se une a un epitope sobre el antígeno (o un fragmento del mismo) que no está unido al agente de captura, para formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del

mismo)/agente de detección, y (iii) determinar la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba en base a la señal que se generó mediante la marca detectable en el complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo)/agente de detección que se formó en (ii), en donde al menos un agente de captura y/o al menos un agente de detección es la al menos una proteína de unión. Como alternativa, el método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un agente de captura, que se une a un epitope sobre el antígeno (o un fragmento del mismo) de manera de formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), y simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, poner en contacto la muestra de prueba con antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo), que puede competir con cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba por la unión con el al menos un agente de captura, en donde cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) que esté presente en la muestra de prueba y el antígeno marcado en forma detectable compiten entre ellos para formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) y un complejo agente de captura/antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo), respectivamente, y (ii) determinar la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba en base a la señal que se generó mediante la marca detectable en el complejo agente de captura/antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo) que se formó en (ii), en donde al menos un agente de captura es la al menos una proteína de unión y en donde la señal que se generó mediante la marca detectable en el complejo agente de

captura/antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo) es inversamente proporcional a la cantidad o concentración de antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba. Si la muestra de prueba es de un paciente, el método además puede comprender diagnosticar, pronosticar o evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente. Si el método además comprende evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente, el método opcionalmente además comprende modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente según sea necesario para mejorar la eficacia. El método se puede adaptar para usar en un sistema automatizado o en un sistema semiautomatizado.

Aun otro método para determinar la presencia, cantidad o concentración de un antígeno (o un fragmento del mismo) en una muestra de prueba se provee. El método comprende ensayar la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo) mediante un inmunoensayo. El inmunoensayo (i) emplea al menos una proteína de unión y al menos una marca detectable y (ii) comprende comparar una señal que se genera mediante la marca detectable como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba con una señal que se genera como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en un control o un calibrador. El calibrador opcionalmente es parte de una serie de calibradores en la cual cada uno de los calibradores difiere de los otros calibradores de la serie en la concentración del antígeno (o un fragmento del mismo). Una de las al menos una proteína de unión (i') comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, en donde la primera

cadena polipeptídica comprende un primer VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada que se obtuvo de un primer anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada que se obtuvo de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un domino constante de cadena pesada, (X1)n es un adaptador que está opcionalmente presente y, cuando está presente es distinto a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y en donde la segunda cadena polipeptídica comprende un segundo VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer domino variable de cadena liviana que se obtuvo de un primer anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), VD2 es un segundo domino variable de cadena liviana que se obtuvo de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un domino constante de cadena liviana, (X1)n es un adaptador que está opcionalmente presente y, cuando está presente es distinto a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y (ii') puede unir un par de antígenos. El método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un agente de captura, que se une a un epitope sobre el antígeno (o un fragmento del mismo) de manera de formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), (ii) poner en contacto el complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) con al menos un agente de detección, que comprende una marca detectable y se une a un epitope sobre el antígeno (o un fragmento del mismo) que no está unido al agente de captura, para formar un complejo

agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo)/agente de detección, y (iii) determinar la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba en base a la señal que se generó mediante la marca detectable en el complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo)/agente de detección que se formó en (ii), en donde al menos un agente de captura y/o al menos un agente de detección es la al menos una proteína de unión. Como alternativa, el método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un agente de captura, que se une a un epitope sobre el antígeno (o un fragmento del mismo) de manera de formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), y simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, poner en contacto la muestra de prueba con antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo), que puede competir con cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba por la unión con el al menos un agente de captura, en donde cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) que esté presente en la muestra de prueba y el antígeno marcado en forma detectable compiten entre ellos para formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) y un complejo agente de captura/antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo), respectivamente, y (ii) determinar la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba en base a la señal que se generó mediante la marca detectable en el complejo agente de captura/antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo) que se formó en (ii), en donde al menos un agente de captura es la al menos una proteína de unión y en donde la señal que se generó mediante la marca

detectable en el complejo agente de captura/antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo) es inversamente proporcional a la cantidad o concentración de antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba. Si la muestra de prueba es de un paciente, el método además puede comprender diagnosticar, pronosticar o evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente. Si el método además comprende evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente, el método opcionalmente además comprende modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente según sea necesario para mejorar la eficacia. El método se puede adaptar para usar en un sistema automatizado o en un sistema semiautomatizado.

Aun otro método para determinar la presencia, cantidad o concentración de un antígeno (o un fragmento del mismo) en una muestra de prueba se provee. El método comprende ensayar la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo) mediante un inmunoensayo. El inmunoensayo (i) emplea al menos una DVD-Ig que puede unir dos antígenos y al menos una marca detectable y (ii) comprende comparar una señal que se genera mediante la marca detectable como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba con una señal que se genera como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en un control o un calibrador. El calibrador opcionalmente es parte de una serie de calibradores en la cual cada uno de los calibradores difiere de los otros calibradores de la serie en la concentración del antígeno (o un fragmento del mismo). Una de las al menos una DVD-Ig (i')

comprende cuatro cadenas polipeptídicas, en donde la primera y la tercera cadenas polipeptídicas comprende un primer VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada que se obtuvo de un primer anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada que se obtuvo de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un domino constante de cadena pesada, (X1)n es un adaptador que está opcionalmente presente y, cuando está presente es distinto a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y en donde la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas comprenden un segundo VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer domino variable de cadena liviana que se obtuvo de un primer anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), VD2 es un segundo domino variable de cadena liviana que se obtuvo de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un domino constante de cadena liviana, (X1)n es un adaptador que está opcionalmente presente y, cuando está presente es distinto a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y (ii') puede unir a dos antígenos (o fragmentos de los mismos). El método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un agente de captura, que se une a un epitope sobre el antígeno (o un fragmento del mismo) de manera de formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), (ii) poner en contacto el complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) con al menos un agente de detección, que comprende una marca detectable y se une a un

epitope sobre el antígeno (o un fragmento del mismo) que no está unido al agente de captura, para formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo)/agente de detección, y (iii) determinar la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba en base a la señal que se generó mediante la marca detectable en el complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo)/agente de detección que se formó en (ii), en donde al menos un agente de captura y/o al menos un agente de detección que es al menos una DVD-Ig. Como alternativa, el método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un agente de captura, que se une a un epitope sobre el antígeno (o un fragmento del mismo) de manera de formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), y simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, poner en contacto la muestra de prueba con antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo), que puede competir con cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba por la unión con el al menos un agente de captura, en donde cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) que esté presente en la muestra de prueba y el antígeno marcado en forma detectable compiten entre ellos para formar un complejo agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) y un complejo agente de captura/antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo), respectivamente, y (ii) determinar la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba en base a la señal que se generó mediante la marca detectable en el complejo agente de captura/antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo) que se formó en (ii), en donde al menos

un agente de captura es la al menos una DVD-Ig y en donde la señal que se generó mediante la marca detectable en el complejo agente de captura/antígeno marcado en forma detectable (o un fragmento del mismo) es inversamente proporcional a la cantidad o concentración de antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba. Si la muestra de prueba es de un paciente, el método además puede comprender diagnosticar, pronosticar o evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente. Si el método además comprende evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente, el método opcionalmente además comprende modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente según sea necesario para mejorar la eficacia. El método se puede adaptar para usar en un sistema automatizado o en un sistema semiautomatizado.

Con respecto a los métodos de ensayo (y al conjunto de componentes del mismo), puede ser posible emplear anticuerpos anti-analito comercialmente disponibles o métodos para la producción de anticuerpo anti-analito como se describen en la literatura. Las fuentes comerciales de distintos anticuerpos incluyen a, pero no como limitación, Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA), GenWay Biotech, Inc. (San Diego, CA), y O&D Systems (RDS; Minneapolis, MN).

Por lo general, se puede emplear un nivel predeterminado como estándar de comparación contra el que se evalúan los resultados obtenidos en el ensayo de una muestra de prueba para analito fragmento del mismo, por ejemplo, para detectar una enfermedad o riesgo de enfermedad. Por lo general, al hacer dicha comparación, se obtiene el nivel predeterminado corriendo un ensayo en particular un número de veces suficiente y bajo condiciones

apropiadas tales para poder hacer una conexión o asociación entre la presencia, cantidad o concentración de analito con una etapa particular o punto final de una enfermedad, desorden o condición o con indicios clínicos particulares. Típicamente, el nivel predeterminado se obtiene con ensayos de sujetos de referencia (o poblaciones de sujetos). El analito medido puede incluir fragmentos del mismo, productos de degradación del mismo, y/o productos de clivado enzimático del mismo.

En particular, con respecto a un nivel predeterminado como el que se emplea para monitorear el progreso de la enfermedad y/o del tratamiento, la cantidad o concentración de analito fragmento del mismo puede estar "inalterada," "favorable" (o "favorablemente alterada"), o "desfavorable" (o "desfavorablemente alterada"). "Elevada" o "incrementada" se refiere a una cantidad o una concentración en una muestra de prueba que es más alta que un nivel o rango típico normal (por ejemplo, nivel predeterminado), o es mayor que otro nivel o rango de referencia (por ejemplo, muestra anterior o de línea de base). El término "disminuida" o "reducida" se refiere a una cantidad o una concentración en una muestra de prueba que es menor que un nivel o rango típico normal (por ejemplo, nivel predeterminado), o es menor que otro nivel o rango de referencia (por ejemplo, muestra anterior o de línea de base). El término "alterada" se refiere a una cantidad o una concentración en una muestra que está alterada (incrementada o disminuida) a través de un nivel o rango típico normal (por ejemplo, nivel predeterminado), o a través de otro nivel o rango de referencia (por ejemplo, muestra anterior o de línea de base).

El nivel o rango típico normal para analito se define de acuerdo con la práctica estándar. Debido a que los niveles de analito en algunos casos serán

muy bajos, un denominado nivel alterado alteración se puede considerar comocurrida cuando existe un cambio neto en comparación con el nivel o rango típico normal, o nivel o rango de referencia, que no se puede explicar por el error experimental o la variación de muestra. Por consiguiente, se comparará el nivel medido en una muestra particular con el nivel o rango de niveles determinados en muestras similares provenientes de un denominado sujeto normal. En este contexto, un "sujeto normal" es un individuo sin enfermedad detectable, por ejemplo, y un sujeto población "normal" (a veces denominado como "control") es uno(unos) que no exhibe(n) enfermedad detectable, respectivamente, por ejemplo. Más aun, dado que el analito no se encuentra de rutina en un alto nivel en la mayoría de la población humana, un "sujeto normal" se puede considerar como un individuo sin cantidad o concentración de analito detectable sustancialmente incrementada o elevada, y un paciente o población "normal" (a veces denominada "control") es uno(s) que no exhibe(n) una cantidad o concentración de analito detectable sustancialmente incrementada o elevada. Un "sujeto aparentemente normal" es uno en el que no se ha evaluado no se está evaluando actualmente el analito. El nivel de un analito se dice que está "elevado" cuando el analito es normalmente indetectable (por ejemplo, el nivel normal es cero, o está dentro de un rango de entre alrededor de 25 y alrededor de 75 percentiles de poblaciones normales), pero se lo detecta en una muestra de prueba, así como también cuando el analito está presente en la muestra de prueba en un nivel más alto que el normal. Por consiguiente, entre otras cosas, la exposición provee un método para cribar un sujeto que tiene, o que está en riesgo de tener, una enfermedad, desorden, o condición particular.

El método de ensayo también puede involucrar el ensayo de otros marcadores y similares.

Por consiguiente, los métodos que se describen en la presente documentación también se pueden usar para determinar si un sujeto tiene o no, o está en riesgo no de desarrollar una enfermedad, desorden o condición dada. Específicamente, dicho método puede comprender los pasos de:

(a) determinar la concentración o cantidad de analito (o fragmento del mismo) en una muestra de prueba de un sujeto (por ejemplo, usando los métodos que se describen en la presente documentación, o métodos conocidos en el arte); y

(b) comparar la concentración o cantidad de analito (o fragmento del mismo) que se determinó en el paso (a) con un nivel predeterminado, en donde, si la concentración o cantidad de analito que se determinó en el paso (a) es favorable con respecto a un nivel predeterminado, entonces se determina que el sujeto no tiene o no está en riego de tener una enfermedad, desorden o condición dada. Sin embargo, si la concentración o cantidad de analito que se determinó en el paso (a) no es favorable con respecto al nivel predeterminado, entonces se determina que el sujeto tiene o está en riesgo de tener una enfermedad, desorden o condición dada.

Además, en la presente documentación se provee un método para monitorear el progreso de una enfermedad en un sujeto. En forma óptima, el método comprende los pasos de:

(a) determinar la concentración o cantidad de analito en una muestra de prueba de un sujeto;

(b) determinar la concentración o cantidad de analito en una muestra de prueba posterior del sujeto; y

(c) comparar la concentración o cantidad de analito que se determinó en el paso (b) con la concentración o cantidad de analito que se determinó en el paso (a), en donde si la concentración o cantidad que se determinó en el paso (b) está inalterada o no es favorable en comparación con la concentración o cantidad de analito que se determinó en el paso (a), entonces se determina que la enfermedad del sujeto ha continuado, progresado empeorado. Por comparación, si la concentración o cantidad de analito que se determinó en el paso (b) es favorable en comparación con la concentración o cantidad de analito que se determinó en el paso (a), entonces se determina que la enfermedad del sujeto se ha discontinuado, ha retrocedido ha mejorado.

Opcionalmente, el método comprende además comparar la concentración o cantidad de analito que se determinó en el paso (b), por ejemplo, con un nivel predeterminado. Además, opcionalmente el método comprende tratar al sujeto con una o más composiciones farmacéuticas durante un periodo de tiempo si la comparación muestra que la concentración o cantidad de analito que se determinó en el paso (b), por ejemplo, está desfavorablemente alterada con respecto al nivel predeterminado.

Más aun, los métodos se pueden usar para monitorear el tratamiento de un sujeto que recibe tratamiento con una o más composiciones farmacéuticas. Específicamente, dichos métodos involucran proveer una primera muestra de prueba de un sujeto antes que se administre al sujeto con una o más composiciones farmacéuticas. Luego, se determina la concentración o cantidad de analito en una primera muestra de prueba de un sujeto (por ejemplo, usando

los métodos que se describen en la presente documentación o que se conocen en el arte). Luego de que se determinó la concentración o cantidad de analito, se compara entonces opcionalmente la concentración o cantidad de analito con un nivel predeterminado. Si la concentración o cantidad de analito que se determinó en la primera muestra de prueba es inferior que el nivel predeterminado, entonces no se trata al sujeto con una o más composiciones farmacéuticas. Sin embargo, si la concentración o cantidad de analito que se determinó en la primera muestra de prueba es mayor que el nivel predeterminado, entonces se trata al sujeto con una o más composiciones farmacéuticas durante un periodo de tiempo. El periodo de tiempo durante el que se trata al sujeto con la una o más composiciones farmacéuticas puede ser determinado por un versado en el arte (por ejemplo, el periodo de tiempo puede ser de entre alrededor de siete (7) días y alrededor de dos años, preferentemente entre alrededor de catorce (14) días y alrededor de un (1) año).

Durante el curso del tratamiento con la una o más composiciones farmacéuticas, se obtienen entonces segunda y subsiguientes muestras de prueba del sujeto. El número de muestras de prueba y el tiempo en el cual se obtienen dichas muestras de prueba del sujeto, no son críticos. Por ejemplo, se puede obtener una segunda muestra de prueba siete (7) días luego de que se administra por primera vez al sujeto la una o más composiciones farmacéuticas, se puede obtener una tercera muestra de prueba dos (2) semanas luego de que se administra por primera vez al sujeto la una o más composiciones farmacéuticas, se puede obtener una cuarta muestra de prueba tres (3) semanas luego de que se administra por primera vez al sujeto la una o

más composiciones farmacéuticas, se puede obtener una quinta muestra de prueba cuatro (4) semanas luego de que se administra por primera vez al sujeto la una o más composiciones farmacéuticas, etc.

Luego de obtener cada segunda o subsiguiente muestra de prueba del sujeto, se determina la concentración o cantidad de analito en la segunda o subsiguiente muestra de prueba (por ejemplo, usando los métodos que se describen en la presente documentación o que se conocen en el arte). La concentración o cantidad de analito que se determina en cada una de las segunda o subsiguientes muestras de prueba se compara entonces con la concentración o cantidad de analito que se determinó en la primera muestra de prueba (por ejemplo, la muestra de prueba que opcionalmente se comparó originalmente con el nivel predeterminado). Si la concentración o cantidad de analito que se determinó en el paso (c) es favorable en comparación con la concentración o cantidad de analito que se determinó en el paso (a), entonces se determina que la enfermedad en el sujeto se ha discontinuado, ha retrocedido ha mejorado, y el sujeto debe continuar siendo administrado con la una o más composiciones farmacéuticas del paso (b). Sin embargo, si la concentración o cantidad que se determinó en el paso (c) está inalterada o no es favorable en comparación con la concentración o cantidad de analito que se determinó en el paso (a), entonces se determina que la enfermedad en el sujeto ha continuado, progresado empeorado, y se debe tratar al sujeto con una concentración más alta de la una o más composiciones farmacéuticas que se administraron al sujeto en el paso (b) o se debe tratar al sujeto con una o más composiciones farmacéuticas que son diferentes de la una o más composiciones farmacéuticas que se administraron al sujeto en el paso (b).

Específicamente, se puede tratar al sujeto con una o más composiciones farmacéuticas que son diferentes de la una o más composiciones farmacéuticas que el sujeto había recibido previamente para disminuir o aminorar en nivel de analito en dicho sujeto.

Por lo general, para los ensayos en los que se puede hacer una prueba repetida (por ejemplo, monitoreo del progreso de una enfermedad y/o de la respuesta al tratamiento), se obtiene una segunda o subsiguiente muestra de prueba en un periodo de tiempo luego de que se ha obtenido la primera muestra de prueba del sujeto. Específicamente, se puede obtener una segunda muestra de prueba del sujeto minutos, horas, días, semanas o años luego de que se obtuvo la primera muestra de prueba del sujeto. Por ejemplo, la segunda muestra de prueba se puede obtener del sujeto en un periodo de tiempo de aproximadamente 1 minuto, alrededor de 5 minutos, alrededor de 10 minutos, alrededor de 15 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 45 minutos, alrededor de 60 minutos, alrededor de 2 horas, alrededor de 3 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 5 horas, alrededor de 6 horas, alrededor de 7 horas, alrededor de 8 horas, alrededor de 9 horas, alrededor de 10 horas, alrededor de 11 horas, alrededor de 12 horas, alrededor de 13 horas, alrededor de 14 horas, alrededor de 15 horas, alrededor de 16 horas, alrededor de 17 horas, alrededor de 18 horas, alrededor de 19 horas, alrededor de 20 horas, alrededor de 21 horas, alrededor de 22 horas, alrededor de 23 horas, alrededor de 24 horas, alrededor de 2 días, alrededor de 3 días, alrededor de 4 días, alrededor de 5 días, alrededor de 6 días, alrededor de 7 días, alrededor de 2 semanas, alrededor de 3 semanas, alrededor de 4 semanas, alrededor de 5 semanas, alrededor de 6 semanas, alrededor de 7 semanas, alrededor de 8

semanas, alrededor de 9 semanas, alrededor de 10 semanas, alrededor de 11 semanas, alrededor de 12 semanas, alrededor de 13 semanas, alrededor de 14 semanas, alrededor de 15 semanas, alrededor de 16 semanas, alrededor de 17 semanas, alrededor de 18 semanas, alrededor de 19 semanas, alrededor de 20 semanas, alrededor de 21 semanas, alrededor de 22 semanas, alrededor de 23 semanas, alrededor de 24 semanas, alrededor de 25 semanas, alrededor de 26 semanas, alrededor de 27 semanas, alrededor de 28 semanas, alrededor de 29 semanas, alrededor de 30 semanas, alrededor de 31 semanas, alrededor de 32 semanas, alrededor de 33 semanas, alrededor de 34 semanas, alrededor de 35 semanas, alrededor de 36 semanas, alrededor de 37 semanas, alrededor de 38 semanas, alrededor de 39 semanas, alrededor de 40 semanas, alrededor de 41 semanas, alrededor de 42 semanas, alrededor de 43 semanas, alrededor de 44 semanas, alrededor de 45 semanas, alrededor de 46 semanas, alrededor de 47 semanas, alrededor de 48 semanas, alrededor de 49 semanas, alrededor de 50 semanas, alrededor de 51 semanas , alrededor de 52 semanas, alrededor de 1,5 años, alrededor de 2 años, alrededor de 2,5 años, alrededor de 3,0 años, alrededor de 3,5 años, alrededor de 4,0 años, alrededor de 4,5 años, alrededor de 5,0 años, alrededor de 5,5, años, alrededor de 6,0 años, alrededor de 6,5 años, alrededor de 7,0 años, alrededor de 7,5 años, alrededor de 8,0 años, alrededor de 8,5 años, alrededor de 9,0 años, alrededor de 9,5 años o alrededor de 10,0 años luego de que se obtuvo la primera muestra de prueba del sujeto.

Cuando se usa para monitorear el progreso de una enfermedad, se puede usar el ensayo previo para monitorear el progreso de una enfermedad en sujetos que sufren de condiciones agudas. Las condiciones agudas,

también conocidas como condiciones de cuidado crítico, se refieren a enfermedades agudas, que amenazan la vida u otras condiciones médicas críticas que involucran, por ejemplo, el sistema cardiovascular o el sistema secretorio. Típicamente, la condiciones de cuidado crítico se refieren a aquellas condiciones que requieren una intervención médica aguda en un ámbito hospitalario (incluyendo, pero no como limitación, la sala de emergencias, la unidad de cuidados intensivos, el centro de trauma, u otros ámbitos de cuidado emergentes) o la administración por parte de un paramédico u otro personal médico de campo. Para la condiciones de cuidado crítico, por lo general se hace el monitoreo repetitivo dentro de un marco de tiempo menor, o sea, minutos, horas o días (por ejemplo, alrededor de 1 minuto, alrededor de 5 minutos, alrededor de 10 minutos, alrededor de 15 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 45 minutos, alrededor de 60 minutos, alrededor de 2 horas, alrededor de 3 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 5 horas, alrededor de 6 horas, alrededor de 7 horas, alrededor de 8 horas, alrededor de 9 horas, alrededor de 10 horas, alrededor de 11 horas, alrededor de 12 horas, alrededor de 13 horas, alrededor de 14 horas, alrededor de 15 horas, alrededor de 16 horas, alrededor de 17 horas, alrededor de 18 horas, alrededor de 19 horas, alrededor de 20 horas, alrededor de 21 horas, alrededor de 22 horas, alrededor de 23 horas, alrededor de 24 horas, alrededor de 2 días, alrededor de 3 días, alrededor de 4 días, alrededor de 5 días, alrededor de 6 días o alrededor de 7 días), y por lo general, de la misma manera, el ensayo inicial se hace dentro de un periodo de tiempo más corto, por ejemplo, alrededor de minutos, horas o días desde el inicio de la enfermedad o condición.

También se pueden usar los ensayos para monitorear el progreso de una enfermedad en sujetos que sufren de condiciones crónicas no agudas. Las condiciones de cuidado no crítico, no agudas, se refieren a condiciones distintas a las condiciones agudas, que amenazan la vida u otras condiciones médicas críticas que involucran, por ejemplo, el sistema cardiovascular y/o el sistema excretorio. Típicamente, las condiciones no agudas incluyen a aquellas de duración de largo término crónicas. Para las condiciones no agudas, por lo general el monitoreo repetitivo se hace con una marco de tiempo mayor, por ejemplo, horas, días, semanas, meses o años (por ejemplo, alrededor de 1 hora, alrededor de 2 horas, alrededor de 3 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 5 horas, alrededor de 6 horas, alrededor de 7 horas, alrededor de 8 horas, alrededor de 9 horas, alrededor de 10 horas, alrededor de 11 horas, alrededor de 12 horas, alrededor de 13 horas, alrededor de 14 horas, alrededor de 15 horas, alrededor de 16 horas, alrededor de 17 horas, alrededor de 18 horas, alrededor de 19 horas, alrededor de 20 horas, alrededor de 21 horas, alrededor de 22 horas, alrededor de 23 horas, alrededor de 24 horas, alrededor de 2 días, alrededor de 3 días, alrededor de 4 días, alrededor de 5 días, alrededor de 6 días, alrededor de 7 días, alrededor de 2 semanas, alrededor de 3 semanas, alrededor de 4 semanas, alrededor de 5 semanas, alrededor de 6 semanas, alrededor de 7 semanas, alrededor de 8 semanas, alrededor de 9 semanas, alrededor de 10 semanas, alrededor de 11 semanas, alrededor de 12 semanas, alrededor de 13 semanas, alrededor de 14 semanas, alrededor de 15 semanas, alrededor de 16 semanas, alrededor de 17 semanas, alrededor de 18 semanas, alrededor de 19 semanas, alrededor de 20 semanas, alrededor de 21 semanas, alrededor de 22 semanas, alrededor de 23 semanas, alrededor de 24

semanas, alrededor de 25 semanas, alrededor de 26 semanas, alrededor de 27 semanas, alrededor de 28 semanas, alrededor de 29 semanas, alrededor de 30 semanas, alrededor de 31 semanas, alrededor de 32 semanas, alrededor de 33 semanas, alrededor de 34 semanas, alrededor de 35 semanas, alrededor de 36 semanas, alrededor de 37 semanas, alrededor de 38 semanas, alrededor de 39 semanas, alrededor de 40 semanas, alrededor de 41 semanas, alrededor de 42 semanas, alrededor de 43 semanas, alrededor de 44 semanas, alrededor de 45 semanas, alrededor de 46 semanas, alrededor de 47 semanas, alrededor de 48 semanas, alrededor de 49 semanas, alrededor de 50 semanas, alrededor de 51 semanas , alrededor de 52 semanas, alrededor de 1,5 años, alrededor de 2 años, alrededor de 2,5 años, alrededor de 3,0 años, alrededor de 3,5 años, alrededor de 4,0 años, alrededor de 4,5 años, alrededor de 5,0 años, alrededor de 5,5, años, alrededor de 6,0 años, alrededor de 6,5 años, alrededor de 7,0 años, alrededor de 7,5 años, alrededor de 8,0 años, alrededor de 8,5 años, alrededor de 9,0 años, alrededor de 9,5 años o alrededor de 10,0 años), y similarmente, por lo general el ensayo inicial se hace dentro de un marco de tiempo mayor, por ejemplo, alrededor de horas, días, meses o años desde el inicio de la enfermedad o condición.

Además, los ensayos previos se pueden llevar a cabo usando una primera muestra de prueba que se obtiene de un sujeto en donde la primera muestra de prueba se obtiene a partir de una fuente, tal comorina, suero plasma. Opcionalmente, los ensayos previos se pueden repetir usando una segunda muestra de prueba que se obtiene del sujeto en donde la segunda muestra de prueba se obtiene de otra fuente. Por ejemplo, si la primera muestra de prueba se obtuvo de orina, la segunda muestra de prueba se puede

obtener del suero plasma. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos usando la primera muestra de prueba y la segunda muestra de prueba se pueden comparar. Se puede usar la comparación para evaluar el estado de una enfermedad o condición en el sujeto.

Más aun, la presente exposición también se relaciona con métodos para determinar si un sujeto predispuesto a, o que sufre de, una enfermedad, desorden o condición dada se beneficiará con el tratamiento. En particular, la exposición se relaciona con métodos diagnósticos y productos relacionados con el analito. Por consiguiente, el método de "monitorear el tratamiento de una enfermedad en un sujeto" como se describe en la presente documentación, óptimamente puede abracar además la selección o identificación de candidatos para terapia.

Por consiguiente, en formas de realización particulares, la exposición también provee un método para determinar si un sujeto que tiene, o que está en riesgo de tener, una enfermedad, desorden o condición dada es un candidato para terapia. Por lo general, el sujeto es uno que ha experimentado algún síntoma de una enfermedad, desorden o condición dada o que realmente ha sido diagnosticado como portador, o en riesgo de padecer, una enfermedad, desorden o condición dada, y/o que demuestra una concentración o cantidad desfavorable de analito fragmento del mismo, como se describe en la presente documentación.

El métodopcionalmente comprende un ensayo como se describe en la presente documentación, en donde se evalúa el analito antes y después del tratamiento de un sujeto con una o más composiciones farmacéuticas (por ejemplo, particularmente con un fármaco relacionado al mecanismo de acción

que involucra al analito), con terapia inmunosupresora, o mediante terapia de inmunoabsorción, o cuando se evalúa al analito luego de dicho tratamiento y la concentración o la cantidad de analito se compara contra un nivel predeterminado. Una concentración o cantidad desfavorable de analitobservado luego del tratamiento confirma que el sujeto no se beneficiará por recibir otro tratamiento uno continuo, mientras que una concentración o cantidad favorable de analitobservado luego del tratamiento confirma que el sujeto se beneficiará de recibir más tratamiento uno continuo. Esta conformación ayuda con el manejo de los estudios clínicos, y con la provisión de un mejor cuidado para el paciente.

Aun queda sin decir que, mientras que ciertas formas de realización de la presente documentación son ventajosas cuando se las emplea para evaluar una enfermedad, desorden o condición dada como se expuso en la presente documentación, se pueden emplear los ensayos y conjuntos de componentes para evaluar analito en otras enfermedades, desordenes o condiciones. El método de ensayo también puede involucrar el ensayo de otros marcadores y similares.

El método de ensayo también se puede usar para identificar un compuesto que alivia una enfermedad, desorden o condición dada. Por ejemplo, se puede poner en contacto una célula que expresa analito con un compuesto candidato. El nivel de expresión de analito en la célula que está en contacto con el compuesto se puede comparar con el de una célula control usando el método de ensayo que se describe en la presente documentación.

II. Conjunto de componentes

También se provee un conjunto de componentes para ensayar una muestra de prueba para estudiar la presencia, cantidad o concentración de un analito (o fragmento del mismo) en una muestra de prueba. El conjunto de componentes comprende al menos un componente para ensayar la muestra de prueba para estudiar el analito (o fragmento del mismo) e instrucciones para ensayar la muestra de prueba para estudiar el analito (o fragmento del mismo). El al menos un componente para ensayar la muestra de prueba para estudiar el analito (o fragmento del mismo) puede incluir una composición que comprende una DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma) anti-analito, que opcionalmente esta inmovilizada sobre una fase sólida.

El conjunto de componentes puede comprender al menos un componente para ensayar la muestra de prueba para investigar un analito mediante inmunoensayo, por ejemplo, inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscente, e instrucciones para ensayar la muestra de prueba para investigar un analito mediante inmunoensayo, por ejemplo, inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscente. Por ejemplo, el conjunto de componentes puede comprender al menos un miembro de unión específica para investigar un analito, tal como un anticuerpo anti-analito, monoclonal/policlonal (o fragmento del mismo que puede unir al analito, una variante del mismo que pueda unir al analito, o un fragmento de una variante que puede unir al analito) o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma), cualquiera de las cuales puede estar detectablemente marcada. Como alternativa o adicionalmente, el conjunto de componentes puede comprender

analito detectablemente marcado (o fragmento del mismo que puede unir a un anticuerpo anti-analito, monoclonal/policlonal o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma)), que puede competir con cualquier analito en una muestra de prueba por la unión con un anticuerpo anti-analito, monoclonal/policlonal (o fragmento del mismo que puede unir al analito, una variante del mismo que puede unir al analito, o un fragmento de una variante que puede unir al analito) o una DVD-Ig anti-analito (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma), cualquiera de los cuales puede estar inmovilizado sobre un soporte sólido. El conjunto de componentes puede comprender un calibrador o control, por ejemplo, analito aislado purificado. El conjunto de componentes puede comprender al menos un recipiente (por ejemplo, tubo, placas de microtitulación o tiras, que ya pueden estar recubiertas con un primer miembro de unión específica, por ejemplo) para llevar a cabo el ensayo, y/o un amortiguador, tal como un amortiguador de ensayo un amortiguador de lavado, cualquiera de los cuales se puede proveer como una solución concentrada, una solución de sustrato para la marca detectable (por ejemplo, una marca enzimática), o una solución de detención. Preferentemente, el conjunto de componentes comprende todos los componentes, o sea, reactivos, estándares, amortiguadores, diluyentes, etc., que son necesarios para llevar a cabo el ensayo. Las instrucciones pueden estar en forma de papel o en forma asequible por computadora, tal como un disco, CD, DVD, o similar.

Más específicamente, se provee un conjunto de componentes para ensayar una muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo). El conjunto de componentes comprende al menos un componente para

ensayar la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo) es instrucciones para ensayar la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo), en donde el al menos un componente incluye al menos una composición que comprende una proteína de unión, que (i') comprende una cadena polipeptídica que comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada que se obtuvo de un primer anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada que se obtuvo de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), que puede ser igual a o diferente del primer anticuerpo parental, C es un domino constante de cadena pesada, (X1)n es un adaptador que está opcionalmente presente y, cuando está presente es distinto a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y (ii') puede unir un par de antígenos, en donde la proteína de unión opcionalmente está marcada en forma detectable.

Además se provee otro conjunto de componentes para ensayar una muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo). El conjunto de componentes comprende al menos un componente para ensayar la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo) es instrucciones para ensayar la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo), en donde el al menos un componente incluye al menos una composición que comprende una proteína de unión, que (i') comprende una cadena polipeptídica que comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer domino variable de cadena liviana que se obtuvo de un primer anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), VD2 es un segundo domino variable de cadena liviana que se obtuvo de un segundo anticuerpo parental (o porción

de unión a antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un domino constante de cadena liviana, (X1)n es un adaptador que está opcionalmente presente y, cuando está presente es distinto a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y (ii') puede unir un par de antígenos, en donde la proteína de unión opcionalmente está marcada en forma detectable.

Aun se provee otro conjunto de componentes para ensayar una muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo). El conjunto de componentes comprende al menos un componente para ensayar la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo) es instrucciones para ensayar la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo), en donde el al menos un componente incluye al menos una composición que comprende una proteína de unión, que (i') comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, en donde la primera cadena polipeptídica comprende un primer VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada que se obtuvo de un primer anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada que se obtuvo de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un domino constante de cadena pesada, (X1)n es un adaptador que está opcionalmente presente y, cuando está presente es distinto a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y en donde la segunda cadena polipeptídica comprende un segundo VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer domino variable de cadena liviana que se obtuvo de un primer anticuerpo

parental (o porción de unión a antígeno del mismo), VD2 es un segundo domino variable de cadena liviana que se obtuvo de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un domino constante de cadena liviana, (X1)n es un adaptador que está opcionalmente presente y, cuando está presente es distinto a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y (ii') puede unir un par de antígenos, en donde la proteína de unión opcionalmente está marcada en forma detectable.

Aun se provee otro conjunto de componentes para ensayar una muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo). El conjunto de componentes comprende al menos un componente para ensayar la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo) es instrucciones para ensayar la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo), en donde el al menos un componente incluye al menos una composición que comprende a DVD-Ig, que (i') comprende cuatro cadenas polipeptídicas, en donde la primera y la tercera cadenas polipeptídicas comprende un primer VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada que se obtuvo de un primer anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada que se obtuvo de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un domino constante de cadena pesada, (X1)n es un adaptador que está opcionalmente presente y, cuando está presente es distinto a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y en donde la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas comprenden un segundo VD1-

(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer domino variable de cadena liviana que se obtuvo de un primer anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), VD2 es un segundo domino variable de cadena liviana que se obtuvo de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión a antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un domino constante de cadena liviana, (X1)n es un adaptador que está opcionalmente presente y, cuando está presente es distinto a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y (ii') puede unir a dos antígenos (o fragmentos de los mismos), en donde la DVD-Ig está opcionalmente marcada en forma detectable.

Cualquier anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-analito una DVD-Ig anti-analito, o trazador puede incorporar una marca detectable como se describe en la presente documentación, tal como un fluoróforo, un grupo radiactivo, una enzima, una marca de biotina/avidina, un cromóforo, una marca quimioluminiscente, o similares, o el conjunto de componentes puede incluir reactivos para llevar a cabo el marcaje detectable. Los anticuerpos, calibradores y/o controles se pueden proveer en recipientes separados o pre-dispensados en un formato de ensayo apropiado, por ejemplo, en placas de microtitulación.

Opcionalmente, el conjunto de componentes incluye componentes de control de calidad (por ejemplo, paneles de sensibilidad, calibradores, y controles positivos). La preparación de los reactivos de control de calidad es bien conocida en el arte y se describe en las instrucciones de una variedad de productos de inmunodiagnótico. Los miembros del panel de sensibilidad opcionalmente se usan para estableces características del rendimiento del

ensayo, y además opcionalmente son indicadores útiles de la integridad de los reactivos del conjunto de componentes de inmunoensayo, y la estandarización de los ensayos.

El conjunto de componentes opcionalmente también puede incluir otros reactivos que se requieren para llevar a cabo un ensayo diagnostico para facilitar las evaluaciones de control de calidad, tales como amortiguadores, sales, enzimas, cofactores de enzimas, sustratos de enzimas, reactivos de detección, y similares. Otros componentes, tales como amortiguadores y soluciones para el aislamiento y/o tratamiento de una muestra de prueba (por ejemplo, reactivos de pretratamiento), también se pueden incluir en el conjunto de componentes. El conjunto de componentes además puede incluir uno más de de otros controles. Uno más de los componentes del conjunto de componentes puede esta liofilizado, en cuyo caso el conjunto de componentes además puede comprender reactivo apropiados para la reconstitución de los componentes liofilizados.

Los diferentes componentes del conjunto de componentes opcionalmente se proveen en recipientes apropiados según sea necesario, por ejemplo, una placa de microtitulación. El conjunto de componentes además puede incluir recipientes para sostener o almacenar una muestra (por ejemplo, un recipiente o cartucho para una muestra de orina). En los casos apropiados, el conjunto de componentes opcionalmente también pueden contener recipientes de reacción, recipientes de mezclado, y otros componentes que facilite la preparación de reactivos o de la muestra de prueba. El conjunto de componentes también puede incluir uno más instrumentos para asistir en la

obtención de una muestra de prueba, tal como una jeringa, pipeta, pinzas, cuchara de medida, o similares.

Si la marca detectable es al menos un compuesto de acridinio, el conjunto de componentes puede comprender al menos una acridinio-9-carboxamida, al menos un éster de acridinio-9-carboxilato de arilo, o cualquier combinación de los mismos. Si la marca detectable es al menos un compuesto de acridinio, el conjunto de componentes también puede comprender una fuente de peróxido de hidrógeno, tal como un amortiguador, una solución, y/o al menos una solución básica. Si se desea, el conjunto de componentes puede contener una fase sólida, tal como una partícula magnética, esfera, tubo de ensayo, placa de microtitulación, cubeta, membrana, molécula de andamiaje, película, papel de filtro, disco chip.

C. Adaptación del Conjunto de Componentes y Método

El conjunto de componentes (o los componentes del mismo), así como también el método para determinar la presencia, cantidad o concentración de un analito en una muestra de prueba mediante un ensayo, tal como un inmunoensayo como se describe en la presente documentación, se puede adaptar para usar en una variedad de sistemas automatizados y semiautomatizados (incluyendo a aquellos en donde la fase sólida comprende una micropartícula), como se describe, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.089.424 y 5.006.309, y como se encuentra comercialmente en el mercado, por ejemplo, en Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) como ARCHITECT®.

Algunas de las diferencias entre un sistema automatizado semiautomatizado en comparación con un sistema no automatizado (por

ejemplo, ELISA) incluye el sustrato sobre el que se adhiere el primer miembro de unión específica (por ejemplo, un anticuerpo anti-analito, monoclonal/policlonal (o fragmento del mismo, una variante del mismo, o un fragmento de una variante del mismo) o una DVD-Ig anti-analito (o fragmento de la misma, una variante de la misma, o un fragmento de una variante de la misma); de cualquier forma, puede haber un impacto sobre la formación del sandwich y la reactividad del analito, y la longitud y ritmo de la captura, detección y/o cualquier paso de lavadopcional. Mientras que un formato no automatizado, tal como un ELISA, puede requerir un tiempo de incubación relativamente más largo con la muestra y con el reactivo de captura (por ejemplo, alrededor de 2 horas), un formato automatizado semiautomatizado (por ejemplo, ARCHITECT®, Abbott Laboratories) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (por ejemplo, de aproximadamente 18 minutos para ARCHITECT®). En forma similar, mientras que un formato no automatizado, tal como un ELISA, puede incubar a un anticuerpo de detección, tal como el reactivo conjugado, durante un tiempo de incubación relativamente más largo (por ejemplo, alrededor de 2 horas), un formato automatizado semiautomatizado (por ejemplo, ARCHITECT®) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (por ejemplo, de aproximadamente 4 minutos para el ARCHITECT®).

Otras plataformas disponibles de Abbott Laboratories incluyen, pero no como limitación, AxSYM®, IMx® (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 5.294.404), PRISM®, EIA (esfera), y Quantum™ II, así como también otras plataformas. Además, los ensayos, conjuntos de componentes y los componentes del conjunto de componentes se pueden emplear en otros

formatos, por ejemplo, en otros sistemas de ensayo electroquímicos manuales o cerca del paciente. La presente exposición es, por ejemplo, aplicable al sistema de inmunoensayo electroquímico Abbott Point of Care (i-STAT®, Abbott Laboratories) que lleva a cabo inmunoensayos en sandwich. Los inmunosensores y sus métodos de fabricación y operación en dispositivos de prueba descartables se describe, por ejemplo en Patente de los EE.UU. No. 5.063.081, Pub. de Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 2003/0170881, 7.419.821 y 7.682.833 y Patente de los EE.UU. No. 2004/0018577 y 2006/0160164.

En particular, con respecto a la adaptación de un ensayo de analito al sistema I-STAT®, se prefiere la siguiente configuración. Se fabrica un chip de silicio microfabricado con un par de electrodos de trabajo amperométricos de oro y un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata. Sobre uno de los electrodos de trabajo, se adhieren esferas de poliestireno (0,2 mm de diámetro) con anticuerpo anti-analito, monoclonal/policlonal (o fragmento del mismo, una variante del mismo, o un fragmento de una variante del mismo) o anti-analito DVD-Ig (o fragmento de la misma, una variante de la misma, o un fragmento de una variante de la misma) inmovilizada, sobre un recubrimiento de polímero de polivinil alcohol diseñado sobre el electrodo. Este chip se ensambla en un cartucho I-STAT® con un formato para fluidos apropiado para inmunoensayos. Sobre una porción de la pared de la cámara que sostiene la muestra en el cartucho hay una capa que comprende un miembro de unión específica para investigar un analito, tal como un anticuerpo anti-analito, monoclonal/policlonal (o fragmento del mismo, una variante del mismo, o un fragmento de una variante del mismo que puede unir al analito) o una DVD-Ig anti-analito (o

fragmento de la misma, una variante de la misma, o un fragmento de una variante de la misma que puede unir al analito), cualquiera de los cuales puede estar detectablemente marcado. Dentro de la bolsa para fluidos del cartucho hay un reactivo acuoso que incluye fosfato de p-aminofenol.

Durante la operación, se agrega una muestra sospechosa de contener un analito a la cámara para sostén de muestras del cartucho de pruebas, y se inserta el cartucho en el lector I-STAT®. Luego de que se ha disuelto el miembro de unión específica para investigar un analito en la muestra, un elemento bomba dentro del cartucho fuerza a la muestra hacia un conducto que contiene el chip. Aquí, se la hace oscilar para promover la formación del sandwich. En el anteúltimo paso del ensayo, se fuerza al fluido para que salga de la bolsa y para que entre al conducto para lavar la muestra para sacarla del chip y llevarla hacia la cámara de deshechos. En el paso final del ensayo, la marca de fosfatasa alcalina reacciona con el fosfato de p-aminofenol para clivar el grupo fosfato y permitir al p-aminofenol liberado ser oxidado electroquímicamente en el electrodo de trabajo. En base a la corriente medida, el lector es capaz de calcular la cantidad de analito en la muestra por medio de un algoritmo y una curva de calibración determinada en fábrica.

Aun queda sin decir que los métodos y conjuntos de componentes como se los describe la presente documentación abarcan necesariamente otros reactivos y métodos para llevar a cabo el inmunoensayo. Por ejemplo, están abarcados diferentes amortiguadores tales como los que se conocen en el arte y/o que se pueden preparar fácilmente u optimizar para su empleo, por ejemplo, para lavar, como diluyente de conjugado, diluyente de micropartículas, y/o como diluyente de calibrador. Un ejemplo de diluyente de conjugado es el

diluyente de conjugado ARCHITECT® que se emplea en ciertos conjuntos de componentes (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y que contiene ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), una sal, un bloqueador de proteínas, un agente antimicrobiano, y un detergente. Un ejemplo de diluyente de calibrador es el diluyente de calibrador humano ARCHITECT® que se emplea en ciertos conjuntos de componentes (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), que comprende un amortiguador que contiene MES, otra sal, un bloqueador de proteínas, y un agente antimicrobiano. Además, como se describe en la Solicitud de patente de los EE.UU. No. 61/142.048 presentada el 31 de Diciembre de 2008, se puede obtener una mejor generación de señal, por ejemplo, en un formato de cartucho I-Stat, usando una secuencia de ácidos nucleicos conectada al anticuerpo señal como amplificador de señal.

EJEMPLOS

Resultará evidente para aquellos entrenados en la técnica que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos descriptos en la presente pueden llevarse a cabo mediante el uso de equivalentes adecuados sin perder relación con el alcance de la invención reivindicada o de las formas de realización divulgadas en la presente. Habiéndose descripto la presente invención en detalle, la misma resultará más clara con la inclusión de los ejemplos siguientes, que sirven propósitos puramente ilustrativos y no pretenden limitar la presente invención.

Ejemplo 1: Diseño, construcción y análisis de una DVD-Ig

Ejemplo 1.1: Ensayos usados para identificar y caracterizar anticuerpos

parentales y DVD-Ig

Se usaron los siguientes ensayos en todos los ejemplos para identificar y caracterizar anticuerpos parentales y DVD-Ig, a menos que se indique de otra manera.

Ejemplo 1.1.1: Ensayos usados para determinar la unión y afinidad de los anticuerpos parentales y DVD-Ig por su(s) antígeno(s) blanco

Ejemplo 1.1.1A: ELISA de unión directa

Los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima para seleccionar a los anticuerpos que se unen a antígeno blanco deseado se condujeron de la siguiente manera. Se recubrieron placas para ELISA de gran unión (Corning Costar N° 3369, Acton, MA) con 100 µl/cavidad de 10 µg/ml del antígeno blanco deseado (O&D Systems, Minneapolis, MN) o la proteína de fusión de FC/dominio extracelular del antígeno blanco deseado (O&D Systems, Minneapolis, MN) o anticuerpo monoclonal anti-polihistidina de ratón (O&D Systems N° MAB050, Minneapolis, MN) en solución amortiguadora fosfato salina (PBS 10X, Abbott Bioresearch Center, Media Prep N° MPS-073, Worcester, MA) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS que contiene Tween 20 0,02%. Las placas se bloquearon por adición de 300 µl/cavidad de solución de bloqueo (leche en polvo descremada, diversos proveedores minoristas, diluida al 2% en PBS) durante 1/2 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cuatro veces después del bloqueo con PBS que contiene Tween 20 0,02%.

Como alternativa, se agregaron cien microlitros por cavidad de antígeno blanco deseado marcado con histidina (His) (O&D Systems, Minneapolis, MN) 10 µg/ml a las placas para ELISA recubiertas con el anticuerpo monoclonal

anti-polihistidina de ratón descrito precedentemente y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las cavidades se lavaron cuatro veces con PBS que contiene Tween 20 0,02%.

Se agregaron cien microlitros de preparaciones de anticuerpo DVD-Ig diluidas en solución de bloqueo como se describió precedentemente a la placa con el antígeno blanco deseado a la placa de la fusión del antígeno blanco deseado / FC o la placa de anticuerpo anti-polihistidina / antígeno blanco deseado marcado con His preparado como describió precedentemente y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las cavidades se lavan cuatro veces con PBS que contiene Tween 20 0,02%.

Se agregaron cien microlitros de anticuerpo anti-IgG humana específica de FC de cabra conjugado con HRP (Southern Biotech N° 2040-05, Birmingham, AL) 10 ng/ml a cada cavidad de la placa del antígeno blanco deseado de la placa de anticuerpo anti-polihistidina / antígeno blanco deseado marcado con histidina. Como alternativa, se agregaron cien microlitros de anticuerpo anti-IgG humana específico de la cadena liviana kappa de cabra conjugado con HRP (Southern Biotech N° 2060-05 Birmingham, AL) 10 ng/ml a cada cavidad de la placa de la fusión de FC/antígeno blanco deseado y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4 veces con PBS que contiene Tween20 0,02%.

Se agregaron cien microlitros de solución TMB mejorada (Neogen Corp. N° 308177, K Blue, Lexington, KY) a cada cavidad y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por adición de 50 µl de ácido sulfúrico 1N. Las placas se leyeron por espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm.

En el ELISA de unión directa, a veces no se observaba unión, probablemente porque el sitio de unión del anticuerpo sobre el antígeno blanco estaba "enmascarado" o porque el antígeno es "distorsionado" cuando recubre la superficie de plástico. La incapacidad de una DVD-Ig de unirse a su blanco también puede deberse a una limitación estérica impuesta a la DVD-Ig por el formato del ELISA de unión directa. Los anticuerpos parentales y las DVD-Ig que no se unieron en el formato ELISA de unión directa se unieron al antígeno blanco en otros formatos de ELISA, tales como FACS, Biacore o bioensayos. La ausencia de unión de la DVD-Ig también se restablece ajustando la longitud del conector entre los dos dominios variables de la DVD-Ig, como se mostró previamente.

Ejemplo 1.1.1.B: **ELISA de captura**

Las placas para ELISA (Nunc, MaxiSorp, Rochester, NY) se incuban durante la noche a 4°C con anticuerpo anti-Fc humano (5 µg/ml en PBS, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Las placas se lavan tres veces en solución amortiguadora de lavado (PBS que contiene Tween 20 0,05%) y se bloquean durante 1 hora a 25°C en solución amortiguadora de bloqueo (PBS que contiene BSA 1%). Las cavidades se lavan tres veces, y se agregan diluciones en serie de cada anticuerpo DVD-Ig en PBS que contiene BSA 0,1% a las cavidades y se incuban a 25°C durante 1 hora. Las cavidades se lavan tres veces, y se agrega VEGF biotinilado (2 nM) a las placas y se incuban durante 1 hora a 25°C. Las cavidades se lavan tres veces y luego se incuban durante 1 hora a 25°C con estreptavidina-HRP (KPL N° 474-3000, Gaithersburg, MD). Las cavidades se lavan tres veces y se agregan 100 µ l de ULTRA-TMB ELISA (Pierce, Rockford, IL) por cavidad. Después del desarrollo

de color la reacción se detiene con HCl 1N y se mide la absorbancia a 450 nM.
Ejemplo 1.1.1.C: Determinación de la afinidad usando tecnología BIACORE

Tabla 3: Reactivo usado en los análisis con Biacore

Antígeno	**Denominación del proveedor**	**Proveedor**	**Nº catálogo**
NGF	β-NGF humana recombinante	R&D systems	256-GF
TNFα	TNF-α/TNFSF1A humana recombinante	R&D systems	210-TA
SOST	SOST humana recombinante	R&D systems	1406-ST

ECD = Dominio extracelular

/FC = proteína de fusión del antígeno/dominio FC de IgG

Métodos con BIACORE:

El ensayo BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) determina la afinidad de los anticuerpos o DVD-Ig con las mediciones cinéticas de las constantes de asociación y disociación. La unión de los anticuerpos o DVD-Ig a un antígeno blanco (por ejemplo, un antígeno blanco recombinante purificado) se determinó por mediciones basadas en resonancia de plasmón superficial con un instrumento Biacore® 1000 ó 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia) usando HBS-EP de corrida (HEPES 10 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y agente tensioactivo P20 0,005%) a 25° C. Todos los compuestos químicos se obtuvieron de Biacore® AB (Uppsala, Suecia) o de lo contrario de una fuente diferente según se describe en el texto. Por ejemplo, se inmovilizaron aproximadamente 5000 RU de anti-IgG de ratón de cabra, (Fc□), anticuerpo policlonal específico del fragmento (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) directamente por medio de un chip biosensor de grado investigación CM5 usando un conjunto de elementos para acoplamiento de aminas estándar de acuerdo con las instrucciones y

procedimientos del proveedor a 25 µg/ml. Los grupos sin reaccionar sobre la superficie del biosensor se bloquean con etanolamina. Se usa una superficie de carboximetil dextrano modificada en las celdas de flujo 2 y 4 como superficie de reacción. Se usa carboximetil dextrano no modificado sin anti-IgG de ratón de cabra en las celdas de flujo 1 y 3 como superficie de referencia. Para el análisis cinético, se ajustan simultáneamente ecuaciones derivadas del modelo de unión de Langmuir 1:1 a las fases de asociación y disociación de las ocho inyecciones (usando un análisis de ajuste global) utilizando el software Biaevaluation 4.0.1. Los anticuerpos o DVD-Ig purificados se diluyen en solución amortiguadora salina-HEPES para la captura a través de superficies de reacción específicas de anti-IgG de ratón de cabra. Los anticuerpos o DVD-Ig a capturar como ligando (25 □g/ml) se inyectan sobre matrices de reacción a una velocidad de flujo de 5 □l/min. Las constantes de asociación y disociación, k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (s^{-1}) se determinan bajo una velocidad de flujo continua de 25 µl/min. Las constantes de disociación se derivan efectuando mediciones de la cinética de unión a diferentes concentraciones de antígeno que varían en un rango entre 10 - 200 nM. La constante de disociación del equilibrio (M) de la reacción entre los anticuerpos o DVD-Ig y el antígeno blanco se calcula luego a partir de las constantes cinéticas según la siguiente fórmula: $K_D = k_{off}/k_{on}$. La unión se registra como una función del tiempo y se calculan las constantes cinéticas. En este ensayo, se pueden medir constantes de asociación tan rápidas como $10^6 M^{-1}s^{-1}$ y disociaciones tan lentas como $10^6 s^{-1}$.

Tabla 4: Análisis <u>BIACORE de Anticuerpos Parentales y Construcciones de DVD-Ig</u>

ID del	Dominio	Dominio	k_{on}	k_{off}	K_D

			(M-1s-1)	(s-1)	(M)
AB017	TNF (seq 1)		3.23E+06	1.08E-04	3.35E-11
AB020	NGF		6.06E+05	4.08E-06	6.73E-12
AB022	SOST		9.68E+06	3.96E-06	4.08E-11
AB213	TNF (seq 2)		3.23E+06	1.08E-04	3.35E-11
AB214	TNF (seq 3)		2.73E+06	2.91E-04	1.07E-10
AB215	TNF (seq 4)		1.74E+06	2.72E-04	1.57E-10
AB217	TNF (seq 5)		1.85E+06	5.04E-05	2.72E-11
AB218	TNF (seq 6)		1.79E+06	5.15E-05	2.88E-11
DVD1221	PGE2	TNF (seq 2)	6.27E+05	1.41E-04	2.25E-10
DVD1224	TNF (seq 4)	PGE2	2.01E+06	3.49E-04	1.74E-10
DVD1225	PGE2	TNF (seq 4)	4.43E+05	1.12E-03	2.70E-09
AB213	TNF (seq 2)		3.23E+06	1.08E-04	3.35E-11
AB022	SOST		9.68E+06	3.96E-06	4.08E-11
DVD1226	TNF (seq 2)		4.02E+06	1.16E-04	2.88E-11
DVD1226		SOST	7.34E+04	1.99E-04	2.71E-09
DVD1227	SOST		7.05E+06	2.11E-04	3.00E-11
DVD1227		TNF (seq 2)	1.22E+05	4.64E-05	3.81E-10
AB214	TNF (seq 3)		2.73E+06	2.91E-04	1.07E-10
AB022	SOST		9.68E+06	3.96E-06	4.08E-11
DVD1229	SOST		8.43E+06	1.90E-04	2.26E-11
DVD1229		TNF (seq 3)	1.10E+05	3.98E-04	3.60E-09
AB215	TNF (seq 4)		1.74E+06	2.72E-04	1.57E-10
AB022	SOST		9.68E+06	3.96E-06	4.08E-11
DVD1230	TNF (seq 4)		1.69E+06	2.23E-04	1.32E-10
DVD1230		SOST	6.11E+04	2.90E-04	4.74E-09
DVD1231	SOST		8.27E+06	2.44E-04	2.96E-11
DVD1231		TNF (seq 4)	4.53E+05	6.88E-04	1.52E-09
AB213	TNF (seq 2)		3.23E+06	1.08E-04	3.35E-11
AB020	NGF		6.06E+05	4.08E-06	6.73E-12
DVD1232	TNF (seq 2)		1.94E+06	1.04E-04	5.35E-11
DVD1232		NGF	-	-	-
DVD1233	NGF		8.40E+05	1.82E-05	2.17E-11
DVD1233		TNF (seq	2.44E+05	2.82E-05	1.15E-10

ID del anticuerpo parental o DVD-Ig	Dominio variable N-Terminal (VD)	Dominio variable C-Terminal (VD)	k_{on} (M-1s-1)	k_{off} (s-1)	K_D (M)
		2)			
AB215	TNF (seq 4)		1.74E+06	2.72E-04	1.57E-10
AB020	NGF		6.06E+05	4.08E-06	6.73E-12
DVD1236	TNF (seq 4)		2.23E+06	3.79E-04	1.70E-10
DVD1236		NGF	7.72E+04	1.65E-05	2.14E-10
DVD1237	NGF		7.60E+05	1.76E-05	2.31E-11
DVD1237		TNF (seq 4)	2.79E+05	9.52E-04	3.42E-09
AB213	TNF (seq 2)		3.23E+06	1.08E-04	3.35E-11
DVD1238	TNF (seq 2)	LPA	3.99E+06	9.18E-05	7.33E-11
DVD1239	LPA	TNF (seq 2)	8.24E+04	6.00E-05	7.28E-10
AB214	TNF (seq 3)		2.73E+06	2.91E-04	1.07E-10
DVD1241	LPA	TNF (seq 3)	1.04E+05	1.53E-04	1.48E-09
AB215	TNF (seq 4)		1.74E+06	2.72E-04	1.57E-10
DVD1242	TNF (seq 4)	LPA	1.59E+06	3.37E-04	2.13E-10
DVD1243	LPA	TNF (seq 4)	2.99E+05	1.18E-03	3.95E-09
AB017	TNF (seq 1)		3.23E+06	1.08E-04	3.35E-11
DVD1244	TNF (seq 1)	LPA	1.83E+06	1.10E-04	6.01E-11
DVD1245	LPA	TNF (seq 1)	1.02E+05	2.03E-04	1.98E-09
AB217	TNF (seq 5)		1.85E+06	5.04E-05	2.72E-11
DVD1246	TNF (seq 5)	PGE2	2.46E+06	7.43E-05	3.02E-11
DVD1247	PGE2	TNF (seq 5)	3.95E+05	1.10E-04	2.79E-10
AB217	TNF (seq 5)		1.85E+06	5.04E-05	2.72E-11
AB022	SOST		9.68E+06	3.96E-06	4.08E-11
DVD1248	TNF (seq 5)		2.83E+06	5.94E-05	2.10E-11
DVD1248		SOST	7.14E+06	3.90E-04	5.46E-11
DVD1249	SOST		9.42E+06	1.59E-04	1.70E-11

ID del anticuerpo parental o DVD-Ig	Dominio variable N-Terminal (VD)	Dominio variable C-Terminal (VD)	k_{on} (M-1s-1)	k_{off} (s-1)	K_D (M)
DVD1249		TNF (seq 5)	6.49E+05	2.53E-04	3.89E-10
AB217	TNF (seq 5)		1.85E+06	5.04E-05	2.72E-11
AB020	NGF		6.06E+05	4.08E-06	6.73E-12
DVD1250	TNF (seq 5)		2.16E+06	4.61E-05	2.14E-11
DVD1250		NGF	3.48E+03	1.02E-05	2.93E-09
DVD1251	NGF		8.42E+05	1.17E-05	1.39E-11
DVD1251		TNF (seq 5)	6.41E+05	5.73E-05	8.94E-11
AB217	TNF (seq 5)		1.85E+06	5.04E-05	2.72E-11
DVD1252	TNF (seq 5)	LPA	1.55E+06	1.75E-05	1.13E-11
DVD1253	LPA	TNF (seq 5)	2.77E+05	<1E-06	<3.61E-12
AB218	TNF (seq 6)		1.79E+06	5.15E-05	2.88E-11
DVD1254	TNF (seq 6)	PGE2	2.44E+06	3.64E-05	1.49E-11
DVD1255	PGE2	TNF (seq 6)	1.68E+05	4.24E-06	2.52D-11
AB218	TNF (seq 6)		1.79E+06	5.15E-05	2.88E-11
AB022	SOST		9.68E+06	3.96E-06	4.08E-11
DVD1256	TNF (seq 6)		2.46E+06	8.55E-05	3.47E-11
DVD1256		SOST	2.30E+05	3.65E-04	1.59E-09
DVD1257	SOST		6.51E+06	2.15E-04	3.12E-11
DVD1257		TNF (seq 6)	1.88E+05	2.66E-05	1.42E-10
AB218	TNF (seq 6)		1.79E+06	5.15E-05	2.88E-11
AB020	NGF		6.06E+05	4.08E-06	6.73E-12
DVD1258	TNF (seq 6)		1.90E+06	5.95E-05	2.94E-11
DVD1258		NGF	5.53E+04	2.37E-06	4.28E-11
DVD1259	NGF		8.28E+04	6.07E-06	7.33E-11
DVD1259		TNF (seq 6)	8.28E+04	6.07E-06	7.33E-11
AB218	TNF (seq 6)		1.79E+06	5.15E-05	2.88E-11
DVD1260	TNF (seq	LPA	2.20E+06	4.26E-05	1.93E-11

ID del anticuerpo parental o DVD-Ig	Dominio variable N-Terminal (VD)	Dominio variable C-Terminal (VD)	k_{on} (M-1s-1)	k_{off} (s-1)	K_D (M)
	6)				
DVD1261	LPA	TNF (seq 6)	8.94E+04	<1E-06	<1.12E-11

Se mantuvo la unión de todas las construcciones de DVD-Ig caracterizada con Biacore y era comparable a la de los anticuerpos parentales. Todos los dominios variables N-terminales se unieron con una afinidad alta similar a la del anticuerpo parental.

Ejemplo 1.1.2: Ensayos usados para determinar la actividad funcional de los anticuerpos parentales y las DVD-Ig

Ejemplo 1.1.2.A: Bioensayo con citoquinas

Se analiza la capacidad de un anticuerpo parental anti-citoquina o anti-factor de crecimiento DVD-Ig que contiene secuencias anti-citoquina o anti-factor de crecimiento para inhibir o neutralizar la bioactividad de una citoquina o de un factor de crecimiento por determinación del potencial inhibidor del anticuerpo DVD-Ig. Por ejemplo, se puede usar la capacidad de un anticuerpo anti-IL-4 para inhibir la producción de la IgE mediada por IL-4. Por ejemplo, se aíslan células B naive humanas a partir de sangre periférica, respectivamente, células mononucleares por centrifugación por densidad con Ficoll-Paque, seguido por separación magnética con esferas MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) específicos para anticuerpos F(ab)2 de cabra marcados con sIgD FITC humana seguido por esferas anti-FITC MACS. Las células B naive separadas magnéticamente se ajustan en 3 x 10^5 células por ml en XV15 y se plaquean en 100 µl por cavidad de placas de 96 cavidades en un ordenamiento de 6 x 6 en el centro de la placa, rodeado por cavidades llenas

de PBS durante los 10 días de cultivo a 37° C en la presencia de 5% de CO_2. Se prepara una placa por cada anticuerpo a evaluar, que consiste de 3 cavidades de controles no inducidos e inducidos y repeticiones por quintuplicado de titulaciones de anticuerpo comenzando en 7 µg/ml y bajando la dilución por tercios hasta 29 ng/ml de concentración final, que luego se agregan a 50 µl de predilución concentrada cuatro veces. Para inducir la producción de IgE, se agregan 50 µl por vez de rhIL-4 a 20 ng/ml más anticuerpo monoclonal anti-CD40 (Novartis, Basel, Suiza) a una concentración final de 0,5 µg/ml a cada cavidad, y las concentraciones de IgE se determinan al final del período de cultivo mediante un método de ELISA sándwich estándar.

Ejemplo 1.1.2.B: Ensayo de liberación de citoquinas

Se analiza la capacidad de un anticuerpo parental o DVD-Ig para causar la liberación de citoquinas. Se extrae sangre periférica de tres donantes saludables por venipunción en tubos Vacutainer heparinizados. Se diluye sangre completa 1:5 con medio RPMI-1640 y se coloca en placas para cultivo tisular de 24 cavidades a razón de 0,5 ml por cavidad. Los anticuerpos anti-citoquina (por ejemplo, anti-IL-4) se diluyen en RPMI-1640 y se colocaron en las placas a razón de 0,5 ml/cavidad para obtener concentraciones finales de 200, 100, 50, 10 y 1 µg/ml. La dilución final de sangre completa en las placas de cultivo es de 1:10. Se agrega LPS y PHA a cavidades separadas a una concentración final de 2 µg/ml y 5 µg/ml como controles positivos para la liberación de citoquinas. Se usa IgG policlonal humano como anticuerpo de control negativo. El experimento se realiza por duplicado. Las placas se incuban a 37°C a 5% de CO_2. A las veinticuatro horas se transfiere el contenido

de las cavidades a tubos de ensayo y se centrifuga por 5 minutos a 1200 rpm. Se recolectan los sobrenadantes libres de células y se congelan para los ensayos con citoquinas. Las células que quedaron en las placas y en los tubos se lisan con 0,5 ml de solución de lisis y se colocan a –20°C y se descongelan. Se agregan 0,5 ml de medio (para llevar el volumen al mismo nivel que las muestras de sobrenadante libre de células) y las preparaciones de células se recolectan y congelan para los ensayos con citoquinas. Los sobrenadantes libres de células y los lisados celulares fueron evaluados por sus niveles de citoquina en un ELISA, por ejemplo, por sus niveles de IL-8, IL-6, IL-1β, IL-1RA o TNF-α.

Ejemplo 1.1.2.C: Estudio de reactividad cruzada de las citoquinas

1. Se analiza la capacidad de un anticuerpo parental o DVD-Ig anti-citoquina dirigido contra una o más citoquinas de interés para reaccionar de manera cruzada con otras citoquinas. Los anticuerpos parentales o DVD-Ig se inmovilizan sobre una matriz biosensora Biacore. Se une covalentemente un mAb anti-Fc humano por medio de grupos amina libres a la matriz de dextrano activando primero los grupos carboxilo sobre la matriz con N-hidroxisuccinimida (NHS) 100 mM y clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) 400 mM. Se inyectan aproximadamente 50 µl de cada preparación de anticuerpo DVD-Ig a una concentración de 25 µg/ml, diluida en acetato de sodio, pH 4,5, a través del biosensor activado y las aminas libres de la proteína se unen directamente a los grupos carboxilo activados. Típicamente, se inmovilizan 5000 unidades de resonancia (RU). Los grupos EDC-ésteres sin reaccionar de la matriz se desactivan mediante una inyección de etanolamina 1 M. Se prepara una segunda celda de flujo como estándar de referencia por

inmovilización de la IgG humana1/K usando el conjunto de elementos de acoplamiento de amina estándar. Las mediciones de SPR se efectúan usando el chip biosensor CM. Todos los antígenos que serán analizados sobre la superficie biosensora están diluidos en solución amortiguadora de corrida HBS-EP que contiene P20 0,01%.

2. Para examinar la especificidad de unión de las citoquinas, se inyectó un exceso de la citoquina de interés (100 nM, por ejemplo, recombinante soluble humana) a través de la superficie biosensora con el anticuerpo anti-citoquina parental o DVD-Ig inmovilizada (5 minutos de tiempo de contacto). Antes de inyectar la citoquina de interés e inmediatamente después, la solución amortiguadora HBS-EP fluye a través de cada celda de flujo. Se considera que la diferencia neta de las señales entre el nivel basal y el punto correspondiente a aproximadamente 30 segundos después de completar la inyección de la citoquina representa el valor de unión final. Nuevamente, la respuesta se mide en unidades de resonancia. Las matrices biosensoras se regeneran usando HCl 10 mM antes de la inyección de la siguiente muestra donde se observa un evento de unión, de lo contrario se inyectaba solución amortiguadora de corrida sobre las matrices. También se inyectan citoquinas humanas (por ejemplo, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-22, IL-23, IL-27, TNF-α, TNF-β y IFN-γ, por ejemplo) simultáneamente sobre la superficie de referencia con la IgG1/K de ratón inmovilizada para registrar toda unión basal no específica. Con la preparación de una superficie de referencia y de reacción, Biacore puede sustraer automáticamente los datos de la superficie de referencia de los datos de la superficie de reacción con el fin de eliminar la

mayor parte del cambio en el índice de refracción y el ruido de las inyecciones. Por consiguiente, es posible aseverar la verdadera respuesta de unión atribuida a una reacción de unión de un anticuerpo anti-citoquina o DVD-Ig.

3. Cuando se inyecta una citoquina de interés al anticuerpo anti-citoquina inmovilizado, se observa una unión significativa. La regeneración con HCl 10 mM remueve por completo todas las proteínas no covalentemente asociadas. El examen del sensorgrama muestra que la unión del anticuerpo anti-citoquina o DVD-Ig inmovilizado a una citoquina soluble es fuerte y robusta. Una vez confirmado el resultado esperado con la citoquina de interés, se evalúa el panel de citoquinas recombinantes humanas remanentes, para cada anticuerpo DVD-Ig por separado. Se registra la cantidad de citoquina unida o no unida al anticuerpo anti-citoquina o DVD-Ig para cada ciclo de inyección. Se utilizan los resultados de tres experimentos independientes para determinar el perfil de especificidad de cada anticuerpo DVD-Ig. Se seleccionan los anticuerpos o DVD-Ig con la unión esperada a la citoquina de interés y la ausencia de unión a cualquier otra citoquina.

Ejemplo 1.1.2.D: Reactividad cruzada con tejidos

Los estudios de reactividad cruzada con tejidos se efectúan en tres etapas, donde la primera etapa incluye criosecciones de 32 tejidos, la segunda etapa incluye hasta 38 tejidos y la 3ª etapa incluye tejidos adicionales de 3 adultos no relacionados como se describirá más adelante. Los estudios se conducen típicamente a dos niveles de dosis.

Etapa 1: Las criosecciones (de 5 µm aproximadamente) de tejidos humanos (32 tejidos (típicamente: glándula adrenal, tracto gastrointestinal, próstata, vejiga, corazón, músculo esquelético, células sanguíneas, riñón, piel,

médula ósea, hígado, médula espinal, mama, pulmón, bazo, cerebelo, nódulo linfático, testículos, corteza cerebral, ovario, timo, colon, páncreas, tiroides, endotelio, paratiroides, uréter, ojo, pituitaria, útero, tubo de Falopio y placenta) de un donante humanobtenido en una autopsia o biopsia) se fijan y secan sobre portaobjetos. Se efectúa una coloración con peroxidasa de las secciones de tejido, usando el sistema de avidina-biotina.

Etapa 2: Las criosecciones (de 5 µm aproximadamente) de 38 tejidos humanos (incluyendo adrenales, sangre, vasos sanguíneos, médula ósea, cerebelo, cerebro, cuello de útero, esófago, ojo, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, nódulo linfático, glándula mamaria, ovario, oviducto, páncreas, paratiroides, nervio periférico, pituitaria, placenta, próstata, glándula salival, piel, intestino delgado, médula espinal, bazo, estómago, músculo estriado, testículos, timo, tiroides, amígdala, uréter, vejiga urinaria y útero) de 3 adultos no relacionados obtenido en una autopsia o biopsia) se fijan y secan sobre portaobjetos. Se efectúa una coloración con peroxidasa de las secciones de tejido, usando el sistema de avidina-biotina.

Etapa 3: Las criosecciones (de 5 µm aproximadamente) de tejidos de monos macacos (38 tejidos (incluyendo adrenales, sangre, vasos sanguíneos, médula ósea, cerebelo, cerebro, cuello de útero, esófago, ojo, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, nódulo linfático, glándula mamaria, ovario, oviducto, páncreas, paratiroides, nervio periférico, pituitaria, placenta, próstata, glándula salival, piel, intestino delgado, médula espinal, bazo, estómago, músculo estriado, testículos, timo, tiroides, amígdala, uréter, vejiga urinaria y útero) de 3 monos adultos no relacionados obtenidos en una autopsia o biopsia) se fijan y secan sobre portaobjetos. Se efectúa una

coloración con peroxidasa de las secciones de tejido, usando el sistema de avidina-biotina.

El anticuerpo la DVD-Ig se incuba con el anti-IgG humana secundario biotinilado y se reveló en el complejo inmune. El complejo inmune a concentraciones finales de 2 y 10 µg/ml de anticuerpo DVD-Ig se agrega sobre las secciones de tejido sobre portaobjetos y luego las secciones de tejido se hacen reaccionar por 30 minutos con un conjunto de elementos de avidina-biotina-peroxidasa. A continuación, se aplica DAB (3,3'-diaminobencidina), un sustrato para la reacción con peroxidasa, por 4 minutos para la tinción del tejido. Se usan esferas de antígeno-Sepharose como secciones de tejido de control positivo. Los estudios de bloqueo con suero humano y antígeno blanco sirven como controles adicionales. El complejo inmune a concentraciones finales de 2 y 10 µg/ml de anticuerpo DVD-Ig se pre-incuba con el antígeno blanco (concentración final de 100 µg/ml) o suero humano (concentración final del 10%) por 30 minutos, y luego se agrega sobre las secciones de tejido sobre el portaobjetos y luego las secciones de tejido se hacen reacciona durante 30 minutos con un conjunto de elementos de avidina-biotina-peroxidasa. A continuación, se aplcia DAB (3,3'-diaminobencidina), un sustrato para la reacción con peroxidasa, por 4 minutos para la tinción del tejido.

Toda tinción específica es considerada reactividad esperada (por ejemplo, coherente con la expresión del antígeno) o no esperada basado en la expresión conocida del antígeno blanco en cuestión. Toda tinción considerada específica es calificada por su intensidad y frecuencia. La tinción de tejido entre la etapa 2 (tejido humano) y la etapa 3 (tejido de mono macaco) es considerada similar o diferente.

Ejemplo 1.1.2.E: Neutralización de huTNFα

Se crecieron células L929 a densidad semiconfluente y se cosecharon usando tripsina al 005% (Gibco#25300). Se lavaron las células con PBS, se contaron y se resuspendieron a 1E6 células/mL en medio de ensayo con 4 µg/mL de actinomicina D. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos (Costar#3599) a un volumen de 50 µL y 5E4 células/pocillo. Se diluyeron la DVD-Ig™ e IgG control a una concentración 4x en medio de ensayo y se prepararon diluciones 1:3. Se diluyó la huTNFα a 400 pg/mL en medio de ensayo. Se agregó una muestra de anticuerpo (200 µL) a la huTNFα (200 µL) en un esquema de dilución 1:2 y se dejó incubando durante 0,5 horas a temperatura ambiente.

Se agregó la solución de DVD-Ig™ / huTNFα a las células plaqueadas a 100 µL para una concentración final de 100 pg/mL de huTNFα y entre 25 nM y 0,00014 nM de DVD-Ig™. Se incubaron las placas durante 20 horas a 37°C, CO_2 al 5%. Para cuantificar la viabilidad, se tomaron 100 µL de los pocillos y se agregaron 10 µL de reactivo WST-1 (Roche # de catálogo 11644807001). Se incubaron las placas bajo las condiciones de ensayo durante 3,5 horas, se centrifugaron a 500 x g y se transfirieron 75 µL de sobrenadante a una placa de ELISA (Costar # de catálogo 3369). Se leyeron las placas a OD entre 420 y 600 nm en un lector de placas de ELISA Spectromax 190. En la Tabla 5 se incluye una EC50 promedio de varios ensayos para las construcciones de DVD-Ig que contienen las diferentes secuencias de TNF.

Tabla 5: Ensayo de Neutralización de HuTNFα Con Diferentes Anticuerpos Parentales de huTNFα y Construcciones de DVD-Ig

Anticuerpo Parental o DVD-Ig ID	Domino Variable N-terminal (VD)	Domino Variable C-terminal (VD)	EC50 de Ensayo de Neutralización de TNFα con VD N-terminal nM	EC50 de Ensayo de Neutralización de TNFα con VD C-terminal nM
AB017	TNF (sec 1)		0,0145	
AB213	TNF (sec 2)		0,189	
AB214	TNF (sec 3)		0,04	
AB215	TNF (sec 4)		1,21	
AB217	TNF (sec 5)		0,212	
AB218	TNF (sec 6)		0,0345	
DVD1221	PGE2	TNF (sec 2)	-	5,238
DVD1224	TNF (sec 4)	PGE2	0,8261	-
DVD1226	TNF (sec 2)	SOST	0,0409	-
DVD1227	SOST	TNF (sec 2)	-	1,227
DVD1230	TNF (sec 4)	SOST	1,053	-
DVD1233	NGF	TNF (sec 2)	-	42,39
DVD1236	TNF (sec 4)	NGF	3,313	-
DVD1238	TNF (sec 2)	LPA	0,0009	-
DVD1239	LPA	TNF (sec 2)	-	4,572
DVD1242	TNF (sec 4)	LPA	1,294	-
DVD1244	TNF (sec 1)	LPA	0,06415	-
DVD1245	LPA	TNF (sec 1)	-	2,734
DVD1246	TNF (sec 5)	PGE2	0,02	-

Anticuerpo Parental o DVD-Ig ID	Domino Variable N-terminal (VD)	Domino Variable C-terminal (VD)	EC50 de Ensayo de Neutralización de TNFα con VD N-terminal nM	EC50 de Ensayo de Neutralización de TNFα con VD C-terminal nM
DVD1247	PGE2	TNF (sec 5)	-	24,46
DVD1248	TNF (sec 5)	SOST	0,006	-
DVD1249	SOST	TNF (sec 5)	-	5,417
DVD1250	TNF (sec 5)	NGF	0,02	-
DVD1251	NGF	TNF (sec 5)	-	8,016
DVD1252	TNF (sec 5)	LPA	0,118	-
DVD1253	LPA	TNF (sec 5)	-	7,848
DVD1254	TNF (sec 6)	PGE2	0,0165	-
DVD1255	PGE2	TNF (sec 6)	-	

Todas las moléculas de DVD-Igs que contienen VDs de AB017, AB213, AB214, AB215, AB217, o AB218 ya sea en posición N-terminal o C-terminal mostraron neutralización en el ensayo de neutralización de TNFα en L929.

Ejemplo 1.1.2.F: <u>Inhibición de PGE2 en bioensayo de EP4</u>

Se determinó la capacidad de los anticuerpos anti-PGE2 y las moléculas de DVD-iG que contienen anti-PGE2 para inhibir la respuesta celular de PGE2 en un ensayo de flujo de Ca++ en células HEK293Gα16 transfectadas de forma estable con receptor EP4 humano. Se plaquearon las células en placas negras/transparentes de poli-D-lisina, (Corning #3667, Corning, N.Y.) y se incubaron con marcador sensitivo a Ca++ (Molecular Devices) durante 90 minutos. Se diluyó la solución madre de PGE2 en 200 proof etanol con solución amortiguadora FLIPR (con HBSS 1x (Invitrogen, Carlsbad, California), HEPES

20 mM (Invitrogen, Carlsbad, California), BSA al 0,1% (Sigma, St. Louis, Mo.) y Probenecid 2,5 mM (Sigma, St. Louis, Mo.)). También se prediluyeron los anticuerpos anti-PGE2, las moléculas DVD-Ig o los anticuerpos control de isotipo coincidente en solución amortiguadora FLIPR. Se agregaron 25 µl de PGE2 o mezcla preincubada de PGE2/anticuerpo o mezcla preincubada de PGE2/molécula de DVD-Ig a los pocillos preplaqueados con células. Se hizo una dosis respuesta de PGE2 mediante una titulación serial de PGE2 y se determinó usando FLIPR1 o Tetra (Molecular Devices). Se determinó la EC50 usando GraphPad Prism 5 (GraftPad Software, La Jolla, California). Para ensayar los anticuerpos y las moléculas de DVD-Ig, se incubó PGE2 a una concentración de EC50 con concentraciones variables de artículos de prueba o anticuerpo de isotipo coincidente (control negativo) durante 20 minutos, y se agregaron a EP4 humana cargado con marca en células HEK293Gα16 células. El flujo de Ca^{++} se monitoreó usando FLIPR1 y se analizaron los datos usando GraphPad Prism 5. Los resultados de inhibición de PGE2 se muestran en la Tabla 6 para las construcciones de DVD-Ig que contienen las diferentes secuencias de TNF.

Tabla 6: Ensayo de Inhibición de PGE2 Con Anticuerpo Parenteral de PGE2 y Construcciones De DVD-Ig Que Contienen Las Diferentes Secuencias de TNF.

ID de Anticuerpo Parental o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-Terminal (VD)	Dominio Variable C-Terminal (VD)	EC50 de Ensayo de Inhibición de PGE2 con VD N-Terminal pM	EC50 de Ensayo de Inhibición de PGE2 con VD C-Terminal pM
AB048	PGE2		168	
DVD1221	PGE2	TNF (sec 2)	195	---
DVD1224	TNF (sec 4)	PGE2	---	157
DVD1225	PGE2	TNF (sec 4)	154	---
DVD1246	TNF (sec 5)	PGE2	---	135
DVD1247	PGE2	TNF (sec 5)	105	---
DVD1254	TNF (sec 6)	PGE2	---	93
DVD1255	PGE2	TNF (sec 6)	94	---

Todas las moléculas de DVD-Ig que contienen VDs de AB048 ya sea en posición N-terminal o bien C-terminal mostraron neutralización en el ensayo de inhibición de PGE2.

Ejemplo 1.1.2.G: <u>Inhibición de NGF en Bioensayo con Neuroscreen</u>

Las células Neuroscreen-1 (Cellomics) son una línea celular neuronal que está optimizada para derivaciones de neuritas. Las células son un subclon de células de feocromocitoma de PC12 de rata. Se cultivaron las células en RPMI 1640 + 10% de Suero de Caballo + 5% de Suero Fetal Bovino + PenStrep+ L-glutamina + HEPES 10 mM. Se cultivaron las células en botellas y placas recubiertas con colágeno I. Se plaquearon las células Neuroscreen-1 en placas de 96 pocillos recubiertas con colágeno I a 5 x 10^4 células por pocillo en un volumen de 100 µL y se incubaron durante una noche a 37°C, 5% de CO_2

en medio de cultivo. Se dejó a las células sin suero durante 24 horas en RPMI + HEPES 10 mM (100 µL/pocillo). Luego se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitirles llegar a temperatura ambiente. Se estimularon las células mediante agregado a las células de NGF/DVD-Ig o anticuerpo. La concentración final de DVD-Ig o anticuerpo ensayado fue de 1 µg/mL. Se preparó una solución de trabajo de anticuerpo o de DVD-Ig (concentrada 6x) en RPMI + HEPES 10 mM + BSA al 0,1% (medio de ensayo). Se diluyeron en forma serial 1:3 los anticuerpos y las DVD-Igs a lo largo de diez puntos en medio de ensayo en placas de dilución de Marsh. La solución madre de NGF fue de 10 µg/mL. La concentración final de NGF fue de 3,3 ng/mL. Se calculó el NGF para que esté como 6X (19,8 ng/mL) y se preparó en RPMI + HEPES 10 mM + BSA al 0,1%. Se agregó NGF a la dilución de anticuerpo o DVD-Ig y se preincubaron las mezclas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Usando Biomek, se agregaron 50 µL de NGF +/- DVD-Ig o anticuerpo y se incubaron durante 16 minutos a temperatura ambiente. Se lisaron las células mediante agregado de 40 µL de solución amortiguadora de lisis celular 1X a todos los pocillos y se agitaron las placas durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se corrió el SureFire ERK ½ Phosphorylation Kit Assay (Perkin Elmer).

Para correr el ensayo de ERK, se tomaron 4 µL/ pocillo del lisado desde la placa de células y se colocaron en los pocillos de una placa blanca de 384 pocillos (Corning #3652) por duplicado, asegurándose de evitar la formación de burbujas. Se agregó Reaction Buffer con Alpha Screen Acceptor Beads (60 partes de solución amortiguadora de reacción, 10 partes de solución amortiguadora de activación y 1 parte de perlas donoras recubiertas de

estreptavidina; 1 parte de perlas aceptoras recubiertas de proteína A) a 7 µL por pocillo. Se selló la placa con una cubierta adhesiva y se agitó suavemente entre 1 y 2 minutos. Se protegió la placa de la luz cubriéndola con papel de aluminio e incubando a temperatura ambiente durante 1 hora. Se leyó la placa en un Envision usando la configuración de placa Alpha Screen estándar. Los resultados de inhibición de NGF están en la Tabla 7.

Tabla 7: Ensayo de Inhibición de NGF Con Anticuerpos Parentales NGF y Construcciones de DVD-Ig

ID de Anticuerpo Parental o DVD-Ig	Dominio Variable N-Terminal (VD)	Dominio Variable C-Terminal (VD)	EC50 de Ensayo de Inhibición de NGF con VD N-Terminal pM	EC50 de Ensayo de Inhibición de NGF con VD C-Terminal pM
AB020	NGF		53	
DVD1232	TNF (sec 2)	NGF	--	---
DVD1233	NGF	TNF (sec 2)	62	---
DVD1236	TNF (sec 4)	NGF	---	--
DVD1237	NGF	TNF (sec 4)	95	---
DVD1250	TNF (sec 5)	NGF	---	---
DVD1251	NGF	TNF (sec 5)	95	---
DVD1258	TNF (sec 6)	NGF	---	---
DVD1259	NGF	TNF (sec 6)	27	---

Todas las construcciones de DVD-Ig con VDs de AB020 ya sea en posición N-terminal o bien C-terminal mostraron neutralización en el ensayo de inhibición de NGF.

Ejemplo 1.1.2.H: Inhibición de Actividad de Esclerostina en el Clon de HEK Doble Estable de Wnt-1/Luciferasa #14

Se transfectaron en forma estable células HEK 293A con plásmido TopFlash (plásmido reportero TCF, Cell Signaling # de catálogo 21-170, # de lote 26217) y se infectaron con lentivirus para Wnt-1 (Origene # de Catálogo SC303644), resultando en clones que coexpresan luciferasa y Wnt-1. Se mantuvo un clon doble estable (#14) en medio de cultivo con DMEM (Invitrogen # de Catálogo11965-092) con FBS de calidad al 10% (Invitrogen # de Catálogo 26140-079), pen-strep (Invitrogen # de Catálogo 15140-122), L-glutamina (Invitrogen # de Catálogo 25030-081 2 mM final), piruvato sódico (Invitrogen # de Catálogo 11360-070 1 mM final) y puromicina 5 µg/ml (Invivogen # de Catálogo ant-pr-1) en botellas T75 hasta una confluencia de entre 80 y 90% en el día del ensayo. El ensayo se llevó a cabo en medio de ensayo con medio de cultivo son puromicina. Se alicuotó esclerostina humana (Abbott PR-1261069 # de lote 1769536, 1,06 mg/mL) en alícuotas de 10 µl y se almacenó congelada a -80°C. En el día 1, se plaquearon células del clon #14 a 10.000 células por pocillo en 50 µl medio de ensayo en placas de cultivo de tejido 96 pocillos de lados negros, y fondo transparente (Costar #3603) y se incubaron a 37°C durante una noche (por ejemplo, entre 20 y 24 horas). Al día siguiente (día 2) se diluyó la solución madre de esclerostina a 200 nM (4X) en el medio de ensayo. Se diluyeron anticuerpos anti-esclerostina diluidos a 4X (típicamente

400 nM, 200 nM, y 100 nM) en medio de ensayo. Se eliminó el medio y se reemplazó por 50 µl/pocillo de medio de ensayo fresco. Luego se incubaron las células con 25 µl de esclerostina a 200 nM (4X) durante 1 hora. Se agregaron anticuerpos anti-esclerostina (concentrados 4X, 25 µl) a las células y se incubaron las placas durante una noche a 37°C. El volumen final fue de 100 µl. Al día siguiente (día 3), se lavaron las células una vez con 200 µl de PBS (RT). Se usó un Promega Luciferase Kit #E1501 para la lisis de las células y la lectura de luciferasa. Brevemente, se diluyó el reactivo de lisis celular 5X (Promega, # de catálogo E153A) con agua milliQ a 1X y se agregó 20 µl a cada pocillo. Para asegurar una lisis completa, se rotó la placa a 500 rpm durante 20 minutos. Se agregaron 100 µl de reactivo de ensayo para Luciferasa (1 vial de sustrato # de catálogo E151A + 10 ml de solución amortiguadora de ensayo # de catálogo E152A) a cada pocillo. La placa se leyó en una máquina TopCount (Programa: Luciferase 96, Assay 17: 1 segundo/pocillo de lectura). Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Ensayo de Inhibición SOST con Anticuerpos Parentales SOST y Construcciones de DVD-Ig

ID de Anticuerpo Parental o DVD-Ig	**Dominio Variable N-Terminal (VD)**	**Dominio Variable C-Terminal (VD)**	**Ensayo de Inhibición SOST con VD N-Terminal**	**Ensayo de Inhibición SOST con VD C-Terminal**
AB022	SOST		+	
DVD1230	TNF (sec 4)	SOST	-	-
DVD1231	SOST	TNF (sec 4)	+	-

ID de Anticuerpo Parental o DVD-Ig	Dominio Variable N-Terminal (VD)	Dominio Variable C-Terminal (VD)	Ensayo de Inhibición SOST con VD N-Terminal	Ensayo de Inhibición SOST con VD C-Terminal
DVD1248	TNF (sec 5)	SOST	-	-
DVD1256	TNF (sec 6)	SOST	-	-

Todas las construcciones DVD-Ig con VDs de AB022 ya sea en la posición N-terminal o bien C-terminal mostraron neutralización en el ensayo de inhibición de NGF.

Ejemplo 1.1.2.I: Efecto Inhibidor de Crecimiento de un Anticuerpo Monoclonal o DVD-Igs Contra Receptor Tumoral In Vitro

Se agregan anticuerpos monoclonales o DVD-Igs contra receptor tumoral diluidas en 20 µl de D-PBS-BSA (solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco con BSA al 0,1%) a células de tumor humanas a concentraciones finales de entre 0,01 µg/mL y 100 µg/mL en 180 µL. Se incuban las placas a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% de CO_2 durante 3 días. Se cuantifica el número de células vivas en cada pocillo usando reactivos de MTS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI) para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento tumoral. Se usan pocillos sin tratamiento con anticuerpos como controles de 0% de inhibición mientras que los pocillos sin células se consideran que muestran 100% de inhibición.

Ejemplo 1.1.2.J: Efecto tumoricida de un anticuerpo parental o DVD-Ig in vitro

Los anticuerpos parentales o DVD-Ig que se unen a antígenos blanco

sobre células tumorales se pueden analizar en cuanto a su actividad tumoricida. Brevemente, se diluyen los anticuerpos parentales o DVD-Ig en D-PBS-BSA (solución amortiguadora salina de fosfatos Dulbecco con BSA 0,1%) y se agregan a células tumorales humanas en concentraciones finales de 0,01 µg/ml a 100 µg/ml 200µL. Se incuban las placas a 37 °C en un atmósfera humidificada con 5% de CO_2 durante 3 días. El número de células vivas en cada cavidad se cuantifica usando reactivos MTS de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Promega, Madison, WI) para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral. Se usan las cavidades sin tratamiento con anticuerpos como controles de inhibición del 0% mientras que se consideró que las cavidades sin células muestran una inhibición del 100%.

Para la determinación de la apoptosis, se determina la activación de la caspasa-3 mediante el siguiente protocolo: se lisan las células tratadas con anticuerpos en placas de 96 cavidades en 120 µl de solución amortiguadora de lisis 1x (1,67mM Hepes, pH 7,4, 7mM KCl, 0,83mM $MgCl_2$, 0,11mM EDTA, 0,11mM EGTA, 0,57% CHAPS, 1mM DTT, tableta cóctel de inhibidores de proteasa 1x; libre de EDTA; Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ) a temperatura ambiente con agitación durante 20 minutos. Después de la lisis celular, se agregan 80 µl de una solución amortiguadora para la reacción de la caspasa-3 (48mM Hepes, pH 7,5, 252mM sacarosa, 0,1% CHAPS, 4mM DTT, y 20 µM del sustrato Ac-DEVD-AMC; Biomol Research Labs, Inc., Plymouth Meeting, PA) y se incuban las placas durante 2 horas a 37°C. Las placas se leen en un Contador 1420 VICTOR Multirótulo (Perkin Elmer Life Sciences, Downers Grove, IL) usando las siguientes parámetros: excitación= 360/40, emisión= 460/40. Un incremento en las unidades de fluorescencia de las células tratadas

con anticuerpos, relativo a las células tratadas con anticuerpo control de isotipo es indicativo de apoptosis.

Ejemplo 1.1.2.K: Inhibición de la proliferación de células por el anticuerpo parental y construcciones de DVD-Ig

Se plaquean las células tumorales humanas de glioma, U87-MG a 2.000 células/cavidad en 100 µl en placas de 96-cavidades en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino 5%, y se incubaron a 37°C, 5% de CO_2 durante la noche. Al día siguiente se tratan las células con diluciones en serie del anticuerpo DVD-Igs (rango de dosis de 0,013 nM a 133 nM), y se incuban a 37 °C en una atmósfera humidificada,con 5% de CO_2 durante 5 días. Se mide la supervivencia/proliferación celular indirectamente por determinación de niveles de ATP usando un conjunto de elementos ATPlite (Perkin Elmer, Waltham, MA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Ejemplo 1.1.2.L: Anticuerpo parental VEGF y construcciones de DVD-Ig previenen la ínteracción de $VEGF_{165}$ con VEGFR1

Se incuban las placas para ELISA (Nunc, MaxiSorp, Rochester, NY) durante la noche a 4°C con 100 µl de PBS que contiene la proteína de fusión recombinante dominio extracelular de VEGFR1-Fc (5µg/ml, O&D systems, Minneapolis, MN). Se lavan tres veces las placas en solución amortiguadora de lavado (PBS que contiene Tween 20 0,05%), y se bloquean durante 1 hora a 25°C en solución amortiguadora de bloqueo (PBS que contiene BSA 1%). Se incuban las diluciones en serie de cada anticuerpo/DVD-Ig en PBS que contiene BSA 0,1% con 50□l de VEGF biotinilado 2nM durante 1 hora a 25°C. Se agregan entonces las mezclas de anticuerpo/DVD-Ig-biotinilado de VEGF (100□l) a las cavidades recubiertas con VEGFR1-Fc y se incuban a 25°C

durante 10 minutos. Se lavan tres veces las cavidades, y luego se incuban durante 1 hora a 25°C con 100□l de estreptavidina-HRP (KPL N°474-3000, Gaithersburg, MD). Las cavidades se lavan tres veces, y se agregan 100µl de ULTRA-TMB ELISA (Pierce, Rockford, IL) por cavidad. Luego del desarrollo de color se detiene la reacción con HCL 1N y se mide la absorbancia a 450nM.

Ejemplo 1.1.2.M: Inhibición de la fosforilación del receptor por los anticuerpos parentales o las construcciones de DVD-Ig *in vitro*

Se plaquean células de carcinoma humano en placas de 96 cavidades a razón de 40.000 células/cavidad en 180 µl de medio libre de suero (DMEM+ BSA 0,1%) y se incuban durante la noche a 37°C, 5% de CO_2. Se recubrieron placas Costar EIA (Lowell, MA) con 100 µl/cavidad de Ab de captura del receptor (4 µg/ml de concentración final) y se incuban durante la noche a temperatura ambiente bajo agitación. Al día siguiente, las placas para ELISA recubiertas con el anticuerpo receptor se lavan (tres veces con PBST = Tween 20 0,05% en PBS, pH 7,2 – 7,4) y se agregan 200 µl de solución de bloqueo (BSA 1%, NaN3 0,05% en PBS, pH 7,2 – 7,4) para el bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente sobre un oscilador. Se co-incuban células tumorales humanas con anticuerpos o DVD-Ig y ligando. Se agregan anticuerpos monoclonales o DVD-Ig diluidas en D-PBS-BSA (solución amortiguadora fosfato salina de Dulbecco con BSA 0,1%) a células de carcinoma humano a concentraciones finales de 0,01 µg/ml-100 µg/ml. Simultáneamente se agregan factores de crecimiento a las células a concentraciones de 1-100 ng/ml (200 µl) y las células se incuban a 37°C en una atmósfera húmeda, 5% de CO_2 durante 1 hora. Las células se lisan en 120 µl/cavidad de solución amortiguadora de extracción celular fría (Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1

mM, NaF 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10%, SDS 0,1% y cóctel de inhibidores de proteasas) y se incuban a 4°C durante 20 minutos con agitación. Los lisados celulares (100 µl) se agregan a la placa para ELISA y se incuban durante la noche a 4°C con agitación suave. Al día siguiente, las placas para ELISA se lavan y se agregan 100 µl/cavidad de Ab de detección pTyr-HRP (conjunto de elementos para ELISA p-IGF1R, O&D System N° DYC1770, Minneapolis, MN), y las placas se incuban durante 2 horas a 25°C en oscuridad. Las placas se revelan para determinar la fosforilación según las instrucciones del proveedor.

Ejemplo 1.1.2.N: Inhibición de la fosforilación de VEGFR2 (KDR) por anticuerpos parentales y construcciones de DVD-Ig VEGF

Se plaquean células NIH3T3 que expresan el VEGFR2 (KDR) humano a razón de 20.000 células/cavidad (100 □l) en placas de 96 cavidades en DMEM suplementado con FBS 10%. Al día siguiente, las células se lavan dos veces con DMEM y se deprivan de suero durante tres horas en DMEM sin FBS. Se pre-incuban anticuerpos parentales anti-VEGF o DVD-Ig (a concentraciones finales de 67 nM, 6,7 nM y 0,67 nM) diluidas en DMEM con BSA 0,1% con $VEGF_{165}$ humano recombinante (50 ng/ml) durante 1 hora a 25°C. Estas mezclas de anticuerpo/DVD-Ig y VEGF se agregan luego a las células y las placas se incuban a 37°C en una atmósfera húmeda, 5% de CO_2, durante 10 minutos. Las células se lavan dos veces con PBS helado y se lisan por adición de 100 µl/ cavidad de solución amortiguadora de lisis celular (Cell Signaling, Boston, MA) suplementado con NP40 0,1%. Se agrupan las muestras duplicadas y se agregan 170 µl a las cavidades de placas para ELISA recubiertas previamente con anticuerpo anti-VEGFR2 (O&D Systems, AF357,

Minneapolis, MN) y se incuban a 25°C con agitación suave durante dos horas. Las cavidades se lavan cinco veces con solución amortiguadora de lavado (PBS que contiene Tween 20 0,05%) y se incuban con 50 □l de una dilución 1:2000 de anticuerpo anti-fosfotirosina biotinilado (4G10; Millipore, Billerica, MA) durante 1 hora a 25°C. Las cavidades se lavan cinco veces con PBS que contiene Tween 20 0,05%, y luego se incuban durante 1 hora a 25°C con estreptavidina-HRP (KPL N° 474-3000, Gaithersburg, MD). Las cavidades se lavan tres veces con estreptavidina-HRP (KPL N° 474-3000, Gaithersburg, MD)). Las cavidades se lavan tres veces con PBS que contiene Tween 20 0,05%, y se agregan 100 µl de ULTRA-TMB ELISA (Pierce, Rockford, IL) por cavidad. Después del desarrollo de color la reacción se detiene con HCl 1N y se mide la absorbancia a 450 nM.

Ejemplo 1.1.2.O: Eficacia de un DVD-Ig en el crecimiento dexenoinjertos flanco de carcinoma humano subcutáneo

Se cultivan células de cáncer epidemoide A-431 humano *in vitro* hasta 99% de viabilidad, 85% de confluencia en frascos de cultivo de tejidos. Se inyectan ratones SCID hembra (Charles Rivers Labs, Wilmington, MA) con un peso de 19-25 gramos por vía subcutánea en el flanco derecho con 1 x 10^6 células tumorales humanas (1:1 matrigel) el día 0 del estudio. La administración (IP, Q3D/semana) de IgG humana control o DVD-Ig se inicia despues de agrupar por tamaño a los ratones con tumores con un volumen medio de aproximadamente 200 a 320 mm^3. Los tumores se miden dos veces por semana, a paratir de aproximadamente el día 10 posterior a la inyección de las células tumorales.

Ejemplo 1.1.2.P: Unión de anticuerpos monoclonales a la superficie de

líneas celulares de tumores humanos evaluada por citometría de flujo

Se cosecharon líneas celulares estables que sobreexpresan un antígeno de la superficie celular de interés o líneas celulares de tumores humanos de los frascos de cultivo tisular y se volvieron a suspender en solución amortiguadora fosfato salina (PBS) que contiene suero fetal bovino 5% (PBS/FBS). Antes de la tinción, las células tumorales humanas se incubaron sobre hielo con IgG humana (100 µl) 5 µg/ml en PBS/FCS. Se incubaron 1-5 x 10^5 células con anticuerpo DVD-Ig (2 µg/ml) en PBS/FBS durante 30-60 minutos sobre hielo. Las células se lavaron dos veces y se agregaron 100 µl de anti-IgG humana F(ab')2 de cabra, Fcγ-ficoeritrina (dilución 1:200 en PBS) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat. N° 109-116-170). Después de 30 minutos de incubación sobre hielo, las células se lavaron dos veces y se volvieron a suspender en PBS/FBS. La fluorescencia se midió usando un equipo Becton Dickinson FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Ejemplo 1.1.2.Q: Unión del anticuerpo parental receptor y las construcciones DVD-Ig a la superficie de líneas celulares de tumores humanos evaluada por citometría de flujo

Se cosechan líneas celulares estables que sobreexpresan receptores sobre la superficie celular o líneas celulares de tumores humanos de los frascos de cultivo tisular y se vuelven a suspender en solución amortiguadora fosfato salina de Dulbecco (DPBS) que contiene suero fetal bovino 1% (DPBS/FCS). Se incuban 1-5 x 10^5 células con 100 □l de anticuerpos o DVD-Igs (10 ug/ml) en DPBS/FCS durante 30-60 minutos sobre hielo. Las células se lavan dos veces y se agregan 50 µl de anti-IgG humana de cabra-ficoeritrina (dilución 1:50 en DPBS/BSA) (Southern Biotech Associates, Birmingham, AL N°

cat. 2040-09). Después de 30-45 minutos de incubación sobre hielo, las células se lavan dos veces y se vuelven a suspender en formaldehído 1% en DPBS/FCS a razón de 125 ul/cavidad. La fluorescencia se mide usando un equipo Becton Dickinson LSRII (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Ejemplo 1.2: Generación de anticuerpos monoclonales parentales a un antígeno humano de interés

Los mAbs parentales de ratón capaces de unirse y neutralizar un antígeno humano de interés y una variante del mismo se obtienen de la siguiente manera:

Ejemplo 1.2.A: Inmunización de ratones con un antígeno humano de interés

Se inyectaron 20 microgramos de un antígeno humano recombinante purificado (por ejemplo, IGF1.2) mezclado con adyuvante de Freund completo con el adyuvante Immunoeasy (Qiagen, Valencia, CA) por vía subcutánea en cinco ratones Balb/C de 6-8 semanas, cinco ratones C57B/6 y cinco ratones AJ el Día 1. Los días 24, 38 y 49, se inyectaron veinte microgramos de una variante de antígeno humano recombinante purificado mezclado con adyuvante de Freund incompleto adyuvante Immunoeasy por vía subcutánea en los mismos ratones. El día 84 o el día 112 o el día 144, los ratones reciben inyecciones por vía intravenosa con 1 µg del antígeno humano recombinante purificado de interés.

Ejemplo 1.2.B: Generación de un hibridoma

Se fusionaron los esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados que se describen en el Ejemplo 1.2.A con células SP2/O-Ag-14 a una relación de 5:1 de acuerdo con el método establecido que se describe en Kohler, G. y

Milstein (1975), *Nature*, 256:495 para generar hibridomas. Los productos de fusión se plaquean en medio de selección que contiene azaserina e hipoxantina en placas de 96 cavidades a una densidad de $2,5x10^6$ células de bazo por cavidad. Siete a diez días después de la fusión, se observan colonias de hibridomas macroscópicas. El sobrenadante de cada cavidad que contiene colonias de hibridomas fue evaluado en un ELISA por la presencia del anticuerpo contra el antígeno de interés (según se describe en el Ejemplo 1.1.1.A). Los sobrenadantes que muestran una actividad específica del antígeno son evaluados luego por su actividad (como se describe en los ensayos del Ejemplo 1.1.2), por ejemplo, la capacidad para neutralizar el antígeno de interés en un bioensayo tal como el que se describe en el Ejemplo 1.1.2).

Ejemplo 1.2.C: Identificación y caracterización de anticuerpos monoclonales parentales contra un antígeno humano blanco de interés

Ejemplo 1.2.C.1: Análisis de la actividad neutralizante del anticuerpo monoclonal parental

Los sobrenadantes de los hibridomas son evaluados por la presencia de anticuerpos parentales que se unen a un antígeno de interés, generados de acuerdo con los Ejemplos 1.2.A y 1.2.B, y que también tienen la capacidad de unirse a una variante del antígeno de interés ("variante de antígeno"). Los sobrenadantes con anticuerpos positivos en ambos ensayos son evaluados luego por su potencia de neutralización del antígeno, por ejemplo, en el bioensayo con citoquinas del Ejemplo 1.1.2. Los hibridomas productores de anticuerpos con valores de IC_{50} en el bioensayo menores que 1000 pM, en una realización menores que 100 pM, son llevados a escala y clonados por dilución

limitante. Las células de hibridoma se expanden en un medio que contiene suero fetal bovino bajo en IgG 10% (Hyclone N° SH3015 1, Logan, UT.). En promedio, se cosechan 250 ml de cada sobrenadante de hibridoma (derivado de una población clonal), se concentran y se purifican por cromatografía de afinidad con proteína A, según se describe en Harlow, E. y Lane, D. 1988 "Antibodies: A Laboratory Manual". La capacidad de los mAbs purificados para inhibir la actividad de su antígeno blanco se determina, por ejemplo, usando el bioensayo con citoquinas que se describe en el Ejemplo 1.1.2.

Ejemplo 1.2.C.2: Análisis de la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal parental con el antígeno blanco de interés de macaco

Para determinar si los mAbs seleccionados que se describen en la presente reconocen al antígeno de interés de macaco, se conduce un análisis con BIACORE como se describe en la presente (Ejemplo 1.1.1) usando un antígeno blanco recombinante de macaco. Además, también se pueden medir las potencias de neutralización de los mAbs contra antígenos recombinantes de macaco de interés en el bioensayo con citoquinas (Ejemplo 1.1.2). Los mAbs con una buena reactividad cruzada con macacos (en una realización, dentro de 5 veces la reactividad para el antígeno humano) son seleccionados para una futura caracterización.

Ejemplo 1.2.D: Determinación de la secuencia de aminoácidos de la región variable para cada anticuerpo monoclonal anti-humano de murinos

El aislamiento de los ADNc, la expresión y la caracterización de los mAbs anti-humanos de ratón recombinantes se conducen de la siguiente manera. Para cada determinación de secuencia de aminoácidos, se aislan aproximadamente 1 x 10^6 células de hibridoma por centrifugación y se

procesaron para aislar el ARN total con Trizol (Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA.) según las instrucciones del proveedor. El ARN total es sometido a síntesis de la primera cadena de ADN usando el sistema de síntesis de la primera cadena SuperScript (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del proveedor. Se usa Oligo(dT) como cebador para la síntesis de la primera cadena para seleccionar el ARN poli(A)*. El producto de ADNc de la primera cadena se amplifica luego por PCR con cebadores diseñados para la amplificación de regiones variables de inmunoglobulina de murinos (Ig-Primer Sets, Novagen, Madison, WI). Los productos de la PCR se resuelven sobre un gel de agarosa, se recortaron, purificaron y luego se subclonaron con el conjunto de elementos para clonación TOPO en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transformaron en *E. coli* TOP10 químicamente competente (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se conduce una PCR de colonias con los transformantes para identificar los clones que contienen al inserto. Se aísla el ADN plásmido de los clones que contienen al inserto usando un conjunto de elementos QIAprep Miniprep (Qiagen, Valencia, CA). Los insertos en los plásmidos se secuencian en ambas cadenas para determinar las secuencias de ADN de la cadena variable pesada o variable liviana usando los cebadores M13 directo y M13 inverso (Fermentas Life Sciences, Hanover MD). Se identifican las secuencias de las cadenas pesada variable y liviana variable de los mAbs. En una realización, los criterios de selección para un panel de los principales mAbs para el desarrollo del paso siguiente (humanización) incluyen los que se indican a continuación:

- El anticuerpo no contiene ningún sitio de glicosilación N-ligado (NXS), excepto del sitio estándar en CH2

- El anticuerpo no contiene ninguna cisteína adicional además de las cisteínas normales en cada anticuerpo
- La secuencia del anticuerpo se alinea con las secuencias de la línea germinal humana más cercana para VH y VL y se debería comprobar la presencia de cualquier aminoácido no habitual en otros anticuerpos humanos naturales
- La glutamina N-terminal (Q) se cambia por ácido glutámico (E) si no afecta la actividad del anticuerpo. Esto reducirá la heterogeneidad debido a una ciclación de Q
- El clivaje eficiente de la secuencia señal se confirma mediante espectrofotometría de masa. Esto se puede efectua con material de células COS o de células 293
- Se compreuba el riesgo de desamidación de Asn en la secuencia de la proteína que podría dar como resultado una pérdida de actividad
- El anticuerpo tiene un bajo nivel de agregación
- El anticuerpo tiene una solubilidad >5-10 mg/ml (en fase de investigación); >25 mg/ml
- El anticuerpo tiene un tamaño normal (5-6 nm) determinado por dispersión de luz dinámica (DLS)
- El anticuerpo tiene una heterogeneidad de carga baja
- El anticuerpo no presenta liberación de citoquinas (véase el Ejemplo 1.1.2.B)
- El anticuerpo tiene especificidad por la citoquina pretendida (véase el Ejemplo 1.1.2.C)
- El anticuerpo no presenta una reactividad cruzada con tejidos

inesperada (véase el Ejemplo 1.1.2.D)

- El anticuerpo tiene similitud entre la reactividad cruzada con tejidos de humanos y macacos (véase el Ejemplo 1.1.2.D)

Ejemplo 1.2.2: Anticuerpos parentales recombinantes humanizados

Ejemplo 1.2.2.1: Construcción y expresión de anticuerpos parentales anti-humanos recombinantes quiméricos

El ADN que codifica la región constante de la cadena pesada de los mAbs parentales anti-humanos de murinos se reemplaza por un fragmento de ADNc que codifica la región constante de la IgG1 humana que contiene 2 mutaciones de aminoácidos en la región bisagra por recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones comprenden un cambio de leucina por alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina por alanina en la posición 235 (Lund et al., 1991, *J. Immunol.*, 147:2657). La región constante de la cadena liviana de cada una de estos anticuerpos se reemplaza por una región constante kappa humana. Se expresan anticuerpos quiméricos de longitud completa en células COS por co-transfección de los ADNc quiméricos de la cadena pesada y liviana ligados en el plásmido de expresión pBOS (Mizushima y Nagata, *Nucleic Acids Research* 1990, Vol 18, págs. 5322). Los sobrenadantes celulares que contienen el anticuerpo recombinante quimérico se purifican por cromatografía en Proteína A Sepharose y el anticuerpo unido se eluye por adición de solución amortiguadora ácida. Los anticuerpos se neutralizan y dializan en PBS.

El ADNc de la cadena pesada que codifica el mAb quimérico se co-transfecta con el ADNc quimérico de la cadena liviana (ambos ligados en el vector pBOS) en las células COS. El sobrenadante celular que contiene al

anticuerpo recombinante quimérico se purifica por cromatografía en Proteína A Sepharose y el anticuerpo unido se eluye por adición de solución amortiguadora ácida. Los anticuerpos se neutralizan y dializan en PBS.

Los mAbs parentales anti-humanos quiméricos purificados son evaluados luego por su capacidad de unión (por Biacore) y por su actividad funcional, por ejemplo, para inhibir la producción inducida por citoquinas de la IgE como se describe en los Ejemplos 1.1.1 y 1.1.2. Los mAbs quiméricos que conservan la actividad de los mAbs parentales de hibridomas se seleccionan para su futuro desarrollo.

Ejemplo 1.2.2.2: Construcción y expresión de anticuerpos parentales anti-humanos humanizados

Ejemplo 1.2.2.2.A: Selección de marcos de trabajo de anticuerpos humanos

Cada secuencia genética de las cadenas pesada variable y liviana variable de murinos se alineó por separado contra 44 secuencias de la cadena pesada variable de inmunoglobulina de línea germinal humana o 46 secuencias de la cadena liviana variable de inmunoglobulina de línea germinal humana (derivadas del sitio web Ig Blast de NCBI en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html.) usando el software Vector NTI.

La humanización se basa en la homología de secuencia de aminoácidos, análisis de agrupaciones de CDR, frecuencia de uso entre anticuerpos humanos expresados e información disponible acerca de las estructuras cristalinas de los anticuerpos humanos. Teniendo en cuenta los posibles efectos sobre la unión al anticuerpo, el apareamiento de VH-VL y otros

factores, se mutan residuos de murinos por residuos humanos cuando los residuos de marcos de trabajo de murinos y humanos son diferentes, con una pocas excepciones. Se diseñan estrategias de humanización adicionales sobre la base de un análisis de las secuencias de anticuerpo de línea germinal humanas, o un subgrupo de las mismas, que tuvieran un alto grado de homología, es decir, similitud de secuencia, con la secuencia de aminoácidos real de las regiones variables del anticuerpo de murinos.

Se usa modelación por homología para identificar residuos únicos para las secuencias de anticuerpos murinos que según ha predicho serian críticas para la estructura del sitio de combinación del anticuerpo (las CDR). La modelación por homología es un método computado con el cual se generan coordenadas tridimensionales aproximadas para una proteína. La fuente de las coordenadas iniciales y los lineamientos para su refinamiento posterior es una segundo proteína, la proteína de referencia, para la cual se conocen las coordenadas tridimensionales y cuya secuencia está relacionada con la secuencia de la primera proteína. La relación entre las secuencias de las dos proteínas se usa para generar una correspondencia entre la proteína de referencia y la proteína para la cual se desean las coordenadas, la proteína blanco. Las secuencias primarias de las proteínas de referencia y blanco se alinean con las coordenadas de las porciones idénticas de las dos proteínas transferidas directamente de la proteína de referencia a la proteína blanco. Las coordenadas de las porciones no coincidentes de las dos proteínas, por ejemplo, de mutaciones, inserciones o supresiones de residuos, se construyen a partir de templados estructurales genéricos y refinados energéticamente para asegurar la consistencia con las coordenadas del modelo ya transferidas. Esta

estructura proteica computada puede refinarse aún más o se puede emplear directamente en estudios de modelación. La calidad de la estructura del modelo está determinada por la exactitud de la aseveración que las proteínas de referencia y blanco están relacionadas y la precisión con que se construye la alineación de las secuencias:

Para las mAbs, se usa una combinación de búsqueda BLAST e inspección visual para identificar las estructuras de referencia adecuadas. Se considera que una identidad de secuencia del 25% entre las secuencias de aminoácidos de referencia y blanco es el mínimo necesario para intentar un ejercicio de modelación por homología. Las alineaciones de secuencia se construyen manualmente y las coordenadas del modelo se generan con el programa Jackal (véase Petrey, D. et al. (2003) *Proteins* 53 (Supl. 6): 430–435).

Las secuencias primarias de las regiones de marco de trabajo de murinos y humanas de los anticuerpos seleccionados comparten una identidad significativa. Las posiciones de residuo que difieren son candidatos para la inclusión del residuo de murinos en la secuencia humanizada con el fin de retener la potencia de unión observada del anticuerpo murino. Se construye manualmente un listado de residuos de marco de trabajo que difieren entre las secuencias humanas y de murinos. En la Tabla 9 se muestran las secuencias de marco de trabajo elegidas para este estudio.

Tabla 9: Secuencias del dominio constante de la cadena pesada y del dominio constante de la cadena liviana de la IgG humana

Proteína	SEQ ID N°	Secuencia
		123456789012345678901234567890123456789012345678901

Región constante hIgG1 de tipo salvaje	**50**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPE**LL**GGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Región constante hIgG1 mutante	**51**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Región constante de Kappa Ig	**52**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
Región	**53**	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG

constante de Lambda Ig		AVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS

La probabilidad con que un residuo de marco de trabajo dado afectará las propiedades de unión del anticuerpo depende de su proximidad a los residuos de la CDR. Por ello, usando las estructuras del modelo, se clasifican los residuos que difieren entre las secuencias de murinos y humanas de acuerdo con su distancia de cualquier átomo en las CDR. Aquellos residuos que caen dentro de los 4,5 Å de cualquier átomo de la CDR se identifican como los más importantes y se recomiendan como candidatos para la retención del residuo murino en el anticuerpo humanizado (es decir, una retro-mutación).

Los anticuerpos humanizados construidos *in silico* se construyen usandoligonucleótidos. Para cada ADNc de la región variable, se diseñan 6 oligonucleótidos de 60-80 nucleótidos cada uno para que se superpusieran entre sí en 20 nucleótidos por el extremo 5' y/o 3' de cada oligonucleótido. En una reacción de alineación, se combinan los 6 oligonucleótidos, se llevan a ebullición y se alinean en la presencia de dNTP. Se agrega el fragmento grande de ADN polimerasa I (Klenow) (New England Biolabs N° M0210, Beverley, MA.) para rellenar los huecos de aproximadamente 40 bp entre los oligonucleótidos superpuestos. Se conduce una PCR para amplificar todo el gen de la región variable usando dos cebadores más externos que contienen secuencias que se proyectan complementarias de los múltiples sitios de clonación en un vector pBOS modificado (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:17). Los productos de la PCR derivados de cada ensamblaje de ADNc se separan sobre un gel de agarosa, y se recorta y

purifica la banda correspondiente al tamaño predicho de ADNc de la región variable. La región pesada variable se inserta en-marco sobre un fragmento de ADNc que codifica la región constante de la IgG1 humana que contiene 2 mutaciones de aminoácidos en la región bisagra por recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones comprenden un cambio de leucina por alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina por alanina en la posición 235 (Lund et al. (1991) *J. Immunol.* 147:2657). La región variable de la cadena liviana se inserta en-marco con la región constante kappa humana por recombinación homóloga. Se aíslan las colonias bacterianas y se extrae el ADN plásmido; los insertos de ADNc se secuencian por completo. Las cadenas pesada y liviana humanizadas correctas correspondientes a cada anticuerpo se co-transfectan en células COS para producir de forma transiente anticuerpos anti-humanos de longitud completa humanizados. Los sobrenadantes celulares que contienen el anticuerpo recombinante quimérico se purifican por cromatografía en Proteína A Sepharose y el anticuerpo unido se eluye por adición de solución amortiguadora ácida. Los anticuerpos se neutralizan y dializan en PBS.

Ejemplo 1.2.2.3: Caracterización de los anticuerpos humanizados

La capacidad de los anticuerpos humanizados purificados para inhibir una actividad funcional se determina, por ejemplo, usando el bioensayo con citoquinas que se describe en los Ejemplos 1.1.2.A. Las afinidades de unión de los anticuerpos humanizados con el antígeno humano recombinante se determinan usando medición por resonancia de plasmón superficial (Biacore®) como se describe en el Ejemplo 1.1.1.B. Se califican los valores de IC_{50} de los bioensayos y la afinidad de los anticuerpos humanizados. Los mAbs

humanizados que conservan por completo la actividad de los mAbs parentales de hibridomas se seleccionan como candidatos para su futuro desarrollo. Los 2-3 mAbs humanizados superiores más favorables se caracterizan por completo.

Ejemplo 1.2.2.3.A: Análisis farmacocinético de los anticuerpos humanizados

Se realizan estudios farmacocinéticos en ratas Sprague-Dawley y monos macaco. Las ratas macho y hembra y los monos macaco reciben dosis por vía intravenosa o subcutánea que consiste de una sola dosis de mAb 4 mg/kg y las muestras se analizan usando ELISA de captura de antígeno y los parámetros farmacocinéticos se determinan mediante análisis no compartimentalizado. Brevemente, se recubren placas para ELISA con anticuerpo anti-biotina de cabra (5 mg/ml, 4 °C, durante la noche), se bloquean con Superblock (Pierce) y se incuban con antígeno humano biotinilado a 50 ng/ml en Superblock TTBS 10% a temperatura ambiente durante 2 horas. Se diluyen en serie las muestras de suero (suero 0,5%, Superblock en TTBS 10%) y se incuban sobre la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. La detección se efectúa con anticuerpo anti-humano de cabra marcado con HRP y las concentraciones se determinan con la ayuda de curvas estándar usando el ajuste logístico de cuatro parámetros. Los valores de los parámetros farmacocinéticos se determinan con el modelo no compartimental usando el software WinNonlin (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Se seleccionan los mAbs humanizados con un buen perfil farmacocinético (T1/2 es de 8-13 días o mejor, con una baja depuración y excelente biodisponibilidad 50-100%).

Ejemplo 1.2.2.3.B: Análisis fisicoquímico y estabilidad *in vitro* de los

anticuerpos monoclonales humanizados

Cromatografía por exclusión de tamaño

Los anticuerpos se diluyen hasta 2,5 mg/ml con agua y se analizan 20 ml con un sistema de HPLC Shimadzu usando una columna G3000 SWXL gel TSK (Tosoh Bioscience, N° cat. k5539-05k). Las muestras se eluyen de la columna con sulfato de sodio 211 mM, fosfato de sodio 92 mM, pH 7,0, a una velocidad de flujo de 0,3 ml/minuto. Las condiciones operativas del sistema de HPLC son como se indica a continuación:

Fase móvil:	Na_2SO_4 211 mM, Na_2HPO_4*$7H_2O$ 92 mM, pH 7,0
Gradiente:	Isocrático
Velocidad de flujo:	0,3 ml/minuto
Longitud de onda del detector:	280 nm
Temperatura del enfriador del muestreador automático :	4°C
Temperatura del horno de la columna:	Ambiente
Duración de la corrida:	50 minutos

La Tabla 10 contiene los datos de la pureza de los anticuerpos parentales y de las construcciones de DVD-Ig expresados como un porcentaje de monómeros (proteína no agregada del peso molecular esperado) determinado con el protocolo anterior.

Tabla 10: Pureza de los anticuerpos parentales y las construcciones de DVD-Ig determinada mediante cromatografía por exclusión de tamaño

ID del anticuerpo	Dominio variable	Dominio variable (VD)	% de monómeros (pureza)

parental o DVD-Ig	(VD) N-terminal	C-terminal	
AB017	TNF (seq 1)		97.5
AB020	NGF		88.2
AB022	SOST		93.2
AB048	PGE2		100
AB213	TNF (seq 2)		100
AB214	TNF (seq 3)		100
AB215	TNF (seq 4)		99.9
AB216	LPA		100
AB217	TNF (seq 5)		100
AB218	TNF (seq 6)		100
DVD1221	PGE2	TNF (seq 2)	100
DVD1224	TNF (seq 4)	PGE2	100
DVD1225	PGE2	TNF (seq 4)	100
DVD1226	TNF (seq 2)	SOST	100
DVD1227	SOST	TNF (seq 2)	83.2
DVD1229	SOST	TNF (seq 3)	100
DVD1230	TNF (seq 4)	SOST	100
DVD1231	SOST	TNF (seq 4)	92.5
DVD1232	TNF (seq 2)	NGF	100
DVD1233	NGF	TNF (seq 2)	95.4
DVD1236	TNF (seq 4)	NGF	100
DVD1237	NGF	TNF (seq 4)	94.5
DVD1238	TNF (seq 2)	LPA	100
DVD1239	LPA	TNF (seq 2)	100
DVD1241	LPA	TNF (seq 3)	100
DVD1242	TNF (seq 4)	LPA	97.9
DVD1243	LPA	TNF (seq 4)	100
DVD1244	TNF (seq 1)	LPA	80.5
DVD1245	LPA	TNF (seq 1)	95.3
DVD1246	TNF (seq 5)	PGE2	98.5
DVD1247	PGE2	TNF (seq 5)	98.9
DVD1248	TNF (seq 5)	SOST	83.5
DVD1249	SOST	TNF (seq 5)	81.3
DVD1250	TNF (seq 5)	NGF	100
DVD1251	NGF	TNF (seq 5)	92.5
DVD1252	TNF (seq 5)	LPA	100
DVD1253	LPA	TNF (seq 5)	94.4
DVD1254	TNF (seq 6)	PGE2	95.7
DVD1255	PGE2	TNF (seq 6)	100

DVD1256	TNF (seq 6)	SOST	93.7
DVD1257	SOST	TNF (seq 6)	83.3
DVD1258	TNF (seq 6)	NGF	95.7
DVD1259	NGF	TNF (seq 6)	90.9
DVD1260	TNF (seq 6)	LPA	85.6
DVD1261	LPA	TNF (seq 6)	96.2

Las DVD-Igs mostraron un excelente perfil SEC, donde la mayoría de las DVD-Ig presentan >90% de monómeros. Este perfil de DVD-Ig es similar al observado para los anticuerpos parentales.

SDS-PAGE

Se analizan los anticuerpos por electroforesis en gel de poliacrilamida - sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras. Se usa el lote Adalimumab de AFP04C como un control. Para las condiciones reductoras, se mezclan las muestras 1:1 con la solución amortiguadora de la muestra de SDS-PAGE tris glicina 2X (Invitrogen, cat N° LC2676, lote N° 1323208) con 100 mM DTT, y se calientan a 60°C durante 30 minutos. Para las condiciones no reductoras, se mezclan las muestras 1:1 con la solución amortiguadora de la muestra y se calientan a 100°C durante 5 minutos. Las muestras reducidas (10 mg por calle) se cargan en un gel de tris-glicina 12% pre-moldeado (Invitrogen, cat N° EC6005box, lote N° 6111021), y las muestras no reducidas (10 mg por calle) se cargan en un gel de tris-glicina 8%-16% pre-moldeado (Invitrogen, cat N° EC6045box, lote N° 6111021). Véase Blue Plus 2 (Invitrogen, cat N°LC5925, lote N° 1351542) se usa como un marcador de peso molecular. Se corren los geles en una caja-celda de mini gel XCell SureLock (Invitrogen, cat N° EI0001) y se separan las proteínas aplicando primero un voltaje de 75 para concentrar las muestras en el gel, seguido por un voltaje constante de 125 hasta que el frente de colorante alcanza la base del gel. La solución amortiguadora de corrida usada es la

solución amortiguadora 1X tris glicina SDS, preparada a partir de una solución amortiguadora 10X tris glicina SDS (ABC, MPS-79-080106). Se tiñen los geles durante la noche con colorante azul coloidal (Invitrogen cat N° 46-7015, 46-7016) y se destiñen con agua Milli-Q hasta que el fondo se encuentra transparente. Luego los geles teñidos se analizan usando un analizador de Expresión Epson (modelo 1680, S/N DASX003641).

Análisis de Velocidad de Sedimentación

Se cargan los anticuerpos en la cámara de la muestra de cada una de tres piezas centrales estándar de dos-sectores de carbono epon. Estas piezas centrales tienen una longitud de paso óptico de 1,2 cm y están construidas con ventanas de zafiro. Se usa PBS como solución amortiguadora de referencia y cada cámara contuvo 140 µL. Se examinan todas las muestras simultáneamente usando un rotor de 4 cavidades (AN-60Ti) en una ultracentrífuga analítica Beckman ProteomeLab XL-I (N° de serie PL106C01).

Se programan las condiciones de corrida y se realiza el control de la centrífuga usando ProteomeLab (v5.6). Se permite que las muestras y el rotor lleguen al equilibrio térmico durante una hora previa al análisis (20,0 ± 0,1 °C). La confirmación del cargado correcto de las celdas se realiza a 3000 rpm y se registra un único análisis para cada celda. Las condiciones de la velocidad de sedimentación son las siguientes:

Volumen de la Celda de la Muestra:	2,0 ml
Volumen de la Celda de Referencia:	2,0 ml
Temperatura:	20°C
Velocidad del Rotor:	35.000 rpm
Tiempo	8:00 horas

longitud de onda UV:	280 nm
Tamaño del Paso Radial:	0,003 cm
Recolección de datos.	Un dato por paso sin promedio de señal.
Número Total de Análisis:	100

Medición de peso molecular de LC-MS de anticuerpos intactos

Se analizan las mediciones de los pesos moleculares de anticuerpos intactos por LC-MS. Cada anticuerpo se diluye hasta aproximadamente 1 mg/ml con agua. Se usa un sistema HPLC 1100 (Agilent) con una microtrampa para proteínas (Michrom Bioresources, Inc, cat N° 004/25109/03) para desalar e introducir 5 mg de la muestra en un espectrómetro de masa API Qstar pulsar i (Applied Biosystems). Se usa un gradiente corto para eluir las muestras. Se corre el gradiente con la fase móvil A (0,08% FA, 0,02% TFA en agua de HPLC) y la fase móvil B (0,08% FA y 0,02% TFA en acetonitrilo) con una baja velocidad de flujo de 50 ml/minuto. El espectrómetro de masa se opera en un voltaje de aerosol de 4,5 kvolts con un rango de análisis de proporción masa a carga entre 2000 y 3500.

Medición del peso molecular por LC-MS de cadenas livianas y pesadas de anticuerpos

Se analizan los pesos moleculares de las cadenas livianas (LC), cadenas pesadas (HC) y HC deglicosiladas de anticuerpos por LC-MS. Se diluye el anticuerpo hasta 1 mg/ml con agua y se reduce la muestra a LC y HC con una concentración final de DTT 10 mM durante 30 minutos a 37°C. Para deglicosilar el anticuerpo, se incuban 100 mg de anticuerpo con 2 ml de PNGasa F, 5 ml de N-octilglucósido 10% en un volumen total de 100 ml

durante la noche a 37 °C. Después de la deglicosilación, se reduce la muestra con una concentración final de 10 mM DTT durante 30 minutos a 37°C. Se usa un sistema de HPLC Agilent 1100 con una columna C4 (Vydac, cat N° 214TP5115, S/N 060206537204069) para desalar e introducir la muestra (5 mg) en un espectrómetro de masa API Qstar pulsar i (Applied Biosystems). Se usa un gradiente corto para eluir las muestras. Se corre el gradiente con la fase móvil A (0,08% FA, 0,02% TFA en agua de HPLC) y la fase móvil B (0,08% FA y 0,02% TFA en acetonitrilo) con una baja velocidad de flujo de 50 ml/minuto. El espectrómetro de masa se opera en un voltaje de aerosol de 4,5 kvolts con un rango de análisis de proporción masa a carga entre 800 y 3500.

Mapeo de péptidos

Se desnaturaliza el anticuerpo durante 15 minutos a temperatura ambiente con una concentración final de hidrocloruro de guanidinio 6 M en 75 mM bicarbonato de amonio. Las muestras desnaturalizadas se reducen con una concentración final de DTT 10 mM a 37°C durante 60 minutos, seguido por alquilación con ácido iodoacético 50 mM (IAA) en oscuridad a 37°C por 30 minutos. Luego de la alquilación, se dializa la muestra durante la noche contra cuatro litros de bicarbonato de amonio 10 mM a 4°C. La muestra dializada se diluye hasta 1 mg/ml con bicarbonato de amonio 10 mM, pH 7,8 y se digieren 100 mg de anticuerpo ya sea con tripsina (Promega, cat N° V5111) o con Lys-C (Roche, cat N° 11 047 825 001) en una proporción 1:20 (p/p) tripsina/Lys-C:anticuerpo a 37°C por 4 h. Se apagan las digestiones con 1 ml de HCl 1 N. Para el mapeo peptídico con detección del espectrómetro de masa, se separan 40 ml de las digestiones por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa (RPHPLC) en una columna C18 (Vydac, cat N° 218TP51, S/N NE9606

10.3.5) con un sistema de HPLC Agilent 1100. La separación de los péptidos se corre con un gradiente usando la fase móvil A (0,02% TFA, 0,08% FA en agua de grado de HPLC) y la fase móvil B (0,02% TFA y 0,08% FA en acetonitrilo) con una velocidad de flujo de 50 ml/minuto. El espectrómetro de masa API QSTAR Pulsar i se opera en modo positivo con un voltaje de aerosol de 4,5 kvolts y un rango de análisis de proporción masa a carga entre 800 y 2500.

Mapeo de puentes disulfuro

Para desnaturalizar el anticuerpo, se mezclan 100 ml de anticuerpo con 300 ml de HCl de guanidinio 8 M en bicarbonato de amonio 100 mM. Se chequea el pH para asegurar que se encuentre entre 7 y 8 y se desnaturalizan las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente en una concentración final de HCl de guanidinio 6 M. Se diluye una porción de la muestra desnaturalizada (100 ml) hasta 600 ml con agua Milli-Q para obtener una concentración final de HCl de guanidinio 1 M. Se digiere la muestra (220 mg) ya sea con tripsina (Promega, cat N° V5111, lote N° 22265901) o Lys-C (Roche, cat N° 11047825001, lote N° 12808000) en proporciones 1:50 tripsina o 1:50 Lys-C:anticuerpo (p/p) (4,4 mg enzima:220 mg muestra) a 37°C durante aproximadamente 16 horas. Se agregan 5 mg adicionales de tripsina o Lys-C a las muestras y se permite que continúe la digestión por 2 horas adicionales a 37°C. Se detienen las digestiones por agregado de 1 ml de TFA a cada muestra. Las muestras digeridas se separan por RPHPLC usando una columna C18 (Vydac, cat N° 218TP51 S/N NE020630-4-1A) en un sistema de HPLC Agilent. Se corre la separación con el mismo gradiente usado para el mapeo de péptidos, usando la fase móvil A (0,02% TFA, 0,08% FA en agua de grado de

HPLC) y la fase móvil B (0,02% TFA y 0,08% FA en acetonitrilo) con una velocidad de flujo de 50 ml/minuto. Las condiciones operativas de HPLC son las mismas que las usadas para el mapeo de péptidos. El espectrómetro de masa API QSTAR Pulsar i se opera en modo positivo con un voltaje de aerosol de 4,5 kvolts y un rango de análisis de proporción masa a carga entre 800 y 2500. Los puentes disulfuro se asignan haciendo coincidir los PMs observados de los péptidos con los PMs predichos para los péptidos tripsinizados o tratados con Lys-C unidos por enlaces disulfuro.

Determinación de sulfhidrilos libres

El método usado para cuantificar cisteínas libres en un anticuerpo se basa en la reacción del reactivo de Ellman, 5,5¢- ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), con grupos sulfhidrilo (SH) la cual da lugar a un producto cromofórico característico, ácido 5-tio-(2-nitrobenzóico) (TNB). La reacción se ilustra en la fórmula:

DTNB + RSH ® RS-TNB + TNB- + H+

Se mide la absorbancia de TNB- a 412 nm usando un espectrofotómetro Cary 50. Se traza una curva de absorbancia usando diluciones de 2-mercaptoetanol (b-ME) como estándar de SH libres y se determinan las concentraciones de grupos sulfhidrilo libres en la proteína a partir de la absorbancia a 412 nm de la muestra.

Se prepara el b-ME estándar madre por una dilución en serie de b-ME 14,2 M con agua de grado HPLC hasta una concentración final de 0,142 mM. Luego se preparan los estándares en triplicado para cada concentración. Se concentra el anticuerpo hasta 10 mg/ml usando un filtro centrífugo amicon ultra 10.000 MWCO (Millipore, cat N° UFC801096, lote N° L3KN5251) y la solución

amortiguadora se cambia a la formulación de solución amortiguadora usada para Adalimumab (fosfato de sodio monobásico 5,57 mM, fosfato de sodio dibásico 8,69 mM, NaCl 106,69 mM, citrato de sodio 1,07 mM, ácido cítrico 6,45 mM, manitol 66,68 mM, pH 5,2, Tween 0,1% (p/v)). Se mezclan las muestras en un agitador a temperatura ambiente por 20 minutos. Luego se agregan 180 ml de solución amortiguadora Tris 100 mM, pH 8,1 a cada muestra y estándar seguido por la adición de 300 ml de DTNB 2 mM en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 8,1. Después de un mezclado exhaustivo, se mide la absorción a 412 nm de las muestras y estándares en un espectrofotómetro Cary 50. Se obtiene la curva estándar trazando la cantidad de SH libres y la DO_{412} nm de los estándares b-ME. Se calcula el contenido de SH libres de las muestras en base a esta curva después de la sustracción del blanco.

Cromatografía de intercambio catiónico débil

Se diluye el anticuerpo hasta 1 mg/ml con fosfato de sodio 10 mM, pH 6,0. Se analiza la heterogeneidad de carga usando un sistema de HPLC Shimadzu con una columna analítica WCX-10 ProPac (Dionex, cat N° 054993, S/N 02722). Las muestras se cargan en la columna en 80% de la fase móvil A (fosfato de sodio 10 mM, pH 6,0) y 20% de la fase móvil B (fosfato de sodio 10 mM, NaCl 500 mM, pH 6,0) y se eluyen con una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto.

Caracterización de oligosacáridos

Se derivatizan los oligosacáridos liberados después del tratamiento del anticuerpo con PNGasa F, con el reactivo de marcado 2-aminobenzamida (2-AB). Se separan los oligosacáridos marcados con fluorescencia por

cromatografía líquida de alto rendimiento de fase normal (NPHPLC) y se caracterizan las diferentes formas de oligosacáridos en base a la comparación del tiempo de retención con estándares conocidos.

El anticuerpo se digiere primero con PNGasa F para cortar los oligosacáridos N-ligados de la porción Fc de la cadena pesada. Se coloca el anticuerpo (200 mg) en un tubo Eppendorf de 500 ml junto con 2 ml de PNGasa F y 3 ml de N-octilglucósido 10%. Se agrega una solución amortiguadora salina de fosfatos para llevar el volumen final a 60 ml. Se incuba la muestra durante la noche a 37°C en un termoagitador Eppendorf ajustado en 700 RPM. También se digiere el lote AFP04C de Adalimumab con PNGasa F como un control.

Después del tratamiento con PNGasa F, se incuban las muestras a 95°C durante 5 minutos en un termoagitador Eppendorf ajustado en 750 RPM para precipitar las proteínas, luego se colocan las muestras en una centrífuga Eppendorf por 2 minutos a 10.000 RPM para bajar las proteínas precipitadas. Los sobrenadantes que contienen los oligosacáridos se transfieren a un tubo Eppendorf de 500 ml y se secan en una Speed-vac a 65°C.

Se marcan los oligosacáridos con 2AB usando un 2AB conjunto de elementos de marcado adquirido de Prozyme (cat N° GKK-404, lote N° 132026). El reactivo de marcado se prepara de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se agrega ácido acético (150 ml, provisto en el conjunto de elementos) al vial de DMSO (provisto en el conjunto de elementos) y se mezcla por pipeteo de la solución hacia arriba y hacia abajo varias veces. Se transfiere la mezcla de ácido acético/DMSO (100 ml) a un vial del colorante 2-AB (justo antes de su uso) y se mezcla hasta que el colorante se encuentra

completamente disuelto. Luego se agrega la solución del colorante a un vial de reductor (provisto en el conjunto de elementos) y se mezcla bien (reactivo de marcado). El reactivo de marcado (5 ml) se agrega a cada vial de la muestra seca de oligosacáridos, y se mezclan exhaustivamente. Se colocan los viales de la reacción en un termoagitador Eppendorf ajustado a 65°C y 700-800 RPM durante 2 horas de reacción.

Después de la reacción de marcado, se remueve el exceso de colorante fluorescente usando Cartuchos GlycoClean S de Prozyme (cat N° GKI-4726). Los cartuchos se lavan antes de la adición de las muestras con 1 ml de agua Milli-Q seguido por 5 lavados de 1 ml de solución de ácido acético 30%. Justo antes de agregar las muestras, se agrega 1 ml de acetonitrilo (Burdick y Jackson, cat N° AH015-4) a los cartuchos.

Después de que todo el acetonitrilo hubo pasado a través del cartucho, la muestra se ubica sobre el centro del disco recientemente lavado y se permite su adsorción al disco durante 10 minutos. Se lava el disco con 1 ml de acetonitrilo seguido por cinco lavados de 1 ml de acetonitrilo 96%. Los cartuchos se colocan encima de un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se eluyen los oligosacáridos marcados con 2-AB con 3 lavados (400 ml cada lavado) de agua Milli Q.

Se separan los oligosacáridos usando una columna de HPLC Glycosep N (cat N° GKI-4728) conectada a un sistema de HPLC Shimadzu. El sistema de HPLC Shimadzu consistió de un controlador del sistema, un degaseador, bombas binarias, un cargador automático de muestras con un enfriador de muestra, y un detector de fluorescencia.

Estabilidad a temperaturas elevadas

La solución amortiguadora del anticuerpo es alguna entre fosfato de sodio monobásico 5,57 mM, fosfato de sodio dibásico 8,69 mM, NaCl 106,69 mM, citrato de sodio 1,07 mM, ácido citrico 6,45 mM, manitol 66,68 mM, Tween 0,1% (p/v), pH 5,2; o histidina 10 mM, metionina 10 mM, o manitol 4%, pH 5,9 cuando se usan filtros de ultra centrífuga Amicon. Se ajusta la concentración final de los anticuerpos a 2 mg/ml con las soluciones amortiguadoras apropiadas. Luego se esterilizan por filtración las soluciones de anticuerpo y se preparan alícuotas de 0,25 ml bajo condiciones de esterilidad. Las alícuotas se dejan ya sea a -80°C, 5°C, 25°C, o 40°C durante 1, 2 o 3 semanas. Al final del período de incubación, se analizan las muestras por cromatografía de exclusión de tamaño y SDS-PAGE.

Las muestras de estabilidad se analizan por SDS-PAGE tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras. El procedimiento usado es el mismo que se describe en la presente solicitud. Los geles se tiñen durante la noche con colorante azul coloidal (Invitrogen cat N° 46-7015, 46-7016) y se destiñen con agua Milli-Q hasta que el fondo se encuentra transparente. Luego se analizan los geles teñidos usando un analizador de Expresión Epson (modelo 1680, S/N DASX003641). Para obtener más sensibilidad, se tiñen los mismos geles con plata usando el conjunto de elementos para tinción con plata (Owl Scientific) y se usan los procedimientos recomendados dados por el proveedor.

Ejemplo 1.2.2.3.C: Eficacia de un anticuerpo monoclonal humanizado por sí mismo en combinación con quimioterapia en el crecimiento de xenotransplantes de carcinoma humano

Las células cancerígenas humanas se crecen *in vitro* hasta 99%

viabilidad, 85% confluencia en botellas para cultivo tisular. Se marcan en la oreja y afeitan ratones SCID hembra o macho (Charles Rivers Labs) de 19-25 gramos. Se inoculan entonces los ratones en forma subcutánea en el flanco derecho con 0,2 ml de 2 x 10^6 células tumorales humanas (1:1 Matrigel) en el día 0 del estudio. Se inicia la administración (IP, Q3D/ semana) del vehículo (PBS), anticuerpo humanizado, y/o quimioterapia después de que los ratones son agrupados por tamaño en jaulas separadas con un volumen de tumor promedio de aproximadamente 150 a 200 mm^3. Los tumores se miden mediante un par de calibres dos veces a la semana comenzando aproximadamente el día 10 pos-inoculación y los volúmenes de los tumores se calculan de acuerdo a la fórmula $V = L \times W^2/2$ (V:volumen, mm^3; L:longitud, mm; W:ancho, mm). Se observó reducción del volumen tumoral en los animales tratados con mAb solo en combinación con quimioterapia respecto a los tumores en animales que recibieron solo el vehículo un mAb control de igual isotipo.

Ejemplo 1.2.2.3.D: Ensayo de citotoxicidad redirigida (rCTL) basado en FACS

Se aislaron células T CD3+ humanas de células mononuclares de sangre periférica (PBMC) aisladas y congeladas con anterlación empleando una columna de enriquecimiento por selección negativa (R&D Systems, Minneapolis, MN; Cat.#HTCC-525). Las células T se estimularon durante 4 días en frascos (vent cap, Corning, Acton, MA) recubiertos con 10 µg/ml de anti-CD3 (OKT-3, eBioscience, Inc., San Diego, CA) y 2 µg/ml de anti-CD28 (CD28.2, eBioscience, Inc., San Diego, CA) en D-PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se cultivaron en 30 U/ml de IL-2 (Roche) en medio RPMI 1640 completo

(Invitrogen, Carlsbad, CA) con L-glutamina, β-ME 55 mM, Pen/Strep, 10% de FBS). Después, las células T se dejaron reposar durante la noche en 30 U/ml de IL-2 antes de usarlas en el ensayo. Se marcaron células DoHH2 o Raji con PKH26 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el ensayo de rCTL, se usó un medio RPMI 1640 (sin fenol, Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía L-glutamina y 10% de FBS (Hyclone, Logan, UT) (véase Dreier *et al.* (2002) Int J Cancer 100:690).

Se sembraron células T efectoras (E) y blanco (T), con una concentración final de células de 10^5 y 10^4 células/cavidad en placas de 96 cavidades (Costar #3799, Acton, MA), respectivamente, para obteener una relación E:T de 10:1. Las moléculas de DVD-Ig se diluyeron para obtener curvas de titulación dependientes de la concentración. Después de incubar durante la noche, las células se sembraron y se lavaron una vez con D-PBS, antes de suspenderlas nuevamente en un amortiguador FACS que contenía 0,1% de BSA (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,1% de azida de sodio y 0,5 µg/ml de ioduro de propidio (BD) en D-PBS. Los datos de FACS se recolectaron en una máquina de FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA) y se analizaron en Flowjo (Treestar). Se calculó el porcentaje de blancos vivos en las muestras tratadas con DVD-Ig dividido por el porcentaje de blancos totales (control, sin tratamiento) para determinar el porcentaje de lisis específica. Las IC50 fueron calculadas con Prism (Graphpad).

La DVD-Ig CD3/CD (ID de secuencias AB AB002 + AB006, Ejemplo 2.7) fue evaluada en el ensayo de toxicidad redirigida para determinar su capacidad de eliminar células tumorales. Esta DVD-Ig fue capaz de matar los tumores in vitro con una IC50 de 5,0 pM. En el ensayo de toxicidad redirigida, también se

evaluó una DVD-Ig CD3/CD20, la cual fue capaz de matar los tumores in vitro con una IC50 de 325 pM. La secuencia de esta DVD-Ig CD3/CD20 ha sido descripta en la Solicitud de Patente de los EEUU con Nº de Acta 20070071675.

Ejemplo 1.4: Generación de DVD-Ig

Se construyeron moléculas DVD-Ig capaces de unir dos antígenos usando dos anticuerpos monoclonales parentales, uno contra el antígeno humano A y otro contra el antígeno humano B, seleccionados como se describe en la presente solicitud.

Ejemplo 1.4.1: Generación de DVD-Ig que posean dos longitudes de conector

Se utiliza una región constante que contiene μ1 Fc con mutaciones en 234, y 235 para eliminar las funciones efectoras ADCC/CDC. Se generan cuatro construcciones diferentes anti-A/B de DVD-Ig: 2 con conector corto y 2 con conector largo, cada una en dos orientaciones diferentes del dominio:V_A-V_B-C y V_B-V_A-C (ver la Tabla 11). Las secuencias del conector, se derivan de la secuencia N-terminal del dominio Cl/Ck o CH1 humano, de la siguiente manera:

Para las construcciones DVDAB:

cadena liviana (si anti-A tiene □): Conector corto: QPKAAP(SEQ ID NO: 15); Conector largo: QPKAAPSVTLFPP(SEQ ID NO: 16)

cadena liviana (si anti-A tiene □): Conector corto: TVAAP (SEQ ID NO: 13) ; Conector largo: TVAAPSVFIFPP(SEQ ID NO: 14)

cadena pesada (□1): Conector corto: ASTKGP(SEQ ID NO: 21); Conector largo: ASTKGPSVFPLAP(SEQ ID NO: 22)

Para las construcciones DVDBA:

cadena liviana (si anti-B tiene □): Conector corto: QPKAAP(SEQ ID NO: 15); Conector largo: QPKAAPSVTLFPP(SEQ ID NO: 16)

cadena liviana (si anti-B tiene k): Conector corto: TVAAP(SEQ ID NO: 13); Conector largo: TVAAPSVFIFPP(SEQ ID NO: 14)

cadena pesada (□1): Conector corto: ASTKGP(SEQ ID NO: 21); Conector largo: ASTKGPSVFPLAP(SEQ ID NO: 22)

Las construcciones de las cadenas liviana y pesada se subclonaron en el vector de expresión pBOS, y se expresaron en células COS, purificándose luego mediante cromatografía de Proteína A. Los materiales purificados se sometieron a análisis por SDS-PAGE y SEC.

La Tabla 11 describe las construcciones de la cadena pesada y cadena liviana usadas para expresar cada proteína anti-A/B DVD-Ig.

Tabla 11: Anti-A/B construcciones de DVD-Ig

Proteína DVD-Ig	**Construcción de la cadena pesada**	**Construcción de la cadena liviana**
DVDABSL	DVDABHC-SL	DVDABLC-SL
DVDABLL	DVDABHC-LL	DVDABLC-LL
DVDBASL	DVDBAHC-SL	DVDBALC-SL
DVDBALL	DVDBAHC-LL	DVDBALC-LL

Ejemplo 1.4.2: Clonado molecular de las construcciones de ADN para DVDABSL y DVDABLL:

Para generar las construcciones de la cadena pesada DVDABHC-LL y DVDABHC-SL, El dominio VH del anticuerpo A es amplificado por PCR usando cebadores específicos (los cebadores 3' contienen la secuencia del conector corto/largo para las construcciones SL/LL, respectivamente); mientras tanto el

dominio VH del anticuerpo B es amplificado usando cebadores específicos (los cebadores 5' contienen la secuencia del conector corto/largo para las construcciones SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones de PCR se llevan a cabo de acuerdo a procedimientos y técnicas de PCR estándar. Los dos productos de PCR se purifican por gel, y se usan juntos como molde solapado para la reacción subsiguiente de PCR solapada. Los productos de la PCR solapada se subclonan en el vector de expresión no-de mamífero pBOS-hCγ1,z (Abbott) doblemente digerido con Srf I y Sal I mediante la utilización de métodos de recombinación homóloga estándar.

Para generar las construcciones de la cadena liviana DVDABLC-LL y DVDABLC-SL, el dominio VL del anticuerpo A es amplificado por PCR usando cebadores específicos (los cebadores 3' contienen la secuencia del conector corto/largo para las construcciones SL/LL, respectivamente); mientras tanto el dominio VL del anticuerpo B es amplificado usando cebadores específicos (los cebadores 5' contienen la secuencia del conector corto/largo para las construcciones SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones de PCR se llevan a cabo de acuerdo a procedimientos y técnicas de PCR estándar. Los dos productos de PCR se purifican por gel, y se usan juntos como molde solapado para la reacción subsiguiente de PCR solapada usando condiciones de PCR estándar. Los productos de la PCR solapada se subclonan en el vector de expresión de mamífero pBOS-hCk (Abbott) doblemente digerido con Srf I y Not I mediante la utilización de métodos de recombinación homóloga estándar. Para generar DVDBASL y DVDBALL se ha utilizado una metodología similar, tal como se describe a continuación:

Ejemplo 1.4.3: Clonado molecular de las construcciones de ADN para

DVDBASL y DVDBALL

Para generar las construcciones de cadena pesada DVDBAHC-LL y DVDBAHC-SL, el dominio VH del anticuerpo B es amplificado por PCR usando cebadores específicos (los cebadores 3' contienen la secuencia del conector corto/largo para las construcciones SL/LL, respectivamente); mientras tanto el dominio VH del anticuerpo A es amplificado por PCR usando cebadores específicos (los cebadores 5' contienen la secuencia del conector corto/largo para las construcciones SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones de PCR se llevan a cabo de acuerdo a procedimientos y técnicas de PCR estándar. Los dos productos de PCR se purifican por gel, y se usan juntos como molde solapado para la reacción subsiguiente de PCR solapada usando condiciones de PCR estándar. Los productos de la PCR solapada se subclonan en el vector de expresión no-de mamífero pBOS-hCγ1,z (Abbott) doblemente digerido con Srf I y Sal I mediante la utilización de métodos de recombinación homóloga estándar.

Para generar las construcciones de la cadena liviana DVDBALC-LL y DVDBALC-SL, el dominio VL del anticuerpo B es amplificado por PCR usando cebadores específicos (los cebadores 3' contienen la secuencia del conector corto/largo para las construcciones SL/LL, respectivamente); mientras tanto el dominio VL del anticuerpo A es amplificado usando cebadores específicos (los cebadores 5' contienen la secuencia del conector corto/largo para las construcciones SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones de PCR se llevan a cabo de acuerdo a procedimientos y técnicas de PCR estándar. Los dos productos de PCR se purifican por gel, y se usan juntos como molde solapado para la reacción subsiguiente de PCR solapada usando condiciones de PCR

estándar. Los productos de la PCR solapada se subclonan en el vector de expresión de mamífero pBOS-hCk (Abbott) doblemente digerido con Srf I y Not I mediante la utilización de métodos de recombinación homóloga estándar.

Ejemplo 1.4.4: Construcción y expresión de DVD-Ig adicionales

Ejemplo 1.4.4.1: Preparación de las construcciones DVD-Ig del vector

Mediante la preparación de hibridomas pueden obtenerse secuencias aminoacídicas de anticuerpos parentales, las cuales reconocen antígenos específicos o epitopes de los mismos, para su incorporación en una DVD-Ig tal como se describió anteriormente o pueden obtenerse por secuenciación de proteínas de anticuerpos o ácidos nucleicos conocidos. Además, pueden obtenerse secuencias conocidas de la literatura. Las secuencias pueden utilizarse para sintetizar ácidos nucleicos usando tecnologías de síntesis de ADN o amplificación estándar, y armando los fragmentos del anticuerpo deseados en vectores de expresión, usando tecnología de ADN recombinante estándar, para expresión en células.

Por ejemplo, los codones de ácido nucleico se determinaron partiendo de las secuencias de aminoácidos y se sintetizaron oligonucleótidos de ADN por Blue Heron Biotechnology, Inc. (www.blueheronbio.com) Bothell, WA EE.UU. Los oligonucleótidos se ensamblaron en fragmentos de ADN doble cadena de 300-2.000 pares de bases, se clonaron en un vector plasmídico y se verificó la secuencia. Los fragmentos clonados se ensamblaron usando un proceso enzimático para producir el gen completo y se subclonó en un vector de expresión. (Véase 7.306.914; 7.297.541; 7.279.159; 7.150.969; 20080115243; 20080102475; 20080081379; 20080075690; 20080063780; 20080050506; 20080038777; 20080022422; 20070289033; 20070287170;

20070254338; 20070243194; 20070225227; 20070207171; 20070150976; 20070135620; 20070128190; 20070104722; 20070092484; 20070037196; 20070028321; 20060172404; 20060162026; 20060153791; 20030215458; 20030157643).

Se utilizó un grupo de vectores pHybE (Solicitud de Patente de EE.UU. No. Serie. 61/021.282) para el clonado del anticuerpo parental y del DVD-Ig. Se utilizó V1, derivado de pJP183; pHybE-hCg1,z, no V2, para el clonado de las cadenas pesadas del anticuerpo y del DVD con una región constante salvaje. Se utilizó V2, derivado de pJP191; pHybE-hCk V2, para el clonado de las cadenas livianas del anticuerpo y del DVD con una región kappa constante. Se utilizó V3, derivado de pJP192; pHybE-hCl V2, para el clonado de las cadenas livianas del anticuerpo y del DVD con una región lambda constante. Se utilizó V4, construído con un péptido señal lambda y una región constante kappa, para el clonado de las cadenas livianas del DVD con un dominio híbrido V lambda-kappa. Se utilizó V5, construído con un péptido señal kappa y una región constante lambda, para el clonado de las cadenas livianas del DVD con un dominio híbrido V kappa-lambda. Se utilizó V7, derivado de pJP183; pHybE-hCg1,z, no V2, para el clonado de las cadenas pesadas del anticuerpo y del DVD con una región constante mutante (234,235 AA).

Refiriéndose a la Tabla 12, un grupo de vectores fue utilizado en el clonado de las cadenas VH y VL de los anticuerpos parentales y del DVD-Ig.

Tabla 12: Vectors Usados para clonar anticuerpos parentales y DVD-Igs

ID	Vectores de cadena pesada	Vector de cadena liviana
AB213	V1	V2
AB214	V1	V2
AB215	V1	V2

AB216	V1	V2
AB217	V1	V2
AB218	V1	V2
DVD1221	V1	V2
DVD1224	V1	V2
DVD1225	V1	V2
DVD1226	V1	V2
DVD1227	V1	V2
DVD1229	V1	V2
DVD1230	V1	V2
DVD1231	V1	V2
DVD1232	V1	V2
DVD1233	V1	V2
DVD1236	V1	V2
DVD1237	V1	V2
DVD1238	V1	V2
DVD1239	V1	V2
DVD1241	V1	V2
DVD1242	V1	V2
DVD1243	V1	V2
DVD1244	V1	V2
DVD1245	V1	V2
DVD1246	V1	V2
DVD1247	V1	V2
DVD1248	V1	V2
DVD1249	V1	V2
DVD1250	V1	V2
DVD1251	V1	V2
DVD1252	V1	V2
DVD1253	V1	V2
DVD1254	V1	V2
DVD1255	V1	V2
DVD1256	V1	V2
DVD1257	V1	V2
DVD1258	V1	V2
DVD1259	V1	V2
DVD1260	V1	V2
DVD1261	V1	V2

Ejemplo 1.4.4.2: Transfección y expresión en células 293

La expresión de anticuerpos de referencia y DVD-Igs se llevó a cabo mediante cotransfección transitoria de células HEK293 (EBNA) con plásmidos que contienen los ácidos nucleicos correspondientes de cadena liviana (LC) y cadena pesada (HC). Se propagaron células HEK293 (EBNA) en medio Freestyle 293 (Invitrogen, Carlsbad CA) en botellas a una escala de 0,5 l (2 l Corning # de Catálogo 431198) agitando en un incubador de CO_2 (8% de CO_2, 125 RPM, 37°C). Cuando los cultivos alcanzaron una densidad de $1x10^6$ células/ml, se transfectaron las células con complejo de transfección. El complejo de transfección se preparó primero mediante mezclado de 150 µg de plásmido LC y 100 µg de plásmido HC juntos en 25 ml de medio Freestyle, seguido por agregado de 500 µl de solución madre de PEI [solución madre: 1 mg/ml (pH 7,0) PEI Lineal de 25 kDa, Polysciences # de Catálogo 23966]. Se mezcló el complejo de transfección mediante inversión y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de agregarse al cultivo celular. Después de la transfección, se continuó el crecimiento de los cultivos en incubador de CO_2 (8% de CO_2, 125 RPM, 37°C). Veinticuatro horas después de la transfección, se suplementó el cultivo con 25 ml de una solución de Triptona N1 al 10% (Organo Technie, La Courneuve Francia # de Catálogo 19553). Nueve días después de la transfección, se eliminaron las células de los cultivos mediante centrifugación (16.000 g, 10 minutos), y se filtró en forma estéril el sobrenadante retenido (Millipore HV Durapore Stericup, 0,45 µm) y se colocó a 4°C hasta el inicio del paso de purificación.

Se purificó cada anticuerpo o DVD-Ig en forma individual usando una columna empacada descartable de 1 ml (empacada por Orochem Technologies) con resina MabSelect SuRe (GE Healthcare). Se preequilibraron

las columnas en PBS y luego se cargaron con las muestras cosechadas de 0,55 l durante una noche (15 horas) a 1 ml/minuto con recirculación del flujo pasado de vuelta hacia el recipiente de alimentación. Luego del paso de carga, se lavaron las columnas con 20 ml de PBS y se eluyó la proteína mediante alimentación con solución amortiguadora de elusión [ácido cítrico 50 mM pH 3,5] a 4 ml/minutos y colectando fracciones (1 ml) en tubos que ya contienen 0,2 ml de Tris 1,5 M pH 8,2 (llevando el pH final a aproximadamente 6,0). Se agruparon las fracciones que contienen anticuerpo en base a los cromatogramas y se dializaron en la solución de almacenamiento final [ácido cítrico 10 mM, Na_2HPO_4 10 mM, pH 6,0]. Después de la diálisis, se filtraron las muestras a través de un Steriflip (Millipore) de 0,22 µm y se determinó la concentración de proteínas mediante absorbancia [espectrofotómetro de arreglos de diodos Hewlett Packard 8453]. Se llevó a cabo un análisis por SDS-PAGE en muestras analíticas (tanto reducidas como sin reducir) para evaluar la pureza final, verificar la presencia de bandas de cadena pesada y liviana de tamaño apropiado, y confirmar la ausencia de cantidades significativas de (por ejemplo, sin complejar) cadena liviana (en las muestras no reducidas).

La Tabla 13 contiene los datos de rendimiento para anticuerpos parentales o construcciones de DVD-Ig expresados como miligramos por litro en células 293.

Tabla 13: Expresión transitoria en rendimientos de anticuerpos parentales y construcciones de DVD-Ig en células 293

ID del anticuerpo parental o DVD-Ig ID	Dominio variable N-terminal (VD)	Dominio variable C-terminal (VD)	Rendimiento de expresión (mg/L)
AB213	TNF (seq 2)		17.8
AB214	TNF (seq 3)		0.57
AB215	TNF (seq 4)		22.4
AB216	LPA		17.6
AB217	TNF (seq 5)		34.2
AB218	TNF (seq 6)		64
DVD1220	TNF (seq 2)	PGE2	0.06
DVD1221	PGE2	TNF (seq 2)	0.8
DVD1222	TNF (seq 3)	PGE2	0
DVD1223	PGE2	TNF (seq 3)	0.1
DVD1224	TNF (seq 4)	PGE2	4.14
DVD1225	PGE2	TNF (seq 4)	5.12
DVD1226	TNF (seq 2)	SOST	3.76
DVD1227	SOST	TNF (seq 2)	5.16
DVD1228	TNF (seq 3)	SOST	0
DVD1229	SOST	TNF (seq 3)	0.72
DVD1230	TNF (seq 4)	SOST	19
DVD1231	SOST	TNF (seq 4)	9.2
DVD1232	TNF (seq 2)	NGF	1.36
DVD1233	NGF	TNF (seq 2)	3.18
DVD1234	TNF (seq 3)	NGF	0
DVD1235	NGF	TNF (seq 3)	0
DVD1236	TNF (seq 4)	NGF	3.56
DVD1237	NGF	TNF (seq 4)	0.76
DVD1238	TNF (seq 2)	LPA	0.08
DVD1239	LPA	TNF (seq 2)	0.72
DVD1240	TNF (seq 3)	LPA	0
DVD1241	LPA	TNF (seq	0.14

ID del anticuerpo parental o DVD-Ig ID	Dominio variable N-terminal (VD)	Dominio variable C-terminal (VD)	Rendimiento de expresión (mg/L)
		3)	
DVD1242	TNF (seq 4)	LPA	1.94
DVD1243	LPA	TNF (seq 4)	1.36
DVD1244	TNF (seq 1)	LPA	14.5
DVD1245	LPA	TNF (seq 1)	5.46
DVD1246	TNF (seq 5)	PGE2	5.64
DVD1247	PGE2	TNF (seq 5)	9.42
DVD1248	TNF (seq 5)	SOST	30.54
DVD1249	SOST	TNF (seq 5)	18.22
DVD1250	TNF (seq 5)	NGF	4.66
DVD1251	NGF	TNF (seq 5)	6.26
DVD1252	TNF (seq 5)	LPA	0.26
DVD1253	LPA	TNF (seq 5)	12.22
DVD1254	TNF (seq 6)	PGE2	14.3
DVD1255	PGE2	TNF (seq 6)	17.28
DVD1256	TNF (seq 6)	SOST	52
DVD1257	SOST	TNF (seq 6)	36.4
DVD1258	TNF (seq 6)	NGF	30.4
DVD1259	NGF	TNF (seq 6)	23.2
DVD1260	TNF (seq 6)	LPA	7.78
DVD1261	LPA	TNF (seq 6)	10.12

Todas las proteínas DVD-Ig se expresaron bien en las células 293. Las proteínas DVD-Ig pueden ser purificados fácilmente a través de una columna de proteína A. En la mayoría de los casos puede obtenerse >5 mg/l de proteína DVD-Ig pura de los sobrenadantes de las células 293.

Ejemplo 1.4.5: Caracterización y selección principal de A/B DVD-Igs

Las afinidades de unión de anti-A/B DVD-Igs se analizaron en Biacore contra ambas proteínas A y B. La propiedad tetravalente de la DVD-Ig es examinada por múltiples estudios de unión en Biacore. Mientras tanto, la potencia de neutralización de las DVD-Igs para proteína A y proteína B se evaluó mediante bioensayos, respectivamente, como se describe en la presente solicitud. Las moléculas DVD-Ig que mejor retuvieron la afinidad y potencia de los mAbs originales se seleccionaron para caracterizaciones fisicoquímicas y bioanalíticas exhaustivas (PK de rata) como se describe aquí para cada mAb. Basados en la colección de análisis, la DVD-Ig principal final es promovida en el desarrollo de la línea celular estable CHO, y el material derivado de CHO es empleado en estudios de estabilidad, farmacocinética y eficacia en macacos cangrejeros, y actividades de preformulación.

Ejemplo 2: Producción y Caracterización de inmunoglobulinas de dominio variable dual (DVD-Ig)

Se generaron Inmunoglobulinas de dominio variable dual (DVD-Ig) usando anticuerpos parentales con secuencias de aminoácidos conocidas mediante la síntesis de fragmentos polinucleotídicos que codificaran las secuencias de la DVD-Ig de cadena variable pesada y la DVD-Ig de cadena variable liviana y clonando luego los fragmentos en un vector pHybC-D2 de acuerdo al Ejemplo 1.4.4.1. Las construcciones DVD-Ig fueron clonadas allí y expresadas en células 293 como se describe en el Ejemplo 1.4.4.2. La proteína DVD-Ig se purificó de acuerdo a métodos estándar. Se determinaron las características funcionales de acuerdo a los métodos descriptos en el Ejemplo 1.1.1 y 1.1.2, como allí se indica. Se proveen a continuación las cadenas DVD-

Ig VH y VL para las DVD-Igs de la invención.

Ejemplo 2.1: Generación de TNF (seq. 2) y NGF DVD-Ig

Tabla 14

SEQ ID Nº	Nombre de dominio variable DVD	Nombre de dominio variable externo	Nombre de dominio variable interno	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
54	**DVD1232H**	AB213VH	AB020VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSG FSLTDYGVNWVRQPPGKGLEWLGMI WGDGSTDYDSTLKSRLSISKDNSKSQ IFLKMNSLQTDDTARYYCAREWHHGP VAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLQ ESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGY DLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTD YNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDY WGQGTLVTVSS
55	**DVD1232L**	AB213VL	AB020VL	DIVMTQSHKFMSTTVGDRVSITCKAS QAVSSAVAWYQQKPGQSPKLLIYWA STRHTGVPDRFTGSGSVTDFTLTIHNL QAEDLALYYCQQHYSTPFTFGSGTKL EIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISNNLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGT DFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPY TFGQGTKLEIKR
56	**DVD1233H**	AB020VH	AB213VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG FSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWG DGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSY YFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQL KESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTD YGVNWVRQPPGKGLEWLGMIWGDG STDYDSTLKSRLSISKDNSKSQIFLKM NSLQTDDTARYYCAREWHHGPVAYW GQGTLVTVSA

57	**DVD1233 L**	AB020VL	AB213VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR FHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEI KR**TVAAP**DIVMTQSHKFMSTTVGDRV SITCKASQAVSSAVAWYQQKPGQSPK LLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSVTDF TLTIHNLQAEDLALYYCQQHYSTPFTF GSGTKLEIKR

Ejemplo 2.2: Generación de TNF (seq. 3) y NGF DVD-Ig

Tabla 15

SEQ ID Nº	**Nombre de dominio variable DVD**	**Nombre de dominio variable externo**	**Nombre de dominio variable interno**	**Secuencia 12345678901234567890123456789012345**
58	**DVD1234 H**	AB214VH	AB020VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS GFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAE IRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDS KSAVYLQMTDLRTEDTGVYYCSRNYY GSTYDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**QV QLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFS LIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDG TTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYF DYWGQGTLVTVSS
59	**DVD1234 L**	AB214VL	AB020VL	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQ FVGSSIHWYQQRTNGSPRLLIKYASE SMSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINTVES EDIADYYCQESHSWPFTFGSGTNLEV KR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISNNLNWYQQKPGKAPK LLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFT FTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFG QGTKLEIKR

60	**DVD1235 H**	AB020VH	AB214VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG FSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWG DGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSY YFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVKLE ESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFIFSN HWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSKSI NSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYL QMTDLRTEDTGVYYCSRNYYGSTYD YWGQGTTLTVSS
61	**DVD1235 L**	AB020VL	AB214VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR FHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEI KR**TVAAP**DILLTQSPAILSVSPGERVS FSCRASQFVGSSIHWYQQRTNGSPR LLIKYASESMSGIPSRFSGSGSGTDFT LSINTVESEDIADYYCQESHSWPFTFG SGTNLEVKR

Ejemplo 2.3: <u>Generación de TNF (seq. 4) y NGF DVD-Ig</u>

Tabla 16

SEQ ID N°	**Nombre de dominio variable DVD**	**Nombre de dominio variable externo**	**Nombre de dominio variable interno**	**Secuencia** **12345678901234567890123456789012345**
62	**DVD1236 H**	AB215VH	AB020VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYAMHWVRQAPGNGLEWVAF MSYDGSNKYAKDSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGI AAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**A STKGP**QVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWI GIIWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYW YATSYYFDYWGQGTLVTVSS

63	**DVD1236 L**	AB215VL	AB020VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ SVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKV DIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISNNLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGT DFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPY TFGQGTKLEIKR
64	**DVD1237 H**	AB020VH	AB215VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG FSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWG DGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSY YFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQL VESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAMHWVRQAPGNGLEWVAFMSYD GSNKYAKDSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGG NYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
65	**DVD1237 L**	AB020VL	AB215VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR FHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEI KR**TVAAP**EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFT FGPGTKVDIKR

Ejemplo 2.4: **Generación de TNF (seq. 5) y NGF DVD-Ig**

Tabla 17

SEQ ID Nº	Nombre de dominio variable DVD	Nombre de dominio variable externo	Nombre de dominio variable interno	Secuencia 1234567890123456789012345678901 2345
66	**DVD1250 H**	AB217VH	AB020VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAV IWSDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVESA MGGFYYNGMDVWGQGTTVTVSS**AS TKGP**QVQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIG IIWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGQGTLVTVSS
67	**DVD1250 L**	AB217VL	AB020VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGIRIDLGWYQQKPGKAPKRLIYAAST LQSGVPSRFSGSGSGTEFIFTISSLQP EDFASYYCLQHKSYPLTFGGGTKVEIK R**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQSISNNLNWYQQKPGKAPKLL IYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTF TISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQ GTKLEIKR
68	**DVD1251 H**	AB020VH	AB217VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG FSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWG DGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSY YFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQL VESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWSD GSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREVESAMGG FYYNGMDVWGQGTTVTVSS

69	**DVD1251 L**	AB020VL	AB217VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR FHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEI KR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQGIRIDLGWYQQKPGKAPK RLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFI FTISSLQPEDFASYYCLQHKSYPLTFG GGTKVEIKR

Ejemplo 2.5: **Generación de TNF (seq. 6) y NGF-Ig**

Tabla 18

SEQ ID Nº	**Nombre de dominio variable DVD**	**Nombre de dominio variable externo**	**Nombre de dominio variable interno**	**Secuencia 12345678901234567890123456789012345**
70	**DVD1258 H**	AB218VH	AB020VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASG FTVSRNYMSWVRQAPGKGLEWVSVI YSGDRTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEGGF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQE SGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYD LNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDY NSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYW GQGTLVTVSS
71	**DVD1258 L**	AB218VL	AB020VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIHGAS IRATGLPARFSGSGSGTEFTLTISSLQ SEDFAVYYCQQYNYWWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSISNNLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDF TFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTF GQGTKLEIKR

72	**DVD1259 H**	AB020VH	AB218VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG FSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWG DGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSY YFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQL VESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVS RNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGD RTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGEGGFDYWG QGTLVTVSS
73	**DVD1259 L**	AB020VL	AB218VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR FHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEI KR**TVAAP**EIVMTQSPATLSVSPGERA TLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIHGASIRATGLPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYYCQQYNYWWTF GQGTKVEIKR

Ejemplo 2.6: <u>Generación de TNF (seq. 2) y SOST DVD-Ig</u>

Tabla 19

SEQ ID Nº	**Nombre de dominio variable DVD**	**Nombre de dominio variable externo**	**Nombre de dominio variable interno**	**Secuencia** **12345678901234567890123456789012345**
74	**DVD1226 H**	AB213VH	AB022VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSG FSLTDYGVNWVRQPPGKGLEWLGMI WGDGSTDYDSTLKSRLSISKDNSKSQ IFLKMNSLQTDDTARYYCAREWHHGP VAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLQ QSGPELVTPGASVKISCKASGYTFTD HYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYSG ETTYNQKFKGTATLTVDKSSSIAYMEI RGLTSEDSAVYYCARDDYDASPFAY WGQGTLVTVSA

75	**DVD1226 L**	AB213VL	AB022VL	DIVMTQSHKFMSTTVGDRVSITCKAS QAVSSAVAWYQQKPGQSPKLLIYWA STRHTGVPDRFTGSGSVTDFTLTIHNL QAEDLALYYCQQHYSTPFTFGSGTKL EIKR**TVAAP**DVQMIQSPSSLSASLGDI VTMTCQASQGTSINLNWFQQKPGKA PKLLIYGSSNLEDGVPSRFSGSRYGT DFTLTISSLEDEDLATYFCLQHSYLPYT FGGGTKLEIKR
76	**DVD1227 H**	AB022VH	AB213VH	EVQLQQSGPELVTPGASVKISCKASG YTFTDHYMSWVKQSHGKSLEWIGDIN PYSGETTYNQKFKGTATLTVDKSSSIA YMEIRGLTSEDSAVYYCARDDYDASP FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLK ESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTDY GVNWVRQPPGKGLEWLGMIWGDGS TDYDSTLKSRLSISKDNSKSQIFLKMN SLQTDDTARYYCAREWHHGPVAYWG QGTLVTVSA
77	**DVD1227 L**	AB022VL	AB213VL	DVQMIQSPSSLSASLGDIVTMTCQAS QGTSINLNWFQQKPGKAPKLLIYGSS NLEDGVPSRFSGSRYGTDFTLTISSLE DEDLATYFCLQHSYLPYTFGGGTKLEI KR**TVAAP**DIVMTQSHKFMSTTVGDRV SITCKASQAVSSAVAWYQQKPGQSPK LLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSVTDF TLTIHNLQAEDLALYYCQQHYSTPFTF GSGTKLEIKR

Ejemplo 2.7: <u>Generación de TNF (seq. 3) y SOST DVD-Ig</u>

Tabla 20

SEQ ID Nº	Nombre de dominio variable DVD	Nombre de dominio variable externo	Nombre de dominio variable interno	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
78	**DVD1228 H**	AB214VH	AB022VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS GFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAE IRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDS KSAVYLQMTDLRTEDTGVYYCSRNYY GSTYDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EV QLQQSGPELVTPGASVKISCKASGYT FTDHYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPY SGETTYNQKFKGTATLTVDKSSSIAYM EIRGLTSEDSAVYYCARDDYDASPFA YWGQGTLVTVSA
79	**DVD1228 L**	AB214VL	AB022VL	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQ FVGSSIHWYQQRTNGSPRLLIKYASE SMSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINTVES EDIADYYCQESHSWPFTFGSGTNLEV KR**TVAAP**DVQMIQSPSSLSASLGDIVT MTCQASQGTSINLNWFQQKPGKAPK LLIYGSSNLEDGVPSRFSGSRYGTDFT LTISSLEDEDLATYFCLQHSYLPYTFG GGTKLEIKR
80	**DVD1229 H**	AB022VH	AB214VH	EVQLQQSGPELVTPGASVKISCKASG YTFTDHYMSWVKQSHGKSLEWIGDIN PYSGETTYNQKFKGTATLTVDKSSSIA YMEIRGLTSEDSAVYYCARDDYDASP FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVKLEE SGGGLVQPGGSMKLSCVASGFIFSNH WMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSKSIN SATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYL QMTDLRTEDTGVYYCSRNYYGSTYD YWGQGTTLTVSS

81	**DVD1229 L**	AB022VL	AB214VL	DVQMIQSPSSLSASLGDIVTMTCQAS QGTSINLNWFQQKPGKAPKLLIYGSS NLEDGVPSRFSGSRYGTDFTLTISSLE DEDLATYFCLQHSYLPYTFGGGTKLEI KR**TVAAP**DILLTQSPAILSVSPGERVS FSCRASQFVGSSIHWYQQRTNGSPR LLIKYASESMSGIPSRFSGSGSGTDFT LSINTVESEDIADYYCQESHSWPFTFG SGTNLEVKR

Ejemplo 2.8: **Generación de TNF(seq. 4) y SOST DVD-Ig**

Tabla 21

SEQ ID Nº	**Nombre de dominio variable DVD**	**Nombre de dominio variable externo**	**Nombre de dominio variable interno**	**Secuencia** **12345678901234567890123456789012345**
82	**DVD1230 H**	AB215VH	AB022VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYAMHWVRQAPGNGLEWVAF MSYDGSNKYAKDSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGI AAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**A** **STKGP**EVQLQQSGPELVTPGASVKIS CKASGYTFTDHYMSWVKQSHGKSLE WIGDINPYSGETTYNQKFKGTATLTVD KSSSIAYMEIRGLTSEDSAVYYCARDD YDASPFAYWGQGTLVTVSA
83	**DVD1230 L**	AB215VL	AB022VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ SVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKV DIKR**TVAAP**DVQMIQSPSSLSASLGDI VTMTCQASQGTSINLNWFQQKPGKA PKLLIYGSSNLEDGVPSRFSGSRYGT DFTLTISSLEDEDLATYFCLQHSYLPYT FGGGTKLEIKR

84	**DVD1231 H**	AB022VH	AB215VH	EVQLQQSGPELVTPGASVKISCKASG YTFTDHYMSWVKQSHGKSLEWIGDIN PYSGETTYNQKFKGTATLTVDKSSSIA YMEIRGLTSEDSAVYYCARDDYDASP FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLV ESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS YAMHWVRQAPGNGLEWVAFMSYDG SNKYAKDSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGG NYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
85	**DVD1231 L**	AB022VL	AB215VL	DVQMIQSPSSLSASLGDIVTMTCQAS QGTSINLNWFQQKPGKAPKLLIYGSS NLEDGVPSRFSGSRYGTDFTLTISSLE DEDLATYFCLQHSYLPYTFGGGTKLEI KR**TVAAP**EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFT FGPGTKVDIKR

Ejemplo 2.9: **Generación de TNF (seq. 5) y SOST DVD-Ig**

Tabla 22

SEQ ID Nº	**Nombre de dominio variable DVD**	**Nombre de dominio variable externo**	**Nombre de dominio variable interno**	**Secuencia** **12345678901234567890123456789012345**
86	**DVD1248 H**	AB217VH	AB022VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAV IWSDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVESA MGGFYYNGMDVWGQGTTVTVSS**AS TKGP**EVQLQQSGPELVTPGASVKISC KASGYTFTDHYMSWVKQSHGKSLEW IGDINPYSGETTYNQKFKGTATLTVDK SSSIAYMEIRGLTSEDSAVYYCARDDY DASPFAYWGQGTLVTVSA

87	**DVD1248 L**	AB217VL	AB022VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGIRIDLGWYQQKPGKAPKRLIYAAST LQSGVPSRFSGSGSGTEFIFTISSLQP EDFASYYCLQHKSYPLTFGGGTKVEIK R**TVAAP**DVQMIQSPSSLSASLGDIVT MTCQASQGTSINLNWFQQKPGKAPK LLIYGSSNLEDGVPSRFSGSRYGTDFT LTISSLEDEDLATYFCLQHSYLPYTFG GGTKLEIKR
88	**DVD1249 H**	AB022VH	AB217VH	EVQLQQSGPELVTPGASVKISCKASG YTFTDHYMSWVKQSHGKSLEWIGDIN PYSGETTYNQKFKGTATLTVDKSSSIA YMEIRGLTSEDSAVYYCARDDYDASP FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLV ESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS YDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWSDG SIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAREVESAMGGF YYNGMDVWGQGTTVTVSS
89	**DVD1249 L**	AB022VL	AB217VL	DVQMIQSPSSLSASLGDIVTMTCQAS QGTSINLNWFQQKPGKAPKLLIYGSS NLEDGVPSRFSGSRYGTDFTLTISSLE DEDLATYFCLQHSYLPYTFGGGTKLEI KR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQGIRIDLGWYQQKPGKAPK RLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFI FTISSLQPEDFASYYCLQHKSYPLTFG GGTKVEIKR

Ejemplo 2.10: Generación de TNF (seq. 6) y SOST DVD-Ig

Tabla 23

SEQ ID Nº	Nombre de dominio variable DVD	Nombre de dominio variable externo	Nombre de dominio variable interno	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
90	**DVD1256H**	AB218VH	AB022VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASG FTVSRNYMSWVRQAPGKGLEWVSVI YSGDRTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEGGF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLQQ SGPELVTPGASVKISCKASGYTFTDHY MSWVKQSHGKSLEWIGDINPYSGETT YNQKFKGTATLTVDKSSSIAYMEIRGL TSEDSAVYYCARDDYDASPFAYWGQ GTLVTVSA
91	**DVD1256L**	AB218VL	AB022VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIHGAS IRATGLPARFSGSGSGTEFTLTISSLQ SEDFAVYYCQQYNYWWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DVQMIQSPSSLSASLGDIV TMTCQASQGTSINLNWFQQKPGKAP KLLIYGSSNLEDGVPSRFSGSRYGTD FTLTISSLEDEDLATYFCLQHSYLPYTF GGGTKLEIKR
92	**DVD1257H**	AB022VH	AB218VH	EVQLQQSGPELVTPGASVKISCKASG YTFTDHYMSWVKQSHGKSLEWIGDIN PYSGETTYNQKFKGTATLTVDKSSSIA YMEIRGLTSEDSAVYYCARDDYDASP FAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLV ESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSR NYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGDR TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGEGGFDYWGQ GTLVTVSS

93	**DVD1257 L**	AB022VL	AB218VL	DVQMIQSPSSLSASLGDIVTMTCQAS QGTSINLNWFQQKPGKAPKLLIYGSS NLEDGVPSRFSGSRYGTDFTLTISSLE DEDLATYFCLQHSYLPYTFGGGTKLEI KR**TVAAP**EIVMTQSPATLSVSPGERA TLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIHGASIRATGLPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYYCQQYNYWWTF GQGTKVEIKR

Ejemplo 2.11: **Generación de TNF (seq. 2) y PGE2**

Tabla 24

SEQ ID N°	Nombre de dominio variable DVD	Nombre de dominio variable externo	Nombre de dominio variable interno	Secuencia 1234567890123456789012345678901234
94	**DVD1220 H**	AB213VH	AB048VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSG FSLTDYGVNWVRQPPGKGLEWLGM IWGDGSTDYDSTLKSRLSISKDNSKS QIFLKMNSLQTDDTARYYCAREWHH GPVAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTKYWLGWVRQAPGQGLEWMGDI YPGYDYTHYNEKFKDRVTLTTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDG SSTYWGQGTLVTVSS
95	**DVD1220 L**	AB213VL	AB048VL	DIVMTQSHKFMSTTVGDRVSITCKAS QAVSSAVAWYQQKPGQSPKLLIYWA STRHTGVPDRFTGSGSVTDFTLTIHN LQAEDLALYYCQQHYSTPFTFGSGT KLEIKR**TVAAP**DVLMTQTPLSLPVTP GEPASISCTSSQNIVHSNGNTYLEWY LQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CFQVSHVPYTFGGGTKVEIKR

96	**DVD1221 H**	AB048VH	AB213VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTKYWLGWVRQAPGQGLEWM GDIYPGYDYTHYNEKFKDRVTLTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARS DGSSTYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**Q VQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGF SLTDYGVNWVRQPPGKGLEWLGMI WGDGSTDYDSTLKSRLSISKDNSKS QIFLKMNSLQTDDTARYYCAREWHH GPVAYWGQGTLVTVSA
97	**DVD1221 L**	AB048VL	AB213VL	DVLMTQTPLSLPVTPGEPASISCTSS QNIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQL LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYT FGGGTKVEIKR**TVAAP**DIVMTQSHKF MSTTVGDRVSITCKASQAVSSAVAW YQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPD RFTGSGSVTDFTLTIHNLQAEDLALY YCQQHYSTPFTFGSGTKLEIKR

Ejemplo 2.12: **Generación de TNF (seq. 3) y PGE2 DVD-Ig**

Tabla 25

SEQ ID Nº	**Nombre de dominio variable DVD**	**Nombre de dominio variable externo**	**Nombre de dominio variable interno**	**Secuencia** **12345678901234567890123456789012345**
98	**DVD1222 H**	AB214VH	AB048VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS GFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAE IRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDS KSAVYLQMTDLRTEDTGVYYCSRNYY GSTYDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTKYWLGWVRQAPGQGLEWMGDIYP GYDYTHYNEKFKDRVTLTTDTSTSTA YMELRSLRSDDTAVYYCARSDGSSTY WGQGTLVTVSS

99	**DVD1222 L**	AB214VL	AB048VL	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQ FVGSSIHWYQQRTNGSPRLLIKYASE SMSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINTVES EDIADYYCQESHSWPFTFGSGTNLEV KR**TVAAP**DVLMTQTPLSLPVTPGEPA SISCTSSQNIVHSNGNTYLEWYLQKP GQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVS HVPYTFGGGTKVEIKR
100	**DVD1223 H**	AB048VH	AB214VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTKYWLGWVRQAPGQGLEWMG DIYPGYDYTHYNEKFKDRVTLTTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDGS STYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVKLEE SGGGLVQPGGSMKLSCVASGFIFSNH WMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSKSIN SATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYL QMTDLRTEDTGVYYCSRNYYGSTYD YWGQGTTLTVSS
101	**DVD1223 L**	AB048VL	AB214VL	DVLMTQTPLSLPVTPGEPASISCTSSQ NIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGG GTKVEIKR**TVAAP**DILLTQSPAILSVSP GERVSFSCRASQFVGSSIHWYQQRT NGSPRLLIKYASESMSGIPSRFSGSGS GTDFTLSINTVESEDIADYYCQESHSW PFTFGSGTNLEVKR

Ejemplo 2.13: Generación de TNF (seq. 4) y PGE2 DVD-Ig

Tabla 26

SEQ ID Nº	Nombre de dominio variable DVD	Nombre de dominio variable externo	Nombre de dominio variable interno	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
102	**DVD1224H**	AB215VH	AB048VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYAMHWVRQAPGNGLEWVAF MSYDGSNKYAKDSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGI AAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**A** **STKGP**EVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTKYWLGWVRQAPGQGLE WMGDIYPGYDYTHYNEKFKDRVTLTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR SDGSSTYWGQGTLVTVSS
103	**DVD1224L**	AB215VL	AB048VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ SVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKV DIKR**TVAAP**DVLMTQTPLSLPVTPGEP ASISCTSSQNIVHSNGNTYLEWYLQKP GQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVS HVPYTFGGGTKVEIKR
104	**DVD1225H**	AB048VH	AB215VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTKYWLGWVRQAPGQGLEWMG DIYPGYDYTHYNEKFKDRVTLTTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDGS STYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLV ESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS YAMHWVRQAPGNGLEWVAFMSYDG SNKYAKDSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGG NYYYYGMDVWGQGTTVTVSS

105	**DVD1225 L**	AB048VL	AB215VL	DVLMTQTPLSLPVTPGEPASISCTSSQ NIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGG GTKVEIKR**TVAAP**EIVLTQSPATLSLSP GERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSN WPPFTFGPGTKVDIKR

Ejemplo 2.14: <u>Generación de TNF (seq. 5) y PGE2 DVD-Ig</u>

Tabla 27

SEQ ID Nº	**Nombre de dominio variable DVD**	**Nombre de dominio variable externo**	**Nombre de dominio variable interno**	**Secuencia 12345678901234567890123456789012345**
106	**DVD1246 H**	AB217VH	AB048VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAV IWSDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVESA MGGFYYNGMDVWGQGTTVTVSS**AS TKGP**EVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTKYWLGWVRQAPGQGLE WMGDIYPGYDYTHYNEKFKDRVTLTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR SDGSSTYWGQGTLVTVSS
107	**DVD1246 L**	AB217VL	AB048VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGIRIDLGWYQQKPGKAPKRLIYAAST LQSGVPSRFSGSGSGTEFIFTISSLQP EDFASYYCLQHKSYPLTFGGGTKVEIK R**TVAAP**DVLMTQTPLSLPVTPGEPASI SCTSSQNIVHSNGNTYLEWYLQKPGQ SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVSHVP YTFGGGTKVEIKR

108	**DVD1247 H**	AB048VH	AB217VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTKYWLGWVRQAPGQGLEWMG DIYPGYDYTHYNEKFKDRVTLTTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDGS STYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLV ESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS YDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWSDG SIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAREVESAMGGF YYNGMDVWGQGTTVTVSS
109	**DVD1247 L**	AB048VL	AB217VL	DVLMTQTPLSLPVTPGEPASISCTSSQ NIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGG GTKVEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRASQGIRIDLGWYQQKP GKAPKRLIYAASTLQSGVPSRFSGSG SGTEFIFTISSLQPEDFASYYCLQHKS YPLTFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.15: <u>Generación de TNF (seq. 6) y PGE2 DVD-Ig</u>

Tabla 28

SEQ ID Nº	**Nombre de dominio variable DVD**	**Nombre de dominio variable externo**	**Nombre de dominio variable interno**	**Secuencia** **12345678901234567890123456789012345**
110	**DVD1254 H**	AB218VH	AB048VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASG FTVSRNYMSWVRQAPGKGLEWVSVI YSGDRTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEGGF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQ SGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTKY WLGWVRQAPGQGLEWMGDIYPGYD YTHYNEKFKDRVTLTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARSDGSSTYWGQ GTLVTVSS

111	**DVD1254 L**	AB218VL	AB048VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIHGAS IRATGLPARFSGSGSGTEFTLTISSLQ SEDFAVYYCQQYNYWWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DVLMTQTPLSLPVTPGEPA SISCTSSQNIVHSNGNTYLEWYLQKP GQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVS HVPYTFGGGTKVEIKR
112	**DVD1255 H**	AB048VH	AB218VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTKYWLGWVRQAPGQGLEWMG DIYPGYDYTHYNEKFKDRVTLTTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDGS STYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLV ESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSR NYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGDR TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGEGGFDYWGQ GTLVTVSS
113	**DVD1255 L**	AB048VL	AB218VL	DVLMTQTPLSLPVTPGEPASISCTSSQ NIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGG GTKVEIKR**TVAAP**EIVMTQSPATLSVS PGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQK PGQAPRLLIHGASIRATGLPARFSGSG SGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNY WWTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.16: Generación de TNF (seq. 2) y LPA DVD-Ig

Tabla 29

SEQ ID Nº	Nombre de dominio variable DVD	Nombre de dominio variable externo	Nombre de dominio variable interno	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
114	**DVD1238H**	AB213VH	AB216VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSG FSLTDYGVNWVRQPPGKGLEWLGMI WGDGSTDYDSTLKSRLSISKDNSKSQ IFLKMNSLQTDDTARYYCAREWHHGP VAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLQ QSGAELVRPGTSVKVSCKASGYGFIN YLIEWIKQRPGQGLEWIGLINPGSDYT NYNENFKGKATLTADKSSSTAYMHLS SLTSEDSAVYFCARRFGYYGSGNYFD YWGQGTTLTVSS
115	**DVD1238L**	AB213VL	AB216VL	DIVMTQSHKFMSTTVGDRVSITCKAS QAVSSAVAWYQQKPGQSPKLLIYWA STRHTGVPDRFTGSGSVTDFTLTIHNL QAEDLALYYCQQHYSTPFTFGSGTKL EIKR**TVAAP**DVVMTQTPLSLPVSLGD QASISCTSGQSLVHINGNTYLHWYLQ KPGQSPKLLIYKVSNLFSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQST HFPFTFGTGTKLEIKR
116	**DVD1239H**	AB216VH	AB213VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKAS GYGFINYLIEWIKQRPGQGLEWIGLIN PGSDYTNYNENFKGKATLTADKSSST AYMHLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYG SGNYFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**Q VQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFS LTDYGVNWVRQPPGKGLEWLGMIWG DGSTDYDSTLKSRLSISKDNSKSQIFL KMNSLQTDDTARYYCAREWHHGPVA YWGQGTLVTVSA

117	**DVD1239 L**	AB216VL	AB213VL	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSG QSLVHINGNTYLHWYLQKPGQSPKLLI YKVSNLFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGTG TKLEIKR**TVAAP**DIVMTQSHKFMSTTV GDRVSITCKASQAVSSAVAWYQQKP GQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSG SVTDFTLTIHNLQAEDLALYYCQQHYS TPFTFGSGTKLEIKR

Ejemplo 2.17: **Generación de TNF (seq. 3) y LPA DVD-Ig**

Tabla 30

SEQ ID Nº	**Nombre de dominio variable DVD**	**Nombre de dominio variable externo**	**Nombre de dominio variable interno**	**Secuencia 12345678901234567890123456789012345**
118	**DVD1240 H**	AB214VH	AB216VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS GFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAE IRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDS KSAVYLQMTDLRTEDTGVYYCSRNYY GSTYDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**QV QLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGY GFINYLIEWIKQRPGQGLEWIGLINPG SDYTNYNENFKGKATLTADKSSSTAY MHLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYGSG NYFDYWGQGTTLTVSS
119	**DVD1240 L**	AB214VL	AB216VL	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQ FVGSSIHWYQQRTNGSPRLLIKYASE SMSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINTVES EDIADYYCQESHSWPFTFGSGTNLEV KR**TVAAP**DVVMTQTPLSLPVSLGDQA SISCTSGQSLVHINGNTYLHWYLQKP GQSPKLLIYKVSNLFSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTH FPFTFGTGTKLEIKR

120	**DVD1241 H**	AB216VH	AB214VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKAS GYGFINYLIEWIKQRPGQGLEWIGLIN PGSDYTNYNENFKGKATLTADKSSST AYMHLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYG SGNYFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**E VKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASG FIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAEI RSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSK SAVYLQMTDLRTEDTGVYYCSRNYYG STYDYWGQGTTLTVSS
121	**DVD1241 L**	AB216VL	AB214VL	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSG QSLVHINGNTYLHWYLQKPGQSPKLLI YKVSNLFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGTG TKLEIKR**TVAAP**DILLTQSPAILSVSPG ERVSFSCRASQFVGSSIHWYQQRTN GSPRLLIKYASESMSGIPSRFSGSGSG TDFTLSINTVESEDIADYYCQESHSWP FTFGSGTNLEVKR

Ejemplo 2.18: **Generación de TNF (seq. 4) y LPA DVD-Ig**

Tabla 31

SEQ ID Nº	**Nombre de dominio variable DVD**	**Nombre de dominio variable externo**	**Nombre de dominio variable interno**	**Secuencia** **12345678901234567890123456789012345**
122	**DVD1242 H**	AB215VH	AB216VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYAMHWVRQAPGNGLEWVAF MSYDGSNKYAKDSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGI AAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSS**A STKGP**QVQLQQSGAELVRPGTSVKV SCKASGYGFINYLIEWIKQRPGQGLE WIGLINPGSDYTNYNENFKGKATLTAD KSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARR FGYYGSGNYFDYWGQGTTLTVSS

123	**DVD1242 L**	AB215VL	AB216VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ SVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKV DIKR**TVAAP**DVVMTQTPLSLPVSLGD QASISCTSGQSLVHINGNTYLHWYLQ KPGQSPKLLIYKVSNLFSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQST HFPFTFGTGTKLEIKR
124	**DVD1243 H**	AB216VH	AB215VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKAS GYGFINYLIEWIKQRPGQGLEWIGLIN PGSDYTNYNENFKGKATLTADKSSST AYMHLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYG SGNYFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**Q VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSYAMHWVRQAPGNGLEWVAFM SYDGSNKYAKDSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIA AGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
125	**DVD1243 L**	AB216VL	AB215VL	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSG QSLVHINGNTYLHWYLQKPGQSPKLLI YKVSNLFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGTG TKLEIKR**TVAAP**EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNW PPFTFGPGTKVDIKR

Ejemplo 2.19: Generación de TNF (seq. 1) y LPA DVD-Ig

Tabla 32

SEQ ID Nº	Nombre de dominio variable DVD	Nombre de dominio variable externo	Nombre de dominio variable interno	Secuencia 1234567890123456789012345678901 2345
126	**DVD1244 H**	AB017VH	AB216VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS GFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSA ITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLS TASSLDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**Q VQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASG YGFINYLIEWIKQRPGQGLEWIGLINP GSDYTNYNENFKGKATLTADKSSSTA YMHLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYGS GNYFDYWGQGTTLTVSS
127	**DVD1244 L**	AB017VL	AB216VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAST LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEI KR**TVAAP**DVVMTQTPLSLPVSLGDQA SISCTSGQSLVHINGNTYLHWYLQKP GQSPKLLIYKVSNLFSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTH FPFTFGTGTKLEIKR
128	**DVD1245 H**	AB216VH	AB017VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKAS GYGFINYLIEWIKQRPGQGLEWIGLIN PGSDYTNYNENFKGKATLTADKSSST AYMHLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYG SGNYFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**E VQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGF TFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIT WNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLST ASSLDYWGQGTLVTVSS

129	**DVD1245 L**	AB216VL	AB017VL	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSG QSLVHINGNTYLHWYLQKPGQSPKLLI YKVSNLFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGTG TKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPG KAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAP YTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.20: Generación de TNF (seq. 5) y LPA DVD-Ig

Tabla 33

SEQ ID Nº	**Nombre de dominio variable DVD**	**Nombre de dominio variable externo**	**Nombre de dominio variable interno**	**Secuencia 12345678901234567890123456789012345**
130	**DVD1252 H**	AB217VH	AB216VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAV IWSDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVESA MGGFYYNGMDVWGQGTTVTVSS**AS TKGP**QVQLQQSGAELVRPGTSVKVS CKASGYGFINYLIEWIKQRPGQGLEWI GLINPGSDYTNYNENFKGKATLTADK SSSTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARRF GYYGSGNYFDYWGQGTTLTVSS
131	**DVD1252 L**	AB217VL	AB216VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGIRIDLGWYQQKPGKAPKRLIYAAST LQSGVPSRFSGSGSGTEFIFTISSLQP EDFASYYCLQHKSYPLTFGGGTKVEIK R**TVAAP**DVVMTQTPLSLPVSLGDQAS ISCTSGQSLVHINGNTYLHWYLQKPG QSPKLLIYKVSNLFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHF PFTFGTGTKLEIKR

132	**DVD1253H**	AB216VH	AB217VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKAS GYGFINYLIEWIKQRPGQGLEWIGLIN PGSDYTNYNENFKGKATLTADKSSST AYMHLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYG SGNYFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**Q VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVI WSDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVESA MGGFYYNGMDVWGQGTTVTVSS
133	**DVD1253L**	AB216VL	AB217VL	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSG QSLVHINGNTYLHWYLQKPGQSPKLLI YKVSNLFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGTG TKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQGIRIDLGWYQQKPG KAPKRLIYAASTLQSGVPSRFSGSGS GTEFIFTISSLQPEDFASYYCLQHKSY PLTFGGGTKVEIKR

Ejemplo 2.21: <u>Generación de TNF (seq. 6) y LPA DVD-Ig</u>

Tabla 34

SEQ ID N°	**Nombre de dominio variable DVD**	**Nombre de dominio variable externo**	**Nombre de dominio variable interno**	**Secuencia** **12345678901234567890123456789012345**
134	**DVD1260H**	AB218VH	AB216VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASG FTVSRNYMSWVRQAPGKGLEWVSVI YSGDRTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEGGF DYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQQ SGAELVRPGTSVKVSCKASGYGFINY LIEWIKQRPGQGLEWIGLINPGSDYTN YNENFKGKATLTADKSSSTAYMHLSS LTSEDSAVYFCARRFGYYGSGNYFDY WGQGTTLTVSS

135	**DVD1260L**	AB218VL	AB216VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIHGAS IRATGLPARFSGSGSGTEFTLTISSLQ SEDFAVYYCQQYNYWWTFGQGTKVE IKR**TVAAP**DVVMTQTPLSLPVSLGDQ ASISCTSGQSLVHINGNTYLHWYLQKP GQSPKLLIYKVSNLFSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTH FPFTFGTGTKLEIKR
136	**DVD1261H**	AB216VH	AB218VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKAS GYGFINYLIEWIKQRPGQGLEWIGLIN PGSDYTNYNENFKGKATLTADKSSST AYMHLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYG SGNYFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**E VQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGF TVSRNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIY SGDRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGEGGFD YWGQGTLVTVSS
137	**DVD1261L**	AB216VL	AB218VL	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCTSG QSLVHINGNTYLHWYLQKPGQSPKLLI YKVSNLFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGTG TKLEIKR**TVAAP**EIVMTQSPATLSVSP GERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKP GQAPRLLIHGASIRATGLPARFSGSGS GTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNY WWTFGQGTKVEIKR

Ejemplo 2.42: Secuencias del vector de clonación utilizadas para clonar el anticuerpo parental y las secuencias DVD-Ig

Tabla 35

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456 78901
138	V1	GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACAC ATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGCGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGGCCGCTCGAGG CCGGCAAGGCCGGATCCCCCGACCTCGACCTCTGG CTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTT GGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGG GAGGGCAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATC TCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGGACGAACT AAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCGGG GCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACT

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		123456789012345678901234567890123456789012345678901
		TGCCAACTGGGCCCTGTTCCACATGTGACACGGGGG
		GGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTG
		ACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACT
		GAGTGGCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGT
		GGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGTAACTCTT
		GGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTA
		CCTCCCAGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTAC
		ACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGTGTAGCTACCGA
		TAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTT
		ATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATAT
		GCTTCCCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACC
		CTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGAAGCATA
		TGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGA
		ACAGCGATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTT
		TATTTACATGGGGTCAGGATTCCACGAGGGTAGTGAA
		CCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG
		GAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCT
		TCTTCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCT
		GAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAGGTGCTCGA
		AAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTT
		GGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACA
		CCAATATAACCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATA
		CTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTTTAACAA
		TAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACT
		GGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAA
		CACATAATCCTAGTGCAATATGATACTGGGGTTATTA
		AGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACC
		ATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGA
		GTGGACGCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCT
		CTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCCACGCCA
		ATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTT
		TTTTGAAATTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCC
		CACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACTGTAAAATAAG
		GGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCA
		CTGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGG
		CACCCCGGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGG
		GCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAGGA
		CAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACA
		GGGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGA
		GCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTAGCATATAC
		TACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTA

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		123456789012345678901234567890123456789012345678901
		TATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGG
		GTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA
		TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATC
		CTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTA
		TATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGG
		GTAGCATATGCTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTAT
		ATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTACC
		CAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATC
		TGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAG
		CATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGC
		TATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAA
		TTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATC
		TGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAG
		TATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGC
		TATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTT
		GAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATA
		GGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCA
		GGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCT
		ATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
		CTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATA
		TTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGT
		GTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTC
		CTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
		AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTA
		CATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAG
		AGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCA
		CTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCG
		TGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCAT
		ACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCA
		GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA
		GAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAA
		CACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGG
		ACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGG
		GGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGA
		GCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACAC
		CACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA
		ACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGG
		CAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTG
		CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCT
		GGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG
		GGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATG

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		GTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGG
		GGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGA
		TCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA
		ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
		ATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTG
		AAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA
		ACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA
		GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCT
		GCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCG
		CTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTA
		CCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAG
		CGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTA
		GTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCT
		ACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTG
		CTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGG
		ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT
		CGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGC
		TTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTA
		CAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAA
		GGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG
		GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG
		GGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTT
		TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGC
		TCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAG
		CAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGG
		CCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGA
		TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCT
		GATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAG
		CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAA
		TACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTC
		ATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGA
		AAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTT
		AGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTAT
		GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
		ATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGAT
		TACGCCAAGCTCTAGCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCC
		AGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAG
		TCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATC
		CCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCG
		CCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGC
		CGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTA

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos 123456789012345678901234567890123456789012345678901
		GTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAA
		AAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAG
		GAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGAAA
		GGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGC
		AGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG
		GGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAA
		GGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGT
		ACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC
		CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTT
		TCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGC
		CGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG
		TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGG
		CTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTG
		GAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAG
		GAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGC
		CTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGG
		CACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTC
		TAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT
		TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAA
		GATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCG
		GGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATG
		TTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGA
		GAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCT
		GCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCC
		CCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACC
		AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCC
		TGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCT
		CGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGG
		AAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGT
		GACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCT
		CGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTA
		GGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCC
		CACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCT
		TGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT
		TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACA
		GTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTG
		AGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGACCTCGAGATCCAT
		TGTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCT
		GGCTTTTTCTTGTCGCGATTTTAAAAGGTGTCCAGTG
		C
139	V2	ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123456 78901
		CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGT
		GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
		GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT
		AACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG
		GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTG
		AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC
		TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
		ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGAGCGGCC
		GCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGACCTCG
		ACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAAT
		AGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGG
		ACATATGGGAGGGCAAATCATTTGGTCGAGATCCCTC
		GGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGG
		ACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCT
		TCGCGGGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTG
		GTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCACATGTGAC
		ACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACT
		GTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGC
		CAACACTGAGTGGCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGC
		AGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGT
		AACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGG
		ACATGTACCTCCCAGGGGCCCAGGAAGACTACGGGA
		GGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGTGTAGC
		TACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAAT
		AGTGTTTATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGT
		AGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGTATATACTATCCAG
		ACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGG
		AAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTC
		CTAAGGAACAGCGATATCTCCCACCCCATGAGCTGT
		CACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGATTCCACGAGG
		GTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAA
		GATCAAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTC
		GCCTGCTTCTTCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAAT
		AACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAGGT
		GCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAAT
		AAAATTTGGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGC
		TATGACACCAATATAACCCTCACAAACCCCTTGGGCA
		ATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCT
		TTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGT
		AAAGACTGGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTA
		TGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATACTGGG

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		GTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAG
		GTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGG
		AAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGCGGACTCCACT
		GGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTC
		CACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCC
		ACTCTTTTTTTTGAAATTGTGGAGTGGGGGCACGCGT
		CAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACTGTA
		AAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCG
		CTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCA
		CTAATGGCACCCCGGGGAATACCTGCATAAGTAGGT
		GGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATC
		TGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCC
		AAGCACAGGGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAGGTC
		GCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTAG
		CATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC
		TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTAT
		ATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGG
		TAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAG
		GCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCT
		AATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTA
		TCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAGAGATTAGGGT
		AGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATA
		CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCT
		ATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGG
		GTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT
		ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATC
		CTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTA
		TATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGG
		GTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCAT
		ATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTT
		TCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTT
		TATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACG
		TCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACC
		CCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
		CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAAT
		AATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTC
		CGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCC
		TTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGT
		AAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGG
		TTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTT
		GAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGA

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789 01
		GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATC
		CCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCC
		GCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC
		ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC
		AGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGT
		GATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCG
		GAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACAT
		GGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACC
		GGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGA
		CACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG
		CAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCC
		CGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAA
		GTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCT
		GGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAG
		CGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCA
		GATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGA
		CGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGAC
		AGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTG
		GTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGA
		TTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAG
		GTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCC
		TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCC
		GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTT
		TCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCA
		CCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAG
		CTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCA
		GAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCC
		GTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCG
		CCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGG
		CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGT
		TGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGC
		GGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCC
		AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
		CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCC
		GAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG
		CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTC
		CAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCG
		GGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTG
		ATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC
		CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGC
		TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCC

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		123456789012345678901234567890123456789012345678901
		CTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG
		AGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGC
		GCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
		CCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCG
		ATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACT
		GGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGA
		GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTT
		TATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
		GGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATG
		ATTACGCCAAGCTCTAGCTAGAGGTCGAGTCCCTCC
		CCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT
		AGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCA
		TCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTC
		CGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAG
		GCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAG
		TAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCA
		AAAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAG
		AGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGA
		AAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGG
		GCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTG
		GGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAG
		AAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGT
		GTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGA
		ACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTT
		TTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGT
		GCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACG
		GGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCT
		GGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGG
		TTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTT
		AAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCT
		GGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGG
		TGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGT
		CTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGAC
		GCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGC
		CAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCG
		CGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACA
		TGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACC
		GAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGC
		CTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCG
		CCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCA
		CCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGC

SEQ ID N°	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos 1234567890123456789012345678901234567890123456 78901
		CCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCG
		CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAA
		GGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCAT
		GTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCAC
		CTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTT
		TAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTC
		CCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG
		CTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTT
		TTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGA
		CAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCG
		TGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGACCTCGAGATCC
		ATTGTGCCCGGGCGCACCATGGACATGCGCGTGCCC
		GCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCC
		GGCTCGCGATGC
140	V3	CAACCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCG
		CCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACA
		CTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCC
		GTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTC
		AAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAA
		AGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGC
		CTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTAC
		AGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGA
		GAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCATGAGCGGC
		CGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGACCTC
		GACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAA
		TAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAG
		GACATATGGGAGGGCAAATCATTTGGTCGAGATCCC
		TCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCC
		GGACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTT
		CTTCGCGGGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTT
		GGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCACATGTG
		ACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGA
		CTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTT
		GCCAACACTGAGTGGCTTTCATCCTGGAGCAGACTTT
		GCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGT
		GTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGG
		GACATGTACCTCCCAGGGGCCCAGGAAGACTACGGG
		AGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGTGTAG
		CTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAA
		TAGTGTTTATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGG
		TAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGTATATACTATCCA

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789 01
		GACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGG
		GAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGT
		CCTAAGGAACAGCGATATCTCCCACCCCATGAGCTG
		TCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGATTCCACGAG
		GGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTG
		AAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCT
		TCGCCTGCTTCTTCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGA
		ATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG
		GTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGA
		ATAAAATTTGGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGT
		GCTATGACACCAATATAACCCTCACAAACCCCTTGGG
		CAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATAT
		CTTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCC
		GTAAAGACTGGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGC
		TATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATACTG
		GGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGAC
		AGGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGG
		GGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGCGGACTCCA
		CTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGC
		TCCACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGG
		CCACTCTTTTTTTTGAAATTGTGGAGTGGGGGCACGC
		GTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACTG
		TAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCC
		CGCTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAA
		CCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTGCATAAGTA
		GGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCG
		ATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGC
		GCCAAGCACAGGGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAG
		GTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGG
		TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTA
		TCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAAT
		CTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT
		GGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGC
		ATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCT
		ATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT
		CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAGAGATT
		AGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAG
		CATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC
		TAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTAT
		ATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGG
		TAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATAT

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		1234567890123456789012345678901234567890123456
		7890 1
		GCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCC
		TAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTAT
		ATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGG
		TAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATG
		AGAATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGC
		CTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTC
		TTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCG
		CGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAA
		ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAT
		GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATT
		CAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGG
		CATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCT
		GGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC
		ACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
		TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTT
		CCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCG
		CGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAAC
		TCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
		TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGAT
		GGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAA
		CCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGAC
		AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTT
		GCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCG
		TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGA
		CGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAAC
		AACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACT
		CTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG
		GCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCC
		CTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAG
		CCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCAC
		TGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTA
		TCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAC
		GAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGAT
		TAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATA
		TACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAA
		GGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC
		CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCG
		TCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAG
		ATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACA
		AAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCG
		GATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTG

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		GCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCT
		AGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCT
		GTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGT
		TACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTC
		TTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA
		GGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCA
		CACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAC
		TGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCA
		CGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCG
		GTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAG
		GGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAG
		TCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCG
		ATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATG
		GAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCT
		GGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCT
		GCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCG
		CCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAA
		CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCG
		GAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCG
		CGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGG
		TTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCA
		ATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGG
		CTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGG
		AATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGC
		TATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCTAGAGGTCG
		AGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATG
		CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAA
		CTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCG
		CCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATT
		TATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTA
		TTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTA
		GGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTT
		TTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTC
		TAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCC
		CGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCC
		GAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGG
		TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAA
		GTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGG
		GTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCG
		TGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAAC
		ACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGG

SEQ ID N°	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123456
		CCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATT
		ACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCG
		AGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGG
		CCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGA
		GTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGT
		GCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGC
		TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGAC
		CTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGT
		AAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTT
		TTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTC
		CCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAG
		CGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAA
		GCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCC
		GCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGG
		CCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGG
		CCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGG
		AGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTC
		ACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGC
		CGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCC
		GTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGT
		ACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCG
		ATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAA
		GTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGG
		AATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTC
		AAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATT
		TCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGAC
		CTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGACTT
		GGACCCCACTCCTCTTCCTCACCCTCCTCCTCCACTG
		CACAGGAAGCTTATCG
141	V4	ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
		CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGT
		GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
		GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT
		AACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG
		GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTG
		AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC
		TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
		ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGAGCGGCC
		GCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGACCTCG
		ACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAAT
		AGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGG

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		123456789012345678901234567890123456789012345678901
		ACATATGGGAGGGCAAATCATTTGGTCGAGATCCCTC
		GGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGG
		ACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCT
		TCGCGGGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTG
		GTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCACATGTGAC
		ACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACT
		GTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGC
		CAACACTGAGTGGCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGC
		AGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGT
		AACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGG
		ACATGTACCTCCCAGGGGCCCAGGAAGACTACGGGA
		GGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGTGTAGC
		TACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAAT
		AGTGTTTATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGT
		AGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGTATATACTATCCAG
		ACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGG
		AAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTC
		CTAAGGAACAGCGATATCTCCCACCCCATGAGCTGT
		CACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGATTCCACGAGG
		GTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAA
		GATCAAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTC
		GCCTGCTTCTTCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAAT
		AACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAGGT
		GCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAAT
		AAAATTTGGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGC
		TATGACACCAATATAACCCTCACAAACCCCTTGGGCA
		ATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCT
		TTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGT
		AAAGACTGGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTA
		TGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATACTGGG
		GTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAG
		GTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGG
		AAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGCGGACTCCACT
		GGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTC
		CACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCC
		ACTCTTTTTTTTGAAATTGTGGAGTGGGGGCACGCGT
		CAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACTGTA
		AAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCG
		CTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCA
		CTAATGGCACCCCGGGGAATACCTGCATAAGTAGGT
		GGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATC

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		123456789012345678901234567890123456789012345678901
		TGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCC
		AAGCACAGGGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAGGTC
		GCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTAG
		CATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC
		TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTAT
		ATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGG
		TAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAG
		GCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCT
		AATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTA
		TCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAGAGATTAGGGT
		AGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATA
		CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCT
		ATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGG
		GTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT
		ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATC
		CTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTA
		TATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGG
		GTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCAT
		ATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTT
		TCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTT
		TATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACG
		TCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACC
		CCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
		CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAAT
		AATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTC
		CGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCC
		TTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGT
		AAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGG
		TTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTT
		GAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGA
		GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATC
		CCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCC
		GCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC
		ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC
		AGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGT
		GATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCG
		GAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACAT
		GGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACC
		GGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGA
		CACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG
		CAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCC

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		123456789012345678901234567890123456789012345678901
		CGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAA
		GTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCT
		GGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAG
		CGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCA
		GATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGA
		CGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGAC
		AGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTG
		GTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGA
		TTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAG
		GTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCC
		TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCC
		GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTT
		TCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCA
		CCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAG
		CTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCA
		GAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCC
		GTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCG
		CCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGG
		CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGT
		TGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGC
		GGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCC
		AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
		CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCC
		GAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG
		CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTC
		CAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCG
		GGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTG
		ATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC
		CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGC
		TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCC
		CTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG
		AGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGC
		GCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
		CCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCG
		ATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACT
		GGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGA
		GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTT
		TATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
		GGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATG
		ATTACGCCAAGCTCTAGCTAGAGGTCGAGTCCCTCC
		CCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		AGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCA
		TCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTC
		CGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAG
		GCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAG
		TAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCA
		AAAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAG
		AGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGA
		AAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGG
		GCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTG
		GGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAG
		AAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGT
		GTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGA
		ACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTT
		TTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGT
		GCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACG
		GGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCT
		GGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGG
		TTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTT
		AAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCT
		GGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGG
		TGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGT
		CTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGAC
		GCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGC
		CAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCG
		CGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACA
		TGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACC
		GAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGC
		CTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCG
		CCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCA
		CCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGC
		CCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCG
		CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAA
		GGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCAT
		GTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCAC
		CTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTT
		TAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTC
		CCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG
		CTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTT
		TTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGA
		CAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCG
		TGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGACCTCGAGATCC

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456 78901
		ATTGTGCCCGGGCGCACCATGACTTGGACCCCACTC CTCTTCCTCACCCTCCTCCTCCACTGCACAGGAAGCT TATCG
142	V5	CAACCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCG CCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACA CTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCC GTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTC AAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAA AGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGC CTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTAC AGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGA GAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCATGAGCGGC CGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGACCTC GACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAA TAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAG GACATATGGGAGGGCAAATCATTTGGTCGAGATCCC TCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCC GGACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTT CTTCGCGGGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTT GGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCACATGTG ACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGA CTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTT GCCAACACTGAGTGGCTTTCATCCTGGAGCAGACTTT GCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGT GTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGG GACATGTACCTCCCAGGGGCCCAGGAAGACTACGGG AGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGTGTAG CTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAA TAGTGTTTATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGG TAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGTATATACTATCCA GACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGG GAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGT CCTAAGGAACAGCGATATCTCCCACCCCATGAGCTG TCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGATTCCACGAG GGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTG AAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCT TCGCCTGCTTCTTCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGA ATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG GTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGA ATAAAATTTGGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGT GCTATGACACCAATATAACCCTCACAAACCCCTTGGG

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		123456789012345678901234567890123456789012345678901
		CAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATAT
		CTTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCC
		GTAAAGACTGGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGC
		TATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATACTG
		GGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGAC
		AGGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGG
		GGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGCGGACTCCA
		CTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGC
		TCCACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGG
		CCACTCTTTTTTTTGAAATTGTGGAGTGGGGGCACGC
		GTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACTG
		TAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCC
		CGCTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAA
		CCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTGCATAAGTA
		GGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCG
		ATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGC
		GCCAAGCACAGGGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAG
		GTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGG
		TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTA
		TCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAAT
		CTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT
		GGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGC
		ATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCT
		ATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT
		CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAGAGATT
		AGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAG
		CATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC
		TAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTAT
		ATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGG
		TAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATAT
		GCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCC
		TAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTAT
		ATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGG
		TAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATG
		AGAATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGC
		CTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTC
		TTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCG
		CGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAA
		ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAT
		GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATT
		CAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGG

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		CATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCT
		GGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC
		ACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
		TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTT
		CCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCG
		CGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAAC
		TCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
		TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGAT
		GGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAA
		CCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGAC
		AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTT
		GCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCG
		TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGA
		CGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAAC
		AACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACT
		CTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG
		GCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCC
		CTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAG
		CCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCAC
		TGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTA
		TCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAC
		GAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGAT
		TAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATA
		TACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAA
		GGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC
		CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCG
		TCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAG
		ATCCTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACA
		AAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCG
		GATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTG
		GCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCT
		AGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCT
		GTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGT
		TACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTC
		TTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA
		GGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCA
		CACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAC
		TGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCA
		CGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCG
		GTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAG
		GGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAG

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		TCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCG
		ATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATG
		GAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCT
		GGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCT
		GCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCG
		CCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAA
		CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCG
		GAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCG
		CGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGG
		TTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCA
		ATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGG
		CTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGG
		AATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGC
		TATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCTAGAGGTCG
		AGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATG
		CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAA
		CTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCG
		CCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATT
		TATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTA
		TTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTA
		GGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTT
		TTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTC
		TAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCC
		CGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCC
		GAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGG
		TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAA
		GTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGG
		GTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCG
		TGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAAC
		ACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGG
		CCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATT
		ACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCG
		AGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGG
		CCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGA
		GTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGT
		GCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGC
		TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGAC
		CTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGT
		AAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTT
		TTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTC
		CCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAG

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456 78901
143	V7	CGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAA GCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCC GCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGG CCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGG CCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGG AGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTC ACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGC CGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCC GTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGT ACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCG ATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAA GTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGG AATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTC AAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATT TCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGAC CTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGACA TGCGCGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTG CTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGC GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACAC ATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGG GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGCGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
		TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
		TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
		CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC
		CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGGCCGCTCGA
		GGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGACCTCGACCTCT
		GGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTG
		TTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATAT
		GGGAGGGCAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGA
		TCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGGACGAA
		CTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCG
		GGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAA
		CTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCACATGTGACACGGG
		GGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGT
		TGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACA
		CTGAGTGGCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGCAGTCT
		GTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGTAACTC
		TTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATG
		TACCTCCCAGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTA
		CACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGTGTAGCTACCG
		ATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTT
		TATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATA
		TGCTTCCCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAAC
		CCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGAAGCAT
		ATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGG
		AACAGCGATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTT
		TTATTTACATGGGGTCAGGATTCCACGAGGGTAGTGA
		ACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG
		GAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCT
		TCTTCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCT
		GAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAGGTGCTCGA
		AAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTT
		GGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACA
		CCAATATAACCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATA
		CTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTTTAACAA
		TAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACT
		GGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAA
		CACATAATCCTAGTGCAATATGATACTGGGGTTATTA
		AGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACC
		ATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGA
		GTGGACGCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCT

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		CTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCCACGCCA
		ATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTT
		TTTTGAAATTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCC
		CACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACTGTAAAATAAG
		GGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCA
		CTGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGG
		CACCCCGGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGG
		GCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAGGA
		CAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACA
		GGGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGA
		GCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTAGCATATAC
		TACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTA
		TATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGG
		GTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA
		TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATC
		CTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTA
		TATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGG
		GTAGCATATGCTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTAT
		ATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTACC
		CAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATC
		TGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAG
		CATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGC
		TATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAA
		TTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATC
		TGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAG
		TATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGC
		TATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTT
		GAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATA
		GGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCA
		GGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCT
		ATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
		CTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATA
		TTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGT
		GTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTC
		CTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
		AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTA
		CATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAG
		AGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCA
		CTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCG
		TGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCAT
		ACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCA

SEQ ID N°	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		123456789012345678901234567890123456789012345678901
		GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA
		GAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAA
		CACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGG
		ACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGG
		GGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGA
		GCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACAC
		CACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA
		ACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGG
		CAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTG
		CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCT
		GGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG
		GGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATG
		GTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGG
		GGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGA
		TCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA
		ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
		ATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTG
		AAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA
		ACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA
		GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCT
		GCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCG
		CTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTA
		CCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAG
		CGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTA
		GTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCT
		ACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTG
		CTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGG
		ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT
		CGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGC
		TTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTA
		CAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAA
		GGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG
		GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG
		GGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTT
		TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGC
		TCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAG
		CAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGG
		CCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGA
		TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCT
		GATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAG
		CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAA

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		123456789012345678901234567890123456789012345678901
		TACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTC
		ATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGA
		AAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTT
		AGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTAT
		GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
		ATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGAT
		TACGCCAAGCTCTAGCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCC
		AGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAG
		TCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATC
		CCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCG
		CCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGC
		CGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTA
		GTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAA
		AAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAG
		GAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGAAA
		GGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGC
		AGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG
		GGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAA
		GGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGT
		ACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC
		CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTT
		TCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGC
		CGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG
		TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGG
		CTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTG
		GAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAG
		GAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGC
		CTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGG
		CACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTC
		TAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT
		TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAA
		GATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCG
		GGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATG
		TTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGA
		GAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCT
		GCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCC
		CCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACC
		AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCC
		TGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCT
		CGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGG
		AAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGT

SEQ ID Nº	Nombre del vector	Secuencias de nucléotidos
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789 01 GACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCT CGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTA GGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCC CACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCT TGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACA GTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTG AGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGACCTCGAGATCCAT TGTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCT GGCTTTTTCTTGTCGCGATTTTAAAAGGTGTCCAGTG C

La presente invención incorpora por referencia la totalidad de las técnicas conocidas en el arte de la biología molecular y administración de drogas.. Entre estas técnicas incluyen, no taxativamente, aquéllas descritas en las siguientes publicaciones:

Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &Sons, NY (1993);

Ausubel, F.M. et al. eds., 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 y Ball (eds.), Wiley, New York (1984);

Giege, O. y Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999);

Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984);

Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981;

Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);

Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991);

Kabat, E.A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health y Human Services, NIH Publication No. 91-3242;

Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

Kriegler, Gene Transfer y Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);

Lu y Weiner eds., Cloning y Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).

Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);

Old, O.W. & S.B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).

Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).

Sustained y Controlled Release Drug Delivery Systems, J.O. 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

Los contenidos de todas las referencias citadas (incluyendo referencias de la literatura, patentes, solicitudes de patente, y sitios de la red) que puedan citarse a lo largo de esta solicitud se incorporan expresamente en la presente por referencia en su totalidad para cualquier propósito, como lo son las referencias citadas en la misma. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular y biología celular, que son bien conocidas en el arte

Equivalencias

La presente invención puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse de su espíritu o características esenciales. Las realizaciones precedentes están para ser consecuentemente consideradas ilustrativas en todos los aspectos más que para limitar a la invención descripta en la presente solicitud. El alcance de la invención se indica de esa manera por las reinvindicaciones anexadas más que por la descripción precedente, y todos los cambios que se originen dentro del significado y el rango de equivalencia de las reinvindicaciones se pretende por lo tanto que sean abarcados en la presente solicitud.

REIVINDICACIONES:

1. Una proteína de unión, CARACTERIZADA PORQUE comprende una cadena de polipéptidos, en donde dicha cadena de polipéptidos comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde;

VD1 es un primer dominio variable de la cadena pesada;

VD2 es un segundo dominio variable de la cadena pesada;

C es un dominio constante de la cadena pesada;

X1 es un conector con la condición que no sea CH1;

X2 es una región Fc; y

n es 0 o 1;

en donde la proteína de unión tiene la capacidad de unirse a un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste deTNF (seq. 2) y NGF; TNF (seq. 3) y NGF; TNF (seq. 4) y NGF; TNF (seq. 5) y NGF; TNF (seq. 6) y NGF; TNF (seq. 2) y SOST; TNF (seq. 3) y SOST; TNF (seq. 4) y SOST; TNF (seq. 5) y SOST; TNF (seq. 6) y SOST; TNF (seq. 2) y PGE2; TNF (seq. 3) y PGE2; TNF (seq. 4) y PGE2; TNF (seq. 5) y PGE2; TNF (seq. 6) y PGE2; TNF (seq. 1) y LPA; TNF (seq. 2) y LPA; TNF (seq. 3) y LPA; TNF (seq. 4) y LPA; TNF (seq. 5) y LPA; y TNF (seq. 6) y LPA.

2. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID N°:28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 y 44.

3. Una proteína de unión que comprende una cadena de polipéptidos, CARACTERIZADA PORQUE dicha cadena de polipéptidos comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde;

VD1 es un primer dominio variable de la cadena liviana;

VD2 es un segundo dominio variable de la cadena liviana;

C es un dominio constante de la cadena liviana;

X1 es un conector con la condición que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es 0 o 1;

en donde la proteína de unión tiene la capacidad de unirse a un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste deTNF (seq. 2) y NGF; TNF (seq. 3) y NGF; TNF (seq. 4) y NGF; TNF (seq. 5) y NGF; TNF (seq. 6) y NGF; TNF (seq. 2) y SOST; TNF (seq. 3) y SOST; TNF (seq. 4) y SOST; TNF (seq. 5) y SOST; TNF (seq. 6) y SOST; TNF (seq. 2) y PGE2; TNF (seq. 3) y PGE2; TNF (seq. 4) y PGE2; TNF (seq. 5) y PGE2; TNF (seq. 6) y PGE2; TNF (seq. 1) y LPA; TNF (seq. 2) y LPA; TNF (seq. 3) y LPA; TNF (seq. 4) y LPA; TNF (seq. 5) y LPA; y TNF (seq. 6) y LPA.

4. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 3, CARACTERIZADA PORQUE los dominios variables de la cadena liviana VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID N°:29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 y 45.

5. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1 ó 3, CARACTERIZADA PORQUE n es 0.

6. Una proteína de unión que comprende una primera y segunda cadena de polipéptidos, CARACTERIZADA PORQUE,

dicha primera cadena de polipéptidos comprende un primer VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de la cadena pesada ;

VD2 es un segundo dominio variable de la cadena pesada ;

C es un dominio constante de la cadena pesada;

X1 es un conector con la condición que no sea CH1;

X2 es una región Fc; y

en donde dicha segunda cadena de polipéptidos comprende un segundo VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de la cadena liviana ;

VD2 es un segundo dominio variable de la cadena liviana ;

C es un dominio constante de la cadena liviana;

X1 es un conector con la condición que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es 0 o 1;

en donde la proteína de unión tiene la capacidad de unirse a par de antígenos seleccionado del grupo que consiste deTNF (seq. 2) y NGF; TNF (seq. 3) y NGF; TNF (seq. 4) y NGF; TNF (seq. 5) y NGF; TNF (seq. 6) y NGF; TNF (seq. 2) y SOST; TNF (seq. 3) y SOST; TNF (seq. 4) y SOST; TNF (seq. 5) y SOST; TNF (seq. 6) y SOST; TNF (seq. 2) y PGE2; TNF (seq. 3) y PGE2; TNF (seq. 4) y PGE2; TNF (seq. 5) y PGE2; TNF (seq. 6) y PGE2; TNF (seq. 1) y LPA; TNF (seq. 2) y LPA; TNF (seq. 3) y LPA; TNF (seq. 4) y LPA; TNF (seq. 5) y LPA; y TNF (seq. 6) y LPA.

7. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 6, CARACTERIZADA PORQUE los dominios variables de la cadena pesada VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID N°:28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 y 44 y en donde los dominios variables VD1 y VD2 de la cadena liviana comprenden una secuencia

de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID N°:29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 y 45.

8. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, 3 ó 6, CARACTERIZADA PORQUE X1 o X2 es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID N°: 1-26.

9. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 6, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión comprende dos primeras cadenas de polipéptidos y dos segundas cadenas de polipéptidos.

10. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, 3 ó 6, CARACTERIZADA PORQUE la región Fc se selecciona del grupo que consiste de una región Fc de secuencia nativa y una región Fc de secuencia variante.

11. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADA PORQUE la región Fc se selecciona del grupo que consiste de una región Fc de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE e IgD.

12. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, 3 ó 6, CARACTERIZADA PORQUE dicho VD1 de la primera cadena de polipéptidos y dicho VD1 de la segunda cadena de polipéptidos se obtienen del mismo primer y segundo anticuerpo parental, respectivamente, o porción de unión al antígeno del mismo.

13. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, 3 ó 6, CARACTERIZADA PORQUE dicho VD1 de la primera cadena de polipéptidos y dicho VD1 de la segunda cadena de polipéptidos se obtienen de un primer y segundo anticuerpo parental distinto, respectivamente, o una porción de unión al antígeno de los mismos.

14. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, 3 ó 6,

CARACTERIZADA PORQUE dicho VD2 de la primera cadena de polipéptidos y dicho VD2 de la segunda cadena de polipéptidos se obtienen del mismo primer y segundo anticuerpo parental, respectivamente, o porción de unión al antígeno del mismo.

15. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, 3 ó 6, CARACTERIZADA PORQUE dicho VD2 de la primera cadena de polipéptidos y dicho VD2 de la segunda cadena de polipéptidos se obtienen de un primer y segundo anticuerpo parental distinto, respectivamente, o de una porción de unión al antígeno de los mismos.

16. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, CARACTERIZADA PORQUE dicho primer y dicho segundo anticuerpos parentales se unen a diferentes epitopes sobre dicho antígeno.

17. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, CARACTERIZADA PORQUE dicho primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, se une a dicho primer antígeno con una potencia diferente de la potencia con que dicho segundo anticuerpo parental, o porción de unión al antígeno del mismo, se une a dicho segundo antígeno.

18. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, CARACTERIZADA PORQUE dicho primer anticuerpo parental o porción de unión al antígeno del mismo, se une a dicho primer antígeno con una afinidad diferente de la afinidad con que dicho segundo anticuerpo parental, o porción de unión al antígeno del mismo, se une a dicho segundo antígeno.

19. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, CARACTERIZADA PORQUE dicho primer anticuerpo parental, o porción de unión al antígeno del mismo, y dicho segundo anticuerpo parental, o porción de unión al antígeno del mismo, se seleccionan del grupo que consiste de un anticuerpo humano, un anticuerpo con injerto de CDR y un anticuerpo humanizado.

20. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, CARACTERIZADA PORQUE dicho primer anticuerpo parental, o porción de unión al antígeno del mismo, y dicho segundo anticuerpo parental, o porción de unión al antígeno del mismo, se seleccionan del grupo que consiste de un fragmento Fab; un fragmento $F(ab')_2$; un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb; una región determinante de complementariedad (CDR) aislada; un anticuerpo de una sola cadena; y un *diabody*.

21. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, 3 ó 6, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión posee al menos una propiedad deseada exhibida por dicho primer anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, o dicho segundo anticuerpo parental o una porción de unión al antígeno del mismo.

22. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 21, CARACTERIZADA PORQUE dicha propiedad deseada se selecciona entre uno más parámetros de anticuerpo.

23. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 21,

CARACTERIZADA PORQUE dichos parámetros de anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de especificidad del antígeno, afinidad por el antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento del epitope, estabilidad, solubilidad, eficacia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada con tejidos y unión al antígeno ortóloga.

24. Una proteína de unión capaz de unir dos antígenos, CARACTERIZADA PORQUE comprende cuatro cadenas de polipéptidos, en donde dos cadenas de polipéptidos comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de la cadena pesada ;

VD2 es un segundo dominio variable de la cadena pesada ;

C es un dominio constante de la cadena pesada;

X1 es un conector con la condición que no sea CH1;

X2 es una región Fc; y

en donde las dos cadenas de polipéptidos comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de la cadena liviana ;

VD2 es un segundo dominio variable de la cadena liviana ;

C es un dominio constante de la cadena liviana;

X1 es un conector con la condición que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es 0 o 1;

en donde los dominios variables VD1 y VD2 de la cadena pesada VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID N°:28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 y 44 y en donde los

diminios VD1 y VD2 de la cadena liviana comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID N°s:. 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 y 45.

25. Una proteína de unión capaz de unirse a dos antígenos CARACTERIZADA PORQUE comprende cuatro cadenas de polipéptidos, en donde dos cadenas de polipéptidos comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio de la cadena variable pesada;

VD2 es un segundo dominio variable de la cadena pesada ;

C es un dominio constante de la cadena pesada;

X1 es un conector con la condición que no sea CH1;

X2 es una región Fc; y

n es 0 o 1; y

en donde dos cadenas de polipéptidos comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de la cadena liviana ;

VD2 es un segundo dominio variable de la cadena liviana ;

C es un dominio constante de la cadena liviana;

X1 es un conector con la condición que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es 0 o 1;

en donde la DVD-Ig se une a al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en TNF (seq. 2); TNF (seq. 3); TNF (seq. 4); TNF (seq. 5); TNF (seq. 6); NGF; SOST; PGE2; y LPA.

26. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, 3, 6, 24 ó 25,

CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión tiene una constante de asociación (K_{on}) con dichos uno más blancos seleccionada del grupo formado por al menos aproximadamente $10^2M^{-1}s^{-1}$ aproximadamente; al menos $10^3M^{-1}s^{-1}$ aproximadamente; al menos $10^4M^{-1}s^{-1}$ aproximadamente; al menos $10^5M^{-1}s^{-1}$ aproximadamente; y al menos $10^6M^{-1}s^{-1}$ aproximadamente, medida por resonancia de plasmón superficial.

27. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, 6, 24 ó 25, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión tiene una constante de disociación (K_{off}) de dichos uno más blancos seleccionada del grupo que consiste de: a lo sumo $10^{-3}s^{-1}$ aproximadamente; a lo sumo $10^{-4}s^{-1}$ aproximadamente; a lo sumo $10^{-5}s^{-1}$ aproximadamente; y a lo sumo $10^{-6}s^{-1}$ aproximadamente, medida por resonancia de plasmón superficial.

28. La proteína de unión de la reivindicación 1, 3, 6, 24 ó 25, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) de dichos uno más blancos seleccionada del grupo que consiste de: a lo sumo $10^{-7}M$ aproximadamente; a lo sumo $10^{-8}M$ aproximadamente; a lo sumo $10^{-9}M$ aproximadamente; a lo sumo $10^{-10}M$ aproximadamente; a lo sumo $10^{-11}M$ aproximadamente; a lo sumo $10^{-12}M$ aproximadamente; y a lo sumo $10^{-13}M$.

29. Un conjugado de una proteína de unión, CARACTERIZADO PORQUE comprende una proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 6, 24 ó 25, donde dicho conjugado de proteína de unión comprende además un agente seleccionado del grupo que consiste de; una molécula de inmunoadhesión, un agente para obtener imágenes, un agente terapéutico y un agente citotóxico.

30. El conjugado de proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE dicho agente es un agente para obtener imágenes que se selecciona del grupo formado por una marca radioactiva, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética y biotina.

31. El conjugado de proteína de unión de la reivindicación 30, CARACTERIZADO PORQUE dicho agente para el diagnóstico por imágenes es una radiomarca 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.

32. El conjugado de proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 30, CARACTERIZADO PORQUE dicho agente es un agente terapéutico citotóxico que se selecciona del grupo formado por: un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, una toxina y un agente apoptótico.

33. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, 3, 6, 24 ó 25, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión es una proteína de unión cristalizada.

34. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 33, CARACTERIZADA PORQUE dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada sin vehículo.

35. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 33, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión tiene una mayor vida media *in vivo* que la contraparte soluble de dicha proteína de unión.

36. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 33,

CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión retiene su actividad biológica.

37. Un ácido nucleico aislado, CARACTERIZADO PORQUE codifica una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 6, 24 ó 25.

38. Un vector, CARACTERIZADO PORQUE que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 37.

39. El vector de acuerdo con la reivindicación 38, CARACTERIZADO PORQUE dicho vector se selecciona del grupo formado por ADNpc, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pcDNA3.1 TOPO, pEF6 TOPO y pBJ.

40. Una célula huésped, CARACTERIZADA PORQUE comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 38.

41. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 40, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es una célula procariota.

42. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 41, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es *E. coli*.

43. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 40, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es una célula eucariota.

44. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 43, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula eucariota se selecciona del grupo formado por una célula protista, una célula animal, una célula vegetal y una célula fúngica.

45. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 43, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula eucariota es una célula animal que se selecciona del grupo formado por: una célula de mamífero, una célula de aves y una célula de insecto.

46. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 45, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es una célula CHO.

47. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 45, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es COS.

48. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 43, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es una célula de levadura.

49. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 48, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

50. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 45, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es una célula de insecto Sf9.

51. Un método para producir una proteína de unión, CARACTERIZADO PORQUE comprende cultivar una célula huésped descrita en cualquiera de las reivindicaciones 40-50 en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes como para producir la proteína de unión

52. El método de acuerdo con la reivindicación 51, CARACTERIZADO PORQUE el 50%-75% de la proteína de unión producida es una proteína de unión tetravalente específica dual.

53. El método de acuerdo con la reivindicación 51, CARACTERIZADO PORQUE el 75%-90% de la proteína de unión producida es una proteína de unión tetravalente específica dual.

54. El método de acuerdo con la reivindicación 51, CARACTERIZADO PORQUE el 90%-95% de la proteína de unión producida es una proteína de unión tetravalente específica dual.

55. Una proteína, CARACTERIZADA PORQUE fue producida de acuerdo con el método de la reivindicación 51.

56. Una composición farmacéutica, CARACTERIZADA PORQUE comprende la proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1-36 y 55, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

57. La composición farmacéutica de la reivindicación 56, CARACTERIZADA PORQUE además comprende al menos un agente terapéutico adicional.

58. La composición farmacéutica de la reivindicación 57, CARACTERIZADA PORQUE dicho agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste de un agente terapéutico, un agente para determinar imágenes, un agente citotóxico, inhibidores de la angiogénesis; inhibidores de quinasa; bloqueantes de moléculas de co-estimulación; bloqueantes de moléculas de adhesión; un anticuerpo anti-citoquina o un fragmento funcional del mismo; metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK506; una marca o informante detectable; un antagonista de TNF; un antirreumático; un relajante muscular, un narcótico, una droga anti-inflamatoria no esteroide (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteriode, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona del crecimiento, una droga de reemplazo hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, un esteroide oral, una epinefrina o un análogo, una citoquina y un antagonista de citoquina.

59. Un método de tratamiento de un sujeto por una enfermedad o un trastorno, CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración al sujeto de la proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1-36 y 55, de modo tal

que se logra dicho tratamiento.

60. El método de la reivindicación 59, CARACTERIZADO PORQUE dicho trastorno se selecciona del grupo que comprende artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de intestino inflamatoria, diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis, esclerodermia, enfermedad de injerto versus huésped, rechazo de transplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con el transplante de órganos, sarcoidosis, ateroesclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis crónica activa, uveítis, shock séptico, síndrome de shock tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, accidente cerebrovascular, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, formas malignas, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Addison, esporádica, deficiencia poliglandular tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria de adultos (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriática, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropática, artropatía asociada con clamidia, yersinia y salmonella, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arterioesclerosis, alergia atópica, enfermedad bullosa

autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliácea, penfigoide, enfermedad por IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica Coombs positiva, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad *Royal Free*, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, síndrome de la enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, hepatitis B, hepatitis C, inmunodeficiencia común variada (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, esterilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, pneumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedades del tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada con enfermedades del tejido conectivo mixtas, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémicas, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada con dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada con la enfermedad de Sjögren, enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por drogas, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterans, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar linfocítica infiltrante, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo-1 (hepatitis autoinmune o lupoide clásica), hepatitis autoinmune tipo-2 (hepatitis por anticuerpo anti-

LKM), hipoglucemia autoinmune, resistencia a insulina tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con el transplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada con el transplante de órganos, osteoartrosis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, esterilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad al esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria a una enfermedad del tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, enfermedad/arteritis de Takayasu, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroide autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primaria, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitiligo, enfermedad hepática aguda, enfermedad hepática crónica, cirrosis alcohólica, daño hepático inducido por alcohol, colestasis, enfermedad hepática idiosincrática, hepatitis inducida por drogas, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por estreptococos grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas por tipo Th2 y tipo Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), y distintos tipos de cáncer tales como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal y formas malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma), abetalipoproteinemia, acrocianosis, aguda y procesos

parasitarios o infecciosos crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos aéreos, complejo de demencia del SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis por contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo a aloinjertos, déficit de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina pectoris, degeneración de células del asta anterior, terapia anti cd3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arterioesclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), taquicardia auricular, bloqueo aurículoventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto óseo, rechazo de transplante de médula ósea (BMT), bloqueo de ramas de haz de His, linfoma de Burkitt, acidez estomacal, arritmias cardíacas, síndrome de *atontamiento* cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación a una derivación [*bypass*] cardiopulmonar, rechazo al transplante de cartílago, degeneraciones de la corteza del cerebelo, trastornos del cerebelo, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados con una quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), intoxicación crónica por salicilato, carcinoma colorrectal, insuficiencia cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis por contacto, cor pulmonale, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis con cultivo negativo, fibrosis quística, trastornos asociados con una terapia con citoquinas, demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre hemorrágica del

dengue, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad ateriosclerótica diabética, enfermedad de cuerpos difusos de Lewy, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos del ganglio basal, síndrome de Down en la edad madura, trastornos del movimiento inducidos por drogas que bloquean los receptores de dopamina del CNS, sensibilidad a drogas, eczema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por el virus Epstein-Barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y del cerebelo, linfohistiocitosis hematofagocítica familiar, rechazo al implante de timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos funcionales de las arterias periféricas, sepsis fúngicas, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo a injertos de cualquier órgano tejido, sepsis Gram-negativa, sepsis Gram-positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hallerrorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre del heno, rechazo al transplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias del haz de His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimientos hiperquinéticos, reacciones de hipersensibilidad, pneumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos de movimientos hipoquinéticos, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, toxicidad mediada por anticuerpos, astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza a, exposición a radiación ionizante, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesiones por reperfusión isquémica, accidente cerebrovascular isquémico, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo al

transplante de riñón, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo al transplante de hígado, linfedema, malaria, linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococcemia, metabólica/idiopática, migraña cefalea, trastorno mitocondrial multisistémico, enfermedad del tejido conectivo mixto, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de múltiples sistemas (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, síndrome mielodiplásico, infarto de miocardio, trastornos isquémicos del miocardio, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar neonatal crónica, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofias musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma no Hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y ramas de la misma, trastornos arteriales oclusivos, terapia okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo al transplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna, rechazo al transplante de paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad del pericardio, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía neumocistitis carinii, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal y síndrome de cambios de piel), síndrome de post-perfusión, síndrome postbomba, síndrome de cardiotomía post-MI, preeclampsia, parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación, fenómeno y enfermedad de Raynaud, enfermedad de Raynaud, enfermedad de Refsums, taquicardia por QRS

estrecho regular, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, demencia senil de tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, shock, anemia de células falsiformes, rechazo de aloinjertos de piel, síndrome de cambios de piel, rechazo al transplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelosas, miositis estreptococcica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxia sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumatoide juvenil de comienzo sistémico, células T o FAB ALL, telangiectasia, tromboangitis obliterans, trombocitopenia, toxicidad, transplantes, traumatismo/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades de las válvulas cardíacas, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis vital/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico asociado a virus, síndrome Wernicke-Korsakoff, síndrome Wilson, rechazo a xenoinjertos de cualquier órgano tejido, síndromes coronarios agudos, polineuritis idiopática aguda, polirradiculopatía inflamatoria desmielinizante aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still del adulto, *Alopecia areata*, anafilaxis, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, anemia aplásica, arteriosclerosis, eczema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con una infección por estreptococo, enteropatía autoinmune, síndrome de pérdida de la audición autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, falla ovárica

prematura autoinmune, blefaritis, bronquiectasias, penfigoide bulloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolípido catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, penfigoide cicatrizal, síndrome clínicamente aislado (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno psiquiátrico en la niñez, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, diabetes mellitus, hernia de disco, prolapso de disco, anemia hemolítica inmune inducida por drogas, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, episcleritis, eritema multiforme, eritema multiforme mayor, penfigoide gestacional, síndrome de Guillain-Barre (GBS), fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad de Perkinson idiopática, pneumonía intersticial idiopática, alergia mediada por IgE, anemia hemolítica inmune, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad inflamatoria infecciosa ocular, enfermedad inflamatoria desmielinizante, enfermedad inflamatoria del corazón, enfermedad inflamatoria del riñón, IPF/UIP, iritis, queratitis, queratoconjuntivitis seca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, histiocitosis de las células de Langerhans, *Livido reticularis*, poliangitis microscópica con degeneración macular, morbus Bechterev; trastorno neuronal motor, penfigoide de la membrana mucosa, insuficiencia multiorgánica, miastenia gravis, síndrome mielodisplásico, miocarditis, trastornos de las raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis no-A no-B, neuritis óptica, osteolisis, JRA pauciarticular, enfermedad oclusiva arterial periferica (PAOD), enfermedad vascular periferica (PVD), enfermedad arterial periferica (PAD), flebitis, poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), policondritis, polimialgia reumática, poliosis, JRA Poliarticular, síndrome de deficiencia poliendócrina, polimiositis, polimialgia reumática

(PMR), síndrome de post-bomba, parkinsonismo primario, cáncer de próstata y rectal y formas malignas hematológicas (leucemia y linfoma), prostatitis, aplasia de glóbulos rojos pura, insuficiencia adrenal primaria, neuromielitis óptica recurrente, restenosis, enfermedad cardíaca reumática, SAPHO (sinovitis, acne, pustulosis, hiperostosis y osteitis), esclerodermia, amiloidosis secundaria, pulmón de shock, escleritis, ciática, insuficiencia adrenal secundaria, enfermedad del tejido conectivo asociada a siliconas, dermatosis de Sneddon-Wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrólisis epidérmica tóxica, mielitis transversa, TRAPS (síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), reacción alérgica de Tipo 1, diabetes de Tipo II, urticaria, pneumonía intersticial usual (UIP), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH), degeneración macular húmeda, cicatrización de heridas y artropatía asociada a *Yersinia* y *Salmonella*.

61. El método de acuerdo con la reivindicación 60, CARACTERIZADO PORQUE dicha administración al sujeto comprende al menos un modo seleccionado entre parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intraventricular, intracerebeloso, intracerebroventricular, intracolónico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericardíaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

62. Un método para generar un dominio variable dual de inmunoglobulina capaz de unir dos antígenos, CARACTERIZADO PORQUE comprende los pasos de

a) obtener un primer anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, capaz de unirse a un primer antígeno;

b) obtener un segundo anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, capaz de unirse a un segundo antígeno;

c) construir una primera y tercera cadenas de polipéptidos que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de la cadena pesada obtenido a partir de dicho primer anticuerpo parental o una porción de unión al antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de la cadena pesada obtenido a partir de dicho segundo anticuerpo parental o una porción de unión al antígeno del mismo;

C es un dominio constante de la cadena pesada;

X1 es un conector con la condición que no sea CH1;

X2 es una región Fc, y

n es 0 o 1; y

d) construir una segunda y cuarta cadenas de polipéptidos que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de la cadena liviana obtenido a partir de dicho primer anticuerpo parental o una porción de unión al antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de la cadena liviana obtenido a partir de dicho segundo anticuerpo parental o unión al antígeno del mismo;

C es un dominio constante de la cadena liviana;

X1 es un conector con la condición que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es 0 o 1;

e) expresar dicha primera, segunda, tercera y cuarta cadenas de polipéptidos;

de modo tal que se genera un dominio variable dual de inmunoglobulina capaz de unirse a dicho primer y dicho segundo antígeno, en donde la proteína de unión tiene la capacidad de unirse a un par de antígenos seleccionado del grupo que consiste deTNF (seq. 2) y NGF; TNF (seq. 3) y NGF; TNF (seq. 4) y NGF; TNF (seq. 5) y NGF; TNF (seq. 6) y NGF; TNF (seq. 2) y SOST; TNF (seq. 3) y SOST; TNF (seq. 4) y SOST; TNF (seq. 5) y SOST; TNF (seq. 6) y SOST; TNF (seq. 2) y PGE2; TNF (seq. 3) y PGE2; TNF (seq. 4) y PGE2; TNF (seq. 5) y PGE2; TNF (seq. 6) y PGE2; TNF (seq. 1) y LPA; TNF (seq. 2) y LPA; TNF (seq. 3) y LPA; TNF (seq. 4) y LPA; TNF (seq. 5) y LPA; y TNF (seq. 6) y LPA.

63. El método de la reivindicación 62, CARACTERIZADO PORQUE los dominios variables de la cadena pesada VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID N°:28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 y 44, y en donde los dominios variables de la cadena liviana VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID N°:29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 y 45.

64. El método de la reivindicación 62, CARACTERIZADO PORQUE dicho primer anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, y dicho segundo anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, se seleccionan del grupo que consiste de un anticuerpo humano, un anticuerpo con injerto de CDR y un anticuerpo humanizado.

65. El método de la reivindicación 62, CARACTERIZADO PORQUE dicho primer anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, y dicho segundo anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, se seleccionan del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, un fragmento dAb, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, un anticuerpo de una sola cadena y *diabodies*.

66. El método de la reivindicación 62, CARACTERIZADO PORQUE dicho primer anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, posee al menos una propiedad deseada exhibida por el dominio variable dual de inmunoglobulina.

67. El método de la reivindicación 62, CARACTERIZADO PORQUE dicho segundo anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, posee al menos una propiedad deseada exhibida por el dominio variable dual de inmunoglobulina.

68. El método de la reivindicación 62, CARACTERIZADO PORQUE la región Fc se selecciona del grupo que consiste de una región Fc de secuencia

nativa y una región Fc de secuencia variante.

69. El método de la reivindicación 62, CARACTERIZADO PORQUE la región Fc se selecciona del grupo que consiste de una región Fc de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE e IgD.

70. El método de la reivindicación 66, CARACTERIZADO PORQUE dicha propiedad deseada se selecciona entre uno más parámetros de anticuerpo.

71. El método de la reivindicación 67, CARACTERIZADO PORQUE dicha propiedad deseada se selecciona entre uno más parámetros de anticuerpo.

72. El método de la reivindicación 70, CARACTERIZADO PORQUE dichos parámetros de anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de especificidad del antígeno, afinidad por el antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento del epitope, estabilidad, solubilidad, eficacia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada con tejidos y unión al antígeno ortóloga.

73. El método de la reivindicación 71, CARACTERIZADO PORQUE dichos parámetros de anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de especificidad del antígeno, afinidad por el antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento del epitope, estabilidad, solubilidad, eficacia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada con tejidos y unión al antígeno ortóloga.

74. El método de la reivindicación 62, CARACTERIZADO PORQUE dicho primer anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, se une a dicho primer antígeno con una afinidad diferente que la afinidad con

que dicho segundo anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, se une a dicho segundo antígeno.

75. El método de la reivindicación 62, CARACTERIZADO PORQUE dicho primer anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, se une a dicho primer antígeno con una potencia diferente que la potencia con que dicho segundo anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, se une a dicho segundo antígeno.

76. Un método para generar un dominio variable dual de inmunoglobulina capaz de unir dos antígenos con las propiedades deseadas, CARACTERIZADO PORQUE comprende los pasos de

a) obtener un primer anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, capaz de unirse a un primer antígeno y que posee por lo menos una propiedad deseada exhibida por el dominio variable dual de inmunoglobulina;

b) obtener un segundo anticuerpo parental, o una porción de unión al antígeno del mismo, capaz de unirse a un segundo antígeno y que posee por lo menos una propiedad deseada exhibida por el dominio variable dual de inmunoglobulina;

c) construir una primera y tercera cadenas de polipéptidos que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde;

VD1 es un primer dominio variable de la cadena pesada obtenido a partir de dicho primer anticuerpo parental o una porción de unión al antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de la cadena pesada obtenido a partir de dicho segundo anticuerpo parental o una porción de unión al antígeno

del mismo;

C es un dominio constante de la cadena pesada;

X1 es un conector con la condición que no sea CH1;

X2 es una región Fc; y

n es 0 o 1;

d) construir una segunda y cuarta cadenas de polipéptidos que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde;

VD1 es un primer dominio variable de la cadena liviana obtenido a partir de dicho primer anticuerpo parental o una porción de unión al antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de la cadena liviana obtenido a partir de dicho segundo anticuerpo parental, o una porción unión al antígeno del mismo;

C es un dominio constante de la cadena liviana;

X1 es un conector con la condición que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es 0 o 1;

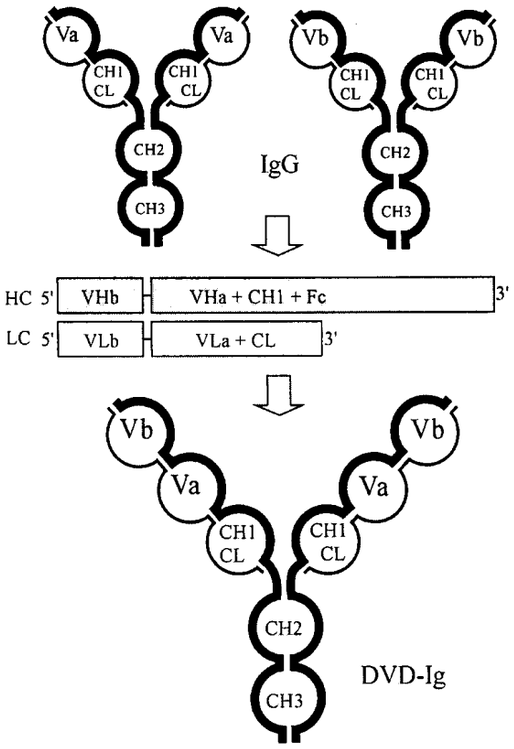
e) expresar dicha primera, segunda, tercera y cuarta cadenas de polipéptidos;

de manera tal que se genera el dominio variable dual de inmunoglobulina capaz de unirse a dicho primer y dicho segundo antígeno con las propiedades deseadas, en donde la proteína de unión tiene la capacidad de unirse a un par de antígenos seleccionado del grupo que consiste deTNF (seq. 2) y NGF; TNF (seq. 3) y NGF; TNF (seq. 4) y NGF; TNF (seq. 5) y NGF; TNF (seq. 6) y NGF; TNF (seq. 2) y SOST; TNF (seq. 3) y SOST; TNF (seq. 4) y

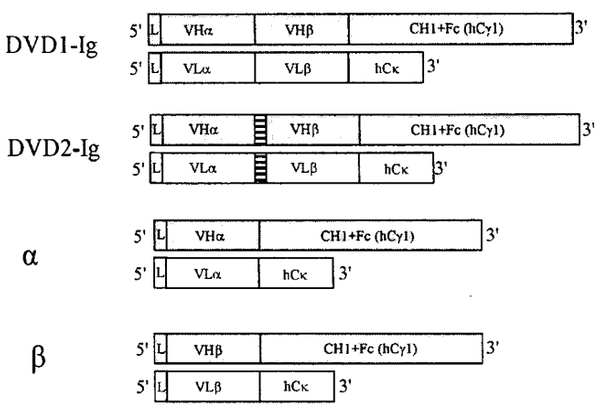
SOST; TNF (seq. 5) y SOST; TNF (seq. 6) y SOST; TNF (seq. 2) y PGE2; TNF (seq. 3) y PGE2; TNF (seq. 4) y PGE2; TNF (seq. 5) y PGE2; TNF (seq. 6) y PGE2; TNF (seq. 1) y LPA; TNF (seq. 2) y LPA; TNF (seq. 3) y LPA; TNF (seq. 4) y LPA; TNF (seq. 5) y LPA; y TNF (seq. 6) y LPA.

Figura 1

A



B



1 de 1

INMUNOGLOBULINAS CON DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

Proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas modificadas, métodos para elaborarlas y, específicamente, sus usos en la prevención, el diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades.

SECTOR: Industria farmacéutica, particularmente, proteínas de unión multiespecíficas y multivalentes con capacidad de unir dos o más antígenos, composiciones farmacéuticas que contienen dichas proteínas de unión y métodos para elaborar tales proteínas de unión.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha:	Recorrido:

Tipo de Radicación: Entrada: Salida: Traslado: Convenio:

Radicador:	Planilla:

ID	No. Radicación	Cons	Item
1			
2			
3			
4	12-81792-0		
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			

Item	Unidad de Conservación
1	CD
2	Disquetes
3	DVD
4	Fotos
5	Libro
6	Muestra Física
7	Otros
8	Planos
9	Periódico
10	Publicación Periódica
11	Sobre blanco tamaño carta
12	Sobre blanco tamaño oficio
X 13	Sobre de manila

Observaciones
Folio 401 Sobre de manila

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

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

(21) No. de solicitud:	(51) Int Cl: C07K 16/00
(22) Fecha de solicitud: 17-05-12	(71) Solicitante(s): **ABBOTT LABORATORIES.**
(30) Prioridad (31) ***No. Prioridad*** 61/255,686 (32) ***Fecha*** 28-10-09 (33) ***País*** US	(72) Inventor(es): GHAYUR, Tariq; SALFELD, Jochen, G.; MCPHERSON, Michael, J.; HARRIS, Maria, C.; LIU, Junjian; ISAKSON, Peter, C. y GU, Jijie.
	(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 28-05-12 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 28-10-10 No. de solicitud: ***PCT/US2010/054521***	(87) Publicación internacional Fecha: ***19-05-11*** No. publicación: ***WO 2011/059755 A3***
(54) Titulo: **"INMUNOGLOBULINAS CON DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS"**	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

Proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas modificadas, métodos para elaborarlas y, específicamente, sus usos en la prevención, el diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades.

Sector: Industria farmacéutica, particularmente, proteínas de unión multiespecíficas y multivalentes con capacidad de unir dos o más antígenos, composiciones farmacéuticas que contienen dichas proteínas de unión y métodos para elaborar tales proteínas de unión.

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) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 17-05-12

(51) Clasificación Internacional: **C07K 16/00**

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

(72) Inventor(es): GHAYUR, Tariq; SALFELD, Jochen, G.; MCPHERSON, Michael, J.; HARRIS, Maria, C.; LIU, Junjian; ISAKSON, Peter, C. y GU, Jijie.

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

(30) Prioridad	(31) ***No. Prioridad***	(32) ***Fecha***	(33) ***País***
	61/255,686	28-10-09	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 28-05-12

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 28-10-10
No. de solicitud: ***PCT/US2010/054521***

(87) Publicación internacional
Fecha: ***19-05-11***
No. publicación: ***WO 2011/059755 A3***

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

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

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 17-05-12
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/00

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

(72) Inventor(es): GHAYUR, Tariq; SALFELD, Jochen, G.; MCPHERSON, Michael, J.; HARRIS, Maria, C.; LIU, Junjian; ISAKSON, Peter, C. y GU, Jijie.

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

(30) Prioridad	(31) ***No. Prioridad***	(32) ***Fecha***	(33) ***País***
	61/255,686	28-10-09	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 28-05-12
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 28-10-10
No. de solicitud: ***PCT/US2010/054521***

(87) Publicación internacional:
Fecha: ***19-05-11***
No. Publicación: ***WO 2011/059755 A3***

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

(57) Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

Proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas modificadas, métodos para elaborarlas y, específicamente, sus usos en la prevención, el diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades.

Sector: Industria farmacéutica, particularmente, proteínas de unión multiespecíficas y multivalentes con capacidad de unir dos o más antígenos, composiciones farmacéuticas que contienen dichas proteínas de unión y métodos para elaborar tales proteínas de unión.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
19 May 2011 (19.05.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/059755 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/00 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/054521

(22) International Filing Date:
28 October 2010 (28.10.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/255,686 28 October 2009 (28.10.2009) 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

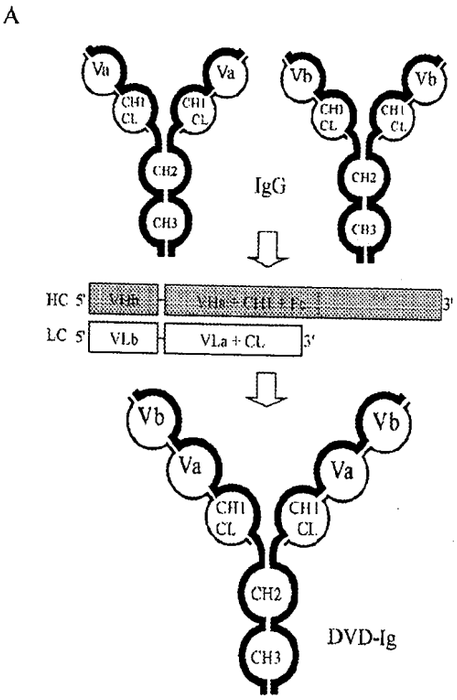
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **GHAYUR, Tariq** [US/US]; 1014 Washington Street, Holliston, Massachusetts 01746 (US). **SALFELD, Jochen, G.** [DE/US]; 177 Old Westboro Road, No. Grafton, Massachusetts 01536 (US). **MCPHERSON, Michael, J.** [GB/US]; 287 Pillsbury Road, Ashby, Massachusetts 01431 (US). **HARRIS, Maria, C.** [IT/US]; 55 Trowbridge Lane, Shrewsbury, Massachusetts 01545 (US). **LIU, Junjian** [CN/US]; 14 Crimson Drive, Shrewsbury, Massachusetts 01545 (US). **ISAKSON, Peter, C.** [US/US]; 14 Hillside Avenue, Southborough, Massachusetts 01772 (US). **GU, Ji-**

[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 2011/059755 A3

Jie [US/US]; 12 Tern Drive, Shrewsbury, Massachusetts 01545 (US).

(74) **Agents**: **FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT & DUNNER, L.L.P.** et al.; 901 New York Avenue, NW, Washington, DC 20001-4413 (US).

(81) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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 (AL, 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, RS, 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))*

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

(88) **Date of publication of the international search report**:
28 July 2011

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 10227WO01	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US 10/54521	International filing date *(day/month/year)* 28 October 2010 (28.10.2010)	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 28 October 2009 (28.10.2009)
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 43.6*bis*(a)).
   c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

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

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

4. With regard to the **title**,
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

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

6. With regard to the **drawings**,
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1A
      ☒ 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/54521

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)
   - [x] on paper
   - [ ] in electronic form

   b. (time)
   - [x] 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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/54521

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.: 16-20 and 51-61
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 from a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-15 and 21-50, dawn to a binding protein, where the first named invention will be searched and is limited to the pair of target antigens TNF (seq. 2) and NGF, and the VD sequence of SEQ ID NO: 28 (i.e. claims 1-3, 5-7, 9-15, and 21-50, limited to TNF (seq. 2) and NGF, wherein claims 2, 7, and 24 are limited to SEQ ID NO: 28). Due to the number of sequences in this application, Groups I+ will be defined as necessary depending on Applicant's ultimate payment of additional fees. The additional sequences will be searched if applicant pays for each additional sequence or shows that the sequences share a special technical feature, i.e. a common structure or feature that defines a contribution over the prior art. Note that each additional sequence to be searched must be specified by the Applicant in the response to this invitation and must either (1) have an additional invention fee paid or (2) have a showing that the sequences share a common structure or feature that defines a contribution over the prior art.

- Please see extra sheet for continuation -

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.:
1-3, 5-7, 9-15, 21-50 and 62-76; limited to SEQ ID NO: 28.

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 10/54521

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07K 16/00; A61K 39/395 (2011.01)
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)
IPC(8) ? C07K 16/00; A61K 39/395 (2011.01)
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
IPC(8) ? C07K 16/00; A61K 39/395 (2011.01), USPC ? 530/387.3; 424/136.1 - keyword search, as below

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
USPTO PubWest (databases: PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB) Google Scholar, Thomson Innoavation (core patent databases from 1975-present) -- Search Terms: Ghayur, antibody, immunoglobulin, scfv, fab, immunoeffector, binding, TNF, NGF, nerve growth factor, heavy chain, constant, Fc, linking, linkor, bi-specific, multi-specific, CH1, CH2, CH3

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/0215992 A1 (WU et al.) 27 August 2009 (27.08.2009) SEQ ID NO: 48; para [0013]; [0038]; [0041]; [0015]; [0017]; [0044]; [0048]; [0052]; [0018]; [0025]; [0026]; [0027]; [0028]; [0029]; [0031]; [0032]; [0046]; [0051]; [0050]; [0047]; [0197]	1-3, 5-7, 9-15, 21-50 and 62-76
X	US 2007/0071675 A1 (WU et al.) 29 March 2007 (29.03.2007) SEQ ID NO: 48; para [0012]; [0014]; [0016]; [0017]; [0021]; [0024]; [0025]; [0026]; [0027]; [0028]; [0030]; [0031]; [0040]; [0117]	1-3, 5-7, 9-15, 21-50 and 62-76
A	US 2009/0155275 A1 (WU et al.) 18 June 2009 (18.06.2009)	1-3, 5-7, 9-15, 21-50 and 62-76
A	US 2009/0259026 A1 (TOMLINSON et al.) 15 October 2009 (15.10.2009)	1-3, 5-7, 9-15, 21-50 and 62-76
A	US 2004/0219144 A1 (SHELTON) 4 November 2004 (04.11.2004)	1-3, 5-7, 9-15, 21-50 and 62-76

☐ 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
30 April 2011 (30.04.2011)	26 MAY 2011
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/54521

Continuation of Box III: Lack of Unity of invention

Group II: Claims 62-76, drawn to a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding two antigens

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

The special technical features of Group II I are a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin. This technical feature is not present in Groups I+.

Groups I+ share the technical features of claims 1, 3, 6, 24, or 25. However, none of these technical features represent an improvement over the prior art.

Regarding claims 24 and 25 (note that all of the limitations of claims 1, 3, and 6 are included in claims 24 and 25): Wu et al. (US 2007/0071675 A1, hereinafter 'Wu') teaches a binding protein capable of binding two antigens comprising four polypeptide chains (para [0016]),
wherein two polypeptide chains comprise VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein
VD1 is a first heavy chain variable domain;
VD2 is a second heavy chain variable domain;
C is a heavy chain constant domain;
X 1 is a linker with the proviso that it is not CH 1; and
X2 is an Fc region; and
wherein two polypeptide chains comprise VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein
VD1 is a first light chain variable domain;
VD2 is a second light chain variable domain;
C is a light chain constant domain;
X 1 is a linker with the proviso that it is not CH 1;
X2 does not comprise an Fc region and n is 0 or 1 (para [0016]);

Wu teaches that the antigens are selected from a group which contains both TNF and NGF (para [0040), but does not expressly teach an embodiment wherein the binding protein is capable of binding TNF (seq 2) in addition to NGF; however, such would have been further obvious because Adams et al. (US 2004/0219144) also teaches a binding protein capable of binding two antigens, TNF and NGF, in order to treat Crohn's disease or rheumatoid arthritis (para [0128]).

Further, the inventions of Groups I+ are drawn to different sequences (VD sequences or X sequences) which do not share a common structure. Accordingly, unity of invention is lacking.

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)* 26 MAY 2011
Applicant's or agent's file reference 10227WO01	FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US 10/54521	28 October 2010 (28.10.2010)	28 October 2009 (28.10.2009)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC(8) - C07K 16/00; A61K 39/395 (2011.01)
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 Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	1 May 2011 (01.05.2011)	Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/54521

Box No. I Basis of this opinion

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

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

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

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

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

   a. (means)

      ☒ on paper

      ☐ in electronic form

   b. (time)

      ☒ in the international application as filed

      ☐ together with the international application in electronic form

      ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

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

5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No. PCT/US 10/54521

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 16-20 and 51-61

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

☒ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. 16-20 and 51-61 are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

Claims 16-20 and 51-61 are multiple dependent claims not drafted in accordance with PCT Rule 6.4(a).

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 16-20 and 51-61

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13*ter*.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/54521

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 from a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-15 and 21-50, dawn to a binding protein, where the first named invention will be searched and is limited to the pair of target antigens TNF (seq. 2) and NGF, and the VD sequence of SEQ ID NO: 28 (i.e. claims 1-3, 5-7, 9-15, and 21-50, limited to TNF (seq. 2) and NGF, wherein claims 2, 7, and 24 are limited to SEQ ID NO: 28). Due to the number of sequences in this application, Groups I+ will be defined as necessary depending on Applicant's ultimate payment of additional fees. The additional sequences will be searched if applicant pays for each additional sequence or shows that the sequences share a special technical feature, i.e. a common structure or feature that defines a contribution over the prior art. Note that each additional sequence to be searched must be specified by the Applicant in the response to this invitation and must either (1) have an additional invention fee paid or (2) have a showing that the sequences share a common structure or feature that defines a contribution over the prior art.

Group II: Claims 62-76, drawn to a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin capable of binding two antigens

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

The special technical features of Group II I are a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin. This technical feature is not present in Groups I+.

Groups I+ share the technical features of claims 1, 3, 6, 24, or 25. However, none of these technical features represent an improvement over the prior art.

Regarding claims 24 and 25 (note that all of the limitations of claims 1, 3, and 6 are included in claims 24 and 25): Wu et al. (US 2007/0071675 A1, hereinafter 'Wu') teaches a binding protein capable of binding two antigens comprising four polypeptide chains (para [0016]),
wherein two polypeptide chains comprise VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein:
VD1 is a first heavy chain variable domain;
VD2 is a second heavy chain variable domain;
C is a heavy chain constant domain;
X 1 is a linker with the proviso that it is not CH 1; and
X2 is an Fc region; and
wherein two polypeptide chains comprise VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein:
VD1 is a first light chain variable domain;
VD2 is a second light chain variable domain;
C is a light chain constant domain;
X 1 is a linker with the proviso that it is not CH 1;
X2 does not comprise an Fc region and n is 0 or 1 (para [0016]);

Wu teaches that the antigens are selected from a group which contains both TNF and NGF (para [0040], but does not expressly teach an embodiment wherein the binding protein is capable of binding TNF (seq 2) in addition to NGF; however, such would have been further obvious because Adams et al. (US 2004/0219144) also teaches a binding protein capable of binding two antigens, TNF and NGF, in order to treat Crohn's disease or rheumatoid arthritis (para [0128]).

Further, the inventions of Groups I+ are drawn to different sequences (VD sequences or X sequences) which do not share a common structure. Accordingly, unity of invention is lacking.

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, 5-7, 9-15, and 21-50 and 62-76: limited to SEQ ID NO: 28

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/54521

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

1. Statement

Novelty (N)	Claims	2, 7, 14, 24 and 63	YES
	Claims	1, 3, 5, 6, 9-15, 21-23, 25-50, 62 and 64-76	NO
Inventive step (IS)	Claims	None	YES
	Claims	1-3, 5-7, 9-15, 21-50 and 62-76	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-3, 5-7, 9-15, 21-50 and 62-76	YES
	Claims	None	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1, 3, 5, 6, 9-15, 21-23, 25-50, 62 and 64-76 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2009/0215992 A1 to Wu et al. (hereinafter "Wu").

Regarding claim 1, Wu discloses a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein;
VD1 is a first heavy chain variable domain;
VD2 is a second heavy chain variable domain;
C is a heavy chain constant domain;
X1 is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 is an Fc region; and
n is 0 or 1 (para [0013])
wherein the binding protein binds a pair of antigens consisting of TNF (seq. 2) (para [0038] and [0041])) and NGF (para [0041]).

Regarding claim 3, Wu discloses a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n (para [0013]), wherein;
VD1 is a first light chain variable domain;
VD2 is a second light chain variable domain;
C is a light chain constant domain;
X1 is a linker with the proviso that it is not CH 1;
X2 does not comprise an Fc region; and
n is 0 or 1 (para [0015])
wherein the binding protein binds a pair of antigens selected consisting of TNF (seq. 2)(para [0038]) and NGF (para [0041]).

Regarding claim 5, Wu further discloses the binding protein according to claim 1 or 3, wherein n is 0 (para [0013]).

Regarding claim 6, Wu further teaches a binding protein comprising first and second polypeptide chains, wherein said first polypeptide chain comprises a first VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein
VD1 is a first heavy chain variable domain;
VD2 is a second heavy chain variable domain;
C is a heavy chain constant domain;
Xl is a linker with the proviso that it is not CH1; and
X2 is an Fc region; and
wherein said second polypeptide chain comprises a second VD1-(X1)n-VD2-C(X2)n, wherein:
VD1 is a first light chain variable domain;
VD2 is a second light chain variable domain;
C is a light chain constant domain;
X1 is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 does not comprise an Fc region; and
n is 0 or 1 (para [0017]), wherein the binding protein binds a pair of antigens consisting of TNF (seq. 2)(para [0038]) and NGF (para [0041]).

Regarding claim 9, Wu also teaches wherein the binding protein comprises two first polypeptide chains and two second polypeptide chains (para [0017]).

Regarding claim 10, Wu additionally discloses the binding protein according to claim 1, 3, or 6, wherein the Fc region is selected from the group consisting of native sequence Fc region and a variant sequence Fc region (para [0044]).

Regarding claim 11, Wu further teaches the binding protein according to claim 10, wherein 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 [0044]).

- Please see first continuation sheet -

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/54521

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.
Continuation of:
Box V.2: Citations and Explanations

Regarding claim 12, Wu also discloses the binding protein according to claim 1, 3, or 6, wherein said VDI of the first polypeptide chain and said VDI of the second polypeptide chain are obtained from the same first and second parent antibody, respectively, or antigen binding portion thereof (para [0044]).

Regarding claim 13, Wu additionally teaches the binding protein according to claim 1, 3, or 6, wherein said VDI of the first polypeptide chain and said VDI of the second polypeptide chain are obtained from a different first and second parent antibody, respectively, or antigen binding portion thereof (para [0046]).

Regarding claim 15, Wu also teaches the binding protein according to claim 1, 3, or 6, wherein said VD2 of the first polypeptide chain and said VD2 of the second polypeptide chain are obtained from different first and second parent antibody, respectively, or antigen binding portion thereof (para [0048]).

Regarding claim 21, Wu discloses wherein the binding protein according to claim 1, 3, or 6, wherein said binding protein possesses at least one desired property exhibited by said first parent antibody or antigen binding portion thereof, or said second parent antibody or antigen binding portion thereof (para [0052]).

Regarding claim 22, Wu further teaches the binding protein according to claim 21, wherein said desired property is selected from one or more antibody parameters (para [0052]).

Regarding claim 23, Wu additionally discloses the binding protein according to claim 21, wherein said antibody parameters are selected from the group consisting of antigen specificity, affinity to antigen, potency, biological function, epitope recognition, stability, solubility, production efficiency, immunogenicity, pharmacokinetics, bioavailability, tissue cross reactivity, and orthologous antigen binding (para [0052]).

Regarding claim 25, Wu discloses a binding protein that binds two antigens comprising four polypeptide chains, wherein two polypeptide chains comprise VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein:
VD1 is a first heavy chain variable domain;
VD2 is a second heavy chain variable domain;
C is a heavy chain constant domain;
XI is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 is an Fc region; and
n is 0 or 1; and
wherein two polypeptide chains comprise VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein:
VD1 is a first light chain variable domain;
VD2 is a second light chain variable domain;
C is a light chain constant domain;
X 1 is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 does not comprise an Fc region; and
n is 0 or 1 (para [0017]); and wherein the DVD-Ig binds at least one antigen consisting of TNF (seq. 2)(para [0018]).

Regarding claim 26, Wu additionally teaches the binding protein according to claim 1, 3, 6, 24, or 25, wherein said binding protein has an on rate constant (Kon) to said one or more targets selected from the group consisting of: at least about 10.sup.2 M.sup.-1 S.sup.-1; at least about 10.sup.3 M.sup.-1 S.sup.-1; at least about 10.sup.4 M.sup.-1 S.sup.-1; at least about 10.sup.5 M.sup.-1 S.sup.-1; and at least about 10.sup.6 M.sup.-1 S.sup.-1 (para [0025]).

Regarding claim 27, Wu further discloses the binding protein according to claim 1, 3, 6, 24, or 25, wherein said binding protein has an off rate constant (Koff) to said one or more targets selected from the group consisting of: at most about 10.sup.-3 S.sup.-1; at most about 10.sup.-4 S.sup.-1; at most about 10.sup.-5 S.sup.-1; at most about 10.sup.-6 S.sup.-1, as measured by surface plasmon resonance (para [0026]).

Regarding claim 28, Wu also teaches the binding protein according to claim 1,3,6,24, or 25, wherein said binding protein has a dissociation constant (KD) to said one or more targets selected from the group consisting of: at most about 10.sup.-7 M; at most about 10.sup.-8 M; at most about 10.sup.-9 M (para [0027]).

Regarding claim 29, Wu teaches a binding protein conjugate comprising a binding protein according to any one of claims 1, 3, 6, 24, or 25, said binding protein conjugate further comprising an agent selected from the group consisting of: an immunoadhesion molecule, an imaging agent, a therapeutic agent, and a cytotoxic agent (para [0028]).

Regarding claim 30, Wu further details the binding protein conjugate according to claim 29, wherein said agent is an imaging agent selected from the group consisting of a radiolabel, an enzyme, a fluorescent label, a luminescent label, a bioluminescent label, a magnetic label, and biotin (para [0028]).

Regarding claim 31, Wu also teaches the binding protein conjugate according to claim 30, wherein said imaging agent is a radiolabel selected from the group consisting of: 3H, 14C, 35S, 90Y, 99Tc, 111In, 125I, 131I, 153Sm, 166Ho and 177Lu (para [0028]).

- Please see second continuation sheet -

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/54521

Supplemental Box

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

Continuation of:
Box V.2: Citations and Explanations

Regarding claim 32, Wu additionally discloses the binding protein conjugate according to claim 30, wherein said agent is a therapeutic or cytotoxic agent selected from the group consisting of; an anti-metabolite, an alkylating agent, an antibiotic, a growth factor, a cytokine, an anti-angiogenic agent, an anti-mitotic agent, an anthracycline, toxin, and an apoptotic agent (para [0028]).

Regarding claim 33, Wu discloses the binding protein according to claim 1, 3, 6, 24, or 25, wherein said binding protein is a crystallized binding protein (para [0029]).

Regarding claim 34, Wu also recites the binding protein according to claim 33, wherein said crystal is a carrier-free pharmaceutical controlled release crystal (para [0029]).

Regarding claim 35, Wu further teaches the binding protein according to claim 33, wherein said binding protein has a greater half-life in vivo than the soluble counterpart of said binding protein (para [0029]).

Regarding claim 36, Wu details the binding protein according to claim 33, wherein said binding protein retains biological activity (para [0029]).

Regarding claim 37, Wu discloses an isolated nucleic acid encoding a binding protein amino acid sequence according to any one of claims 1, 3, 6, 24, or 25 (para [0031]).

Regarding claim 38, Wu also teaches a vector comprising an isolated nucleic acid according to claim 37 (para [0031])

Regarding claim 39, Wu details the vector according to claim 38, wherein said vector is selected from the group consisting of pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pcDNA3.l TOPO, pEF6 TOPO, and pBJ (para [0031]).

Regarding claim 40, Wu further discloses a host cell comprising a vector according to claim 38 (para [0032]).

Regarding claim 41, Wu additionally teaches the host cell according to claim 40, wherein said host cell is a prokaryotic cell (para [0032]).

Regarding claim 42, Wu also recites the host cell according to claim 41, wherein said host cell is E.coli (para [0032]).

Regarding claim 43, Wu further teaches the host cell according to claim 40, wherein said host cell is a eukaryotic coll (para [0032]).

Regarding claim 44, Wu also discloses the host cell according to claim 43, wherein said eukaryotic cell is selected from the group consisting of: a protist cell, an animal cell, a plant cell and a fungal cell (para [0032]).

Regarding claim 45, Wu teaches the host cell according to claim 43, wherein said eukaryotic cell is an animal cell selected from the group consisting of; a mammalian cell, an avian cell, and an insect cell (para [0032]).

Regrding claims 46 and 47, Wu recites the host cell according to claim 45, wherein said host cell is a CHO cell or a COS cell (para [0032]).

Regarding claims 48 and 49, Wu further discloses, the host cell according to claim 43, wherein said host cell is a yeast cell, wherein said yeast cell is Saccharomyces cerevisiae (para [0032]).

Regarding claim 50, Wu also teaches the host cell according to claim 45, wherein said host cell is an insect Sf9 cell (para [0032]).

Regarding claim 62, Wu discloss a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin that binds two antigens comprising the steps of:
a) obtaining a first parent antibody or antigen binding portion thereof, that binds a first antigen;
b) obtaining a second parent antibody or antigen binding portion thereof, that binds a second antigen;
c) constructing first and third polypeptide chains comprising VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein:
VD1 is a first heavy chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof;
VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding portion thereof;
C is a heavy chain constant domain;
X 1 is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 is an Fc region; and
n is 0 or 1; and
d) constructing second and fourth polypeptide chains comprising VD1-(X1)nVD2-C-(X2)n, wherein
VD1 is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof;
VD2 is a second light chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding thereof;
C is a light chain constant domain;
X1 is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 does not comprise an Fc region; and
n is 0 or 1; and
e) expressing said first, second, third and fourth polypeptide chains, such that a Dual Variable Domain Immunoglobulin that binds said first and said second antigen is generated (para [0046]), wherein the binding protein binds a pair of antigens consisting of TNF (seq. 2) (para [0018]) and NGF (para [0041]).

- Please see third continuation sheet -

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/54521

Supplemental Box

In case **the space in any of the preceding boxes is not sufficient.**
Continuation of:
Box V.2: Citations and Explanations

Regarding claim 64, Wu also teaches the method of claim 62, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, and said second parent antibody or antigen binding portion thereof, are selected from the group consisting of a human antibody, a CDR grafted antibody, and a humanized antibody (para [0051]).

Regarding claim 65, Wu further details the method of claim 62, 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').sub.2 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 CH1 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 [0051]).

Regarding claim 66, Wu recites the method of claim 62, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof possesses at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0052]).

Regarding claim 67, Wu additionally teaches the method of claim 62, wherein said second parent antibody or antigen binding portion thereof possesses at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0052])

Regarding claim 68, Wu further discloses the method of claim 62, wherein the Fc region is selected from the group consisting of a native sequence Fc region and a variant sequence Fc region (para [0044]).

Regarding claim 69, Wu also teaches the method of claim 62, wherein the Fc region is selected from the group consisting of an Fc region from an IgGl, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, and IgD (para [0044]).

Regarding claim 70, Wu anticipates the method of claim 66, wherein said desired property is selected from one or more antibody parameters (para [0052]).

Regarding claim 71, Wu teaches the method of claim 67, wherein said desired property is selected from one or more antibody parameters (para [0052]).

Regarding claim 72, Wu details the method of claim 70, wherein said antibody parameters are selected from the group consisting of antigen specificity, affinity to antigen, potency, biological function, epitope recognition, stability, solubility, production efficiency, immunogenicity, pharmacokinetics, bioavailability, tissue cross reactivity, and orthologous antigen binding (para [0052]).

Regarding claim 73, Wu recites the method of claim 71, wherein said antibody parameters are selected from the group consisting of antigen specificity, affinity to antigen, potency, biological function, epitope recognition, stability, solubility, production efficiency, immunogenicity, pharmacokinetics, bioavailability, tissue cross reactivity, and orthologous antigen binding (para [0052]).

Regarding claim 74, Wu discloses the method of claim 62, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said first antigen with a different affinity than the affinity with which said second parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said second antigen (para [0050]).

Regarding claim 75, Wu anticipates the method of claim 62, 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 [0050]).

Regarding claim 76, a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin that binds two antigens with desired properties, comprising the steps of:
a) obtaining a first parent antibody or antigen binding portion thereof, that binds a first antigen and possessing at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin;
b) obtaining a second parent antibody or antigen binding portion thereof, that binds a second antigen and possessing at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin;
c) constructing first and third polypeptide chains comprising VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein;
VD1 is a first heavy chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof;
VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding portion thereof;
C is a heavy chain constant domain;
X 1 is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 is an Fc region; and
n is 0 or 1;
d) constructing second and fourth polypeptide chains comprising VD1-(X1)nVD2-C-(X2)n, wherein;
VD1 is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof;
VD2 is a second light chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding portion thereof;
C is a light chain constant domain;
X 1 is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 does not comprise an Fc region; and
n is 0 or 1; and
e) expressing said first, second, third and fourth polypeptide chains, such that a Dual Variable Domain Immunoglobulin that binds said first and said second antigen with desired properties is generated (para [0047]), wherein the binding protein binds a pair of antigens consisting of TNF (seq. 2)(para [0018]) and NGF (para [0041]).

- Please see fourth continuation sheet -

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/54521

Supplemental Box

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

Continuation of:
Box V.2: Citations and Explanations

Claims 2, 7, 14, 24 and 63 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Wu.

Regarding claim 2, although Wu does not explicitly recite wherein VD1 and VD2 comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO: 28, Wu teaches wherein the linker comprises the sequence ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 48)(para [0013]), and further teaches wherein the linker may comprise "G/S based sequences (e.g G4S repeats)" (para [0197]). It would have been obvious to a person skilled in the art to repeat a linker sequence, as taught by Wu, to produce a linking region of desired length with a desirable structure and function; wherein SEQ ID NO: 28 would have been recognized by a person skilled in the art to comprise a direct repeat of SEQ ID NO: 48 of Wu.

Regarding claim 7, although Wu does not explicitly recite wherein the VDI and VD2 heavy chain variable domains comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO: 28, Wu teaches wherein the linker comprises the sequence ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 48)(para [0013]), and further teaches wherein the linker may comprise "G/S based sequences (e.g G4S repeats)" (para [0197]). It would have been obvious to a person skilled in the art to repeat a linker sequence, as taught by Wu, to produce a linking region of desired length with a desirable structure and function; wherein SEQ ID NO: 28 would have been recognized by a person skilled in the art to comprise a direct repeat of SEQ ID NO: 48 of Wu.

Regarding claim 14, although Wu does not disclose the binding protein according to claim 1, 3, or 6, wherein said VD2 of the first polypeptide chain and said VD2 of the second polypeptide chain are obtained from the same first and second parent antibody, respectively, or antigen binding portion thereof, Wu teaches first and second parent antibodies (para [0047]), and wherein the VD2 regions may be obtained from different parent antibodies (para [0048]). It would have been obvious to a person skilled in the art to parametrically form antibodies according to Wu, wherein the first VD2 region was from the first parent antibody and the second VD2 region from the second parent antibody, or wherein the first VD2 region was from the second parent antibody and the second VD2 region was from the first antibody in order to produce antibodies that bind appropriately to a selected set of target antigens.

Regarding claim 24, Wu teaches a binding protein that binds two antigens comprising four polypeptide chains, wherein two polypeptide chains comprise VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein
VD1 is a first heavy chain variable domain;
VD2 is a second heavy chain variable domain;
C is a heavy chain constant domain;
Xl is a linker with the proviso that it is not CH1; and
X2 is an Fc region; and
wherein two polypeptide chains comprise VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein
VD1 is a first light chain variable domain;
VD2 is a second light chain variable domain;
C is a light chain constant domain;
X1 is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 does not comprise an Fc region;
n is 0 or 1 (para [0017]). Although Wu does not explicitly teach wherein the VD1 and VD2 heavy chain variable domains comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO: 28, Wu teaches wherein the linker comprises the sequence ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 48)(para [0013]), and further teaches wherein the linker may comprise "G/S based sequences (e.g G4S repeats)" (para [0197]). It would have been obvious to a person skilled in the art to repeat a linker sequence, as taught by Wu, to produce a linking region of desired length with a desirable structure and function; wherein SEQ ID NO: 28 would have been recognized by a person skilled in the art to comprise a direct repeat of SEQ ID NO: 48 of Wu.

Regarding claim 63, Wu does not explicitly disclose the method of claim 62, wherein the VD1 and VD2 heavy chain variable domains comprise an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 28, however, Wu teaches wherein the linker comprises the sequence ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 48)(para [0013]), and further teaches wherein the linker may comprise "G/S based sequences (e.g G4S repeats)" (para [0197]). It would have been obvious to a person skilled in the art to repeat a linker sequence, as taught by Wu, to produce a linking region of desired length with a desirable structure and function; wherein SEQ ID NO: 28 would have been recognized by a person skilled in the art to comprise a direct repeat of SEQ ID NO: 48 of Wu.

Claims 1-3, 5-7, 9-15, 21-50 and 62-76 have industrial applicability under PCT Article 33(4) because the subject matter may be made or used by industry.

500

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
REBECCA M. MCNEILL
FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT & DUNNER,
L.L.P.
901 NEW YORK AVENUE, NW
WASHINGTON, DC 20001-4413

PCT

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

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	
Applicant's or agent's file reference 10227WO01	**IMPORTANT NOTIFICATION**

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US10/54521	28 October 2010 (28.10.2010)	28 October 2009 (28.10.2009)

Applicant

ABBOTT LABORATORIES

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

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

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

4. **REMINDER**

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

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

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

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

Name and mailing address of the IPEA/ US	Authorized officer
Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450	Laura B Goddard
Facsimile No.	Telephone No. 571-272-7222

Form PCT/IPEA/416 (January 2004)

RECEIVED

FEB 23 2012

Finnegan, Henderson, Farabow,
Garrett & Dunner, L.L.P.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
REBECCA M. MCNEILL
FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT & DUNNER,
L.L.P.
901 NEW YORK AVENUE, NW
WASHINGTON, DC 20001-4413

PCT

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

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing (*day/month/year*)	21 FEB 2012

Applicant's or agent's file reference	IMPORTANT NOTIFICATION
10227WO01	

International application No.	International filing date (*day/month/year*)	Priority date (*day/month/year*)
PCT/US10/54521	28 October 2010 (28.10.2010)	28 October 2009 (28.10.2009)

Applicant

ABBOTT LABORATORIES

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

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

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

4. **REMINDER**

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

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

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

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

Name and mailing address of the IPEA/ US	Authorized officer
Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450	Laura B Goddard
Facsimile No.	Telephone No. 571-272-7222

Form PCT/IPEA/416 (January 2004)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 10227WO01	FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/US10/54521	International filing date *(day/month/year)* 28 October 2010 (28.10.2010)	Priority date *(day/month/year)* 28 October 2009 (28.10.2009)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC: **C07K 16/00**(2006.01);**A61K 39/395**(2006.01) USPC: 530/387.3;424/136.1		
Applicant ABBOTT LABORATORIES		

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 12 sheets, including this cover sheet.
3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:
   a. [X] *(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:

[X]	Box No. I	Basis of the report
[ ]	Box No. II	Priority
[X]	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
[X]	Box No. IV	Lack of unity of invention
[X]	Box No. V	Reasoned statement under 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
[X]	Box No. VIII	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
27 May 2011 (27.05.2011)	08 February 2012 (08.02.2012)
Name and mailing address of the IPEA/ US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia22313-1450 Facsimile No.	Authorized officer Laura B Goddard Telephone No. 571-272-7222

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY	International Application No. PCT/US10/54521

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 1-239 as originally filed/furnished
pages* NONE received by this Authority on _____
pages* NONE received by this Authority on _____

☒ the claims:
pages 240-256 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 1/1 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(c)).

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

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY	International Application No. PCT/US10/54521

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 16-20 and 51-61

because:

☐ the said international application, or the said claim Nos. ____ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination *(specify)*:

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. ____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. ____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 16-20 and 51-61

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b) and 13*ter*.2.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY	International application No. PCT/US10/54521

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, 5-7, 9-15, 21-50, 62-76 (limited to SEQ ID NO:28)

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY	International Application No. PCT/US10/54521

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

1. Statement

Novelty (N)	Claims 2, 7, 14, 24, 63	YES
	Claims 1, 3, 5, 6, 9-15, 21-23, 25-50, 62, 64-76	NO
Inventive Step (IS)	Claims NONE	YES
	Claims 1-3, 5-7, 9-15, 21-50, 62-76	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims 1-3, 5-7, 9-15, 21-50, 62-76	YES
	Claims NONE	NO

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

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY	International application No. PCT/US10/54521

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 16-20 and 51-61 are multiple dependent claims not drafted in accordance with PCT Rule 6.4(a)

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY	International Application No. PCT/US10/54521

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:

* *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/US10/54521

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 from a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-15 and 21-50, dawn to a binding protein, where the first named invention will be searched and is limited to the pair of target antigens TNF (seq. 2) and NGF, and the VD sequence of SEQ ID NO: 28 (i.e. claims 1-3, 5-7, 9-15, and 21-50, limited to TNF seq. 2) and NGF, wherein claims 2, 7, and 24 are limited to SEQ ID NO: 28). Due to the number of sequences in this application, Groups I+ will be defined as necessary depending on Applicant's ultimate payment of additional fees. The additional sequences will be searched if applicant pays for each additional sequence or shows that the sequences share a special technical feature, i.e. a common structure or feature that defines a contribution over the prior art. Note that each additional sequence to be searched must be specified by the Applicant in the response to this invitation and must either (1) have an additional invention fee paid or (2) have a showing that the sequences share a common structure or feature that defines a contribution over the prior art.

Group II: Claims 62-76, drawn to a method for generating a Dual Variable Domair~ Immunoglobulin capable of binding two antigens

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

The special technical features of Group II I are a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin. This technical feature is not present in Groups I+.

Groups I+ share the technical features of claims 1, 3, 6, 24, or 25. However, none of these technical features represent an improvement over the prior art.

Regarding claims 24 and 25 (note that all of the limitations of claims 1, 3, and 6 are included in claims 24 and 25): Wu et al. (US 2007/0071675 A1, hereinatter %'Vu') teaches a binding protein capable of binding two antigens comprising four polypeptide chains (para [0016]), wherein two polypeptide chains comprise VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein: VD1 is a first heavy chain variable domain; VD2 is a second heavy chain variable domain; C is a heavy chain constant domain;

X 1 is a linker with the proviso that it is not CH 1; and X2 is an Fc region; and wherein two polypeptide chains comprise VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein: VD1 is a first light chain variable domain; VD2 is a second light chain variable domain; C is a light chain constant domain;

X 1 is a linker with the proviso that it is not CH 1;

X2 does not comprise an Fc region and n is 0 or 1 (pare [0016]);

Wu teaches that the antigens are selected from a group which contains both TNF and NGF (pare [0040], but does not expressly teach an embodiment wherein the binding protein is capable of binding TNF (seq 2) in addition to NGF; however, such would have been further obvious because Adams et al. (US 2004/0219144) also teaches a binding protein capable of binding two antigens, TNF and NGF, in order to treat Crohn's disease or rheumatoid arthritis (para [0128]).

Further, the inventions of Groups I+ are drawn to different sequences (VD sequences or X sequences) which do not share a common structure. Accordingly, unity of invention is lacking.

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY	International application No. PCT/US10/54521

Supplemental Box

V. 2. Citations and Explanations:

Claims 1, 3, 5, 6, 9-15, 21-23, 25-50, 62 and 64-76 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2009/0215992 A1 to Wu et al. (hereinafter "Wu").

Regarding claim 1, Wu discloses a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein;

VD1 is a first heavy chain variable domain;

VD2 is a second heavy chain variable domain

I C is a heavy chain constant domain;

IX1 is a linker with the proviso that it is not CH1;

i X2 is an Fc region; and

in is 0 or 1 (para [0013])

wherein the binding protein binds a pair of antigens consisting of TNF (seq. 2) (para [0038] and [0041]]) and NGF (pare [0041]).

Regarding claim 3, Wu discloses a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n (para [0013]), wherein;

VD1 is a first light chain variable domain;

VD2 is a second light chain variable domain;

C is a light chain constant domain;

Xl is a linker with the proviso that it is not CH 1;

X2 does not comprise an Fc region; and

n is 0 or 1 (para [0015])

wherein the binding protein binds a pair of antigens selected consisting of TNF (seq. 2)(para [0038]) and NGF (para [0041]).

Regarding claim 5, Wu further discloses the binding protein according to claim 1 or 3, wherein n is 0 (para [0013]).

Regarding claim 6, Wu further teaches a binding protein comprising first and second polypeptide chains, wherein said first polypeptide chain comprises a first VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein

VD1 is a first heavy chain variable domain;

VD2 is a second heavy chain variable domain;

C is a heavy chain constant domain;

XI is a linker with the proviso that it is not CH1; and

X2 is an Fc region; and

wherein said second polypeptide chain comprises a second VDI-(X1)n-VD2-C(X2)n, wherein:

VD1 is a first light chain variable domain;

VD2 is a second light chain variable domain;

C is a light chain constant domain;

Xl is a linker with the proviso that it is not CH1;

X2 does not comprise an Fc region; and

n is 0 or 1 (para [0017]), wherein the binding protein binds a pair of antigens consisting of TNF (seq. 2)(para [0038]) and NGF (pars [0041]).

Regarding claim 9, Wu also teaches wherein the binding protein comprises two first polypeptide chains and two second polypeptide chains (para [0017]).

Regarding claim 10, Wu additionally discloses the binding protein according to claim 1, 3, or 6, wherein the Fc region is selected from the group consisting of native sequence Fc region and a variant sequence Fc region (para [0044]).

Regarding claim 11, Wu further teaches the binding protein according to claim 10, wherein the Fc region is selected from the group consisting of an Fc region from an IgG1, IgG2, IgG3, igG4, IgA, IgM, IgE, and tgD (pars [0044]).

Regarding claim 12, Wu also discloses the binding protein according to claim 1, 3, or 6, wherein said VDI of the first polypeptide chain and said VDI of the second polypeptide chain are obtained from the same first and second parent antibody, respectively, or antigen binding portion thereof (para [0044]).

Regarding claim 13, Wu additionally teaches the binding protein according to claim 1, 3, or 6, wherein said VDI of the first polypeptide chain and said VDI of the second polypeptide chain are obtained from a different first and second parent antibody, respectively, or antigen binding portion thereof (para [0048]).

Regarding claim 15, Wu also teaches the binding protein according to claim 1, 3, or 6, wherein said VD2 of the first polypeptide chain and said VD2 of the second polypeptide chain are obtained from different first and second parent antibody, respectively, or antigen binding portion thereof (pare [0048]).

Regarding claim 21, Wu discloses wherein the binding protein according to claim 1, 3, or 6, wherein said binding protein possesses at least one desired property exhibited by said first parent antibody or antigen binding portion thereof, or said second parent antibody or antigen binding portion thereof (pare [0052]).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY	International application No. PCT/US10/54521

Supplemental Box

Regarding claim 22, Wu further teaches the binding protein according to claim 21, wherein said desired property is selected from one or more antibody parameters (para [0052]).
Regarding claim 23, Wu additionally discloses the binding protein according to claim 21, wherein said antibody parameters are selected from the group consisting of antigen specificity, affinity to antigen, potency, biological function, epitope recognition, stability, solubility, production efficiency, immunogenicity, pharmacokinetics, bioavailability, tissue cross reactivity, and orthologous antigen binding (para [0052]).
Regarding claim 25, Wu discloses a binding protein that binds two antigens compdsing four polypeptide chains, wherein two polypeptide chains comprise VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein:
VD1 is a first heavy chain variable domain;
VD2 is a second heavy chain vadable domain;
C is a heavy chain constant domain;
XI is a linker with the proviso that it is not CH 1;
X2 is an Fc region; and
n is 0 or 1; and
wherein two polypeptide chains comprise VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein:
VD1 is a first light chain vadable domain;
VD2 is a second light chain vadable domain;
C is a light chain constant domain;
X 1 is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 does not compdse an Fc region;and
n is 0 or 1 (para [0017]); and wherein the DVD-Ig binds at least one antigen consisting ofTNF (seq. 2)(para [0018]).
Regarding claim 26, Wu additionally teaches the binding protein according to claim 1, 3, 6, 24, or 25, wherein said binding protein has an on rate constant (Kon) to said one or more targets selected from the group consisting of: at least about 10.sup.2 M.sup.-1 S.sup.-1; at least about 10.sup.3 M.sup.-1 S.sup.-1; at least about 10.sup.4 M.sup.-1 S.sup.-1; at least about 10.sup.5 M.sup.-1 S.sup.-1; and at least about 10.sup.6 M.sup.-1 S.sup.-1 (para [0025]).
Regarding claim 27, Wu further discloses the binding protein according to claim 1, 3, 6, 24, or 25, wherein said binding protein has an off rate constant (Koff) to said one or more targets selected from the group consisting of: at most about 10.sup.-3 S.sup.-1; at most about 10.sup.-4 S.sup.-1; at most about 10.sup.-5 S.sup.-1; at most about 10.sup.-6 S.sup.-1, as measured by surface plasmon resonance (para [0026]).
Regarding claim 28, Wu also teaches the binding protein according to claim 1,3,6,24, or 25, wherein said binding protein has a dissociation constant (KD) to said one or more targets selected from the group consisting of: at most about 10.sup.-7 M; at most about 10.sup.-8 M; at most about 10.sup.-9 M (pare [0027]).
Regarding claim 29, Wu teaches a binding protein conjugate compdsing a binding protein according to any one of claims 1, 3, 6, 24, or 25, said binding protein conjugate further comprising an agent selected from the group consisting of; an immunoadhesion molecule, an imaging agent, a therapeutic agent, and a cytotoxic agent (para [0028]).
Regarding claim 30, Wu further details the binding protein conjugate according to claim 29, wherein said agent is an imaging agent selected from the group consisting of a radiolabel, an enzyme, a fluorescent label, a luminescent label, a bioluminescent label, a magnetic label, and biotin (para [0028]).
Regarding claim 31, Wu also teaches the binding protein conjugate according to claim 30, wherein said imaging agent is a radiolabel selected from the group consisting of: 3H, 14C, 35S, 90Y, 99Tc, 111 In, t 251, 131 I, 153Sm, 166Ho and 177Lu (para [0028]).
Regarding claim 32, Wu additionally discloses the binding protein conjugate according to claim 30, wherein said agent is a therapeutic or cytotoxic agent selected from the group consisting of; an anti-metabolite, an alkylating agent, an antibiotic, a growth factor, a cytokine, an anti-angiogenic agent, an anti-mitotic agent, an anthracycline, toxin, and an apoptotic agent (pare [0028]).
Regarding claim 33, Wu discloses the binding protein according to claim 1, 3, 6, 24, or 25, wherein said binding protein is a crystallized binding protein (pare [0029]).
Regarding claim 34, Wu also recites the binding protein according to claim 33, wherein said crystal is a carrier-free pharmaceutical controlled release crystal (pare [0029]).
Regarding claim 35, Wu further teaches the binding protein according to claim 33, wherein said binding protein has a greater half-life in vivo than the soluble counterpart of said binding protein (para [0029]).
Regarding claim 36, Wu details the binding protein according to claim 33, wherein said binding protein retains biological activity (para [0029]).
Regarding claim 37, Wu discloses an isolated nucleic acid encoding a binding protein amino acid sequence according to any one of claims 1, 3, 6, 24, or 25 (pare [0031]).
Regarding claim 38, Wu also teaches a vector compdsing an isolated nucleic acid according to claim 37 (para [0031])
Regarding claim 39, Wu details the vector according to claim 38, wherein said vector is selected from the group consisting of pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pcDNA3.1TOPO, pEF6 TOPO, and pBJ (para [0031]).
Regarding claim 40, Wu further discloses a host call comprising a vector according to claim 38 (para [0032]).
Regarding claim 41, Wu additionally teaches the host cell according to claim 40, wherein said host cell is a prokaryotic cell (para [0032]).
Regarding claim 42, Wu also recites the host cell according to claim 41, wherein said host cell is E.coli (para [0032]).
Regarding claim 43, Wu further teaches the host cell according to claim 40, wherein said host cell is a eukaryotic call (para [0032]).
Regarding claim 44, Wu also discloses the host cell according to claim 43, wherein said eukaryotic cell is selected from the group consisting of: a protist cell, an animal cell, a plant cell and a fungal cell (para [0032]).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY	International application No. PCT/US10/54521

Supplemental Box

Regarding claim 45, Wu teaches the host cell according to claim 43, wherein said eukaryotic cell is an animal cell selected from the group consisting of; a mammalian cell, an avian cell, and an insect cell (para [0032]).
Regrding claims 46 and 47, Wu recites the host cell according to claim 45, wherein said host cell is a CHO cell or a COS cell (para [0032]).
Regarding claims 48 and 49, Wu further discloses, the host cell according to claim 43, wherein said host cell is a yeast cell, wherein said yeast cell is Saccharomyces cerevisiae (para [0032]).
Regarding claim 50, Wu also teaches the host cell according to claim 45, wherein said host cell is an insect Sf9 cell (para [0032]).
Regarding claim 62, Wu discloss a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin that binds two antigens comprising the steps of: a) obtaining a first parent antibody or antigen binding portion thereof, that binds a first antigen; b) obtaining a second parent antibody or antigen binding portion thereof, that binds a second antigen; c) constructing first and third polypeptide chains comprising VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein:
VD1 is a first heavy chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof;
VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding portion thereof;
C is a heavy chain constant domain;
X 1 is a linker with the proviso that it is not CH 1;
X2 is an Fc region; and
n is 0 or 1; and
d) constructing second and fourth polypeptide chains comprising VDI-(X1)nVD2-C-(X2)n, wherein
VD1 is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof;
VD2 is a second light chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding thereof;
C is a light chain constant domain;
X1 is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 does not comprise an Fc region; and
n is 0 or 1; and
e) expressing said first, second, third and fourth polypeptide chains, such that a Dual Variable Domain Immunoglobulin that binds said first and said second antigen is generated (para [0046]), wherein the binding protein binds a pair of antigens consisting of TNF (seq. 2) (para [0018]) and NGF (parc [0041]).
Regarding claim 64, Wu also teaches the method of claim 62, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, and said second parent antibody or antigen binding portion thereof, are selected from the group consisting of a human antibody, a CDR grafted antibody, and a humanized antibody (para [0051]).
Regarding claim 65, Wu further details the method of claim 62, 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').sub.2 fragment, a bivalent fragment compdsing two Fab fragments linked by a disulfide bddge at the hinge region; a Fd fragment consisting of the VH and CH1 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 diabodias (para [0051]).
Regarding claim 66, Wu recites the method of claim 62, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof possesses at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin (para [0052]).
Regarding claim 67, Wu additionally teaches the method of claim 62, wherein said second parent antibody or antigen binding portion thereof possesses at least one desired property exhibited by the Dual Vadable Domain Immunoglobulin (para [0052])
Regarding claim 68, Wu further discloses the method of claim 62, wherein the Fc region is selected from the group consisting of a native sequence Fc region and a vadant sequence Fc region (para [0044]).
Regarding claim 69, Wu also teaches the method of claim 62, wherein the Fc region is selected from the group consisting of an Fc region from an IgGI, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, and IgD (para [0044]).
Regarding claim 70, Wu anticipates the method of claim 66, wherein said desired property is selected from one or more antibody parameters (para [0052]).
Regarding claim 71, Wu teaches the method of claim 67, wherein said desired property is selected from one or more antibody parameters (para [0052]).
Regarding claim 72, Wu details the method of claim 70, wherein said antibody parameters are selected from the group consisting of antigen specificity, affinity to antigen, potency, biological function, epitopa recognition, stability, solubility, production efficiency, immunogenicity, pharmacokinetics, bioavailability, tissue cross reactivity, and orthologous antigen binding (para [0052]).
Regarding claim 73, Wu recites the method of claim 71, wherein said antibody parameters are selected from the group consisting of antigen specificity, affinity to antigen, potency, biological function, epitope recognition, stability, solubility, production efficiency, immunogenicity, pharmacokinetics, bioavailability, tissue cross reactivity, and orthologous antigen binding (para [0052]).
Regarding claim 74, Wu discloses the method of claim 62, wherein said first parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said first antigen with a different affinity than the affinity with which said second parent antibody or antigen binding portion thereof, binds said second antigen (para [0050]).
Regarding claim 75, Wu anticipates the method of claim 62, 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 [0050]).
Regarding claim 76, a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin that binds two antigens with desired properties, comprising the steps of: a) obtaining a first parent antibody or antigen binding portion thereof, that binds a first antigen and possessing at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain Immunoglobulin; b) obtaining a second parent antibody or antigen binding portion thereof, that binds a second antigen and possessing at least one desired property exhibited by the Dual Variable Domain

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY	International application No. PCT/US10/54521

Supplemental Box

Immunoglobulin; c) constructing first and third polypeptide chains comprising VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein;
VD1 is a first heavy chain vadable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof;
VD2 is a second heavy chain vadable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding portion thereof;
C is a heavy chain constant domain;
X 1 is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 is an Fc region; and
n is 0 or 1;
d) constructing second and fourth polypeptide chains comprising VDI-(X1)nVD2-C-(X2)n, wherein;
VD1 is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding portion thereof;
VD2 is a second light chain vadabla domain obtained from said second parent antibody or antigen binding portion thereof;
C is a light chain constant domain;
X 1 is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 does not comprise an Fc region; and
n is 0 or 1; and
e) expressing said first, second, third and fourth polypeptide chains, such that a Dual Variable Domain Immunoglobulin that binds said first and said second antigen with desired properties is generated (para [0047]), wherein the binding protein binds a pair of antigens consisting of TNF (seq. 2)(para [0018]) and NGF (para [0041]).
Claims 2, 7, 14, 24 and 63 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Wu.
Regarding claim 2, although Wu does not explicitly recite wherein VD1 and VD2 comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO: 28, Wu teaches wherein the linker comprises the sequence ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 48)(pare [0013]), and further teaches wherein the linker may comprise "G/S based sequences (e.g G4S repeats)" (para [0197]). It would have been obvious to a person skilled in the art to repeat a linker sequence, as taught by Wu, to produce a linking region of desired length with a desirable structure and function; wherein SEQ ID NO: 28 would have been recognized by a person skilled in the art to comprise a direct repeat of SEQ ID NO: 48 of Wu.
Regarding claim 7, although Wu does not explicitly recite wherein the VDI and VD2 heavy chain variable domains comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO: 28, Wu teaches wherein the linker comprises the sequence ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 48)(para [0013]), and further teaches wherein the linker may comprise *G/S based sequences (e.g G4S repeats)" (para [0197]). It would have been obvious to a person skilled in the art to repeat a linker sequence, as taught by Wu, to produce a linking region of desired length with a desirable structure and function; wherein SEQ ID NO: 28 would have been recognized by a person skilled in the art to comprise a direct repeat of SEQ ID NO: 48 of Wu.
Regarding claim 14, although Wu does not disclose the binding protein according to claim 1, 3, or 6, wherein said VD2 of the first polypeptide chain and said VD2 of the second polypeptide chain are obtained from the same first and second parent antibody, respectively, or antigen binding portion thereof, Wu teaches first and second parent antibodies (para [0047]), and wherein the VD2 regions may be obtained from different parent antibodies (para [0048]). It would have been obvious to a person skilled in the art to parametrically form antibodies according to Wu, wherein the first VD2 region was from the first parent antibody and the second VD2 region from the second parent antibody, or wherein the first VD2 region was from the second parent antibody and the second VD2 region was from the first antibody in order to produce antibodies that bind appropriately to a selected set of target antigens.
Regarding claim 24, Wu teaches a binding protein that binds two antigens comprising four polypeptide chains, wherein two polypeptide chains comprise VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein
VD1 is a first heavy chain variable domain;
VD2 is a second heavy chain variable domain;
C is a heavy chain constant domain;
XI is a linker with the proviso that it is not CH1; and
X2 is an Fc region; and
-- wherein two polypeptide chains comprise VD 1-(X 1)n-VD2-C-(X2)n, wherein
VD1 is a first light chain variable domain;
VD2 is a second light chain variable domain;
C is a light chain constant domain;
XI is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 does not comprise an Fc region;
n is 0 or 1 (para [0017]). Although Wu does not explicitly teach wherein the VD1 and VD2 heavy chain variable domains comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO: 28, Wu teaches wherein the linker comprises the sequence ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 48)(para [0013]), and further teaches wherein the linker may comprise "G/S based sequences (e.g G4S repeats)" (para [0197]). It would have been obvious to a person skilled in the art to repeat a linker sequence, as taught by Wu, to produce a linking region of desired length with a desirable structure and function; wherein SEQ ID NO: 28 would have been recognized by a person skilled in the art to comprise a direct repeat of SEQ ID NO: 48 of Wu.
Regarding claim 63, Wu does not explicitly disclose the method of claim 62, wherein the VD1 and VD2 heavy chain variable domains comprise an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO: 28, however, Wu teaches wherein the linker comprises the sequence ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 48)(para [0013]), and further teaches wherein the linker may comprise "G/S based sequences (e.g G4S repeats)" (para [0197]). It would have been obvious to a person skilled in the art to repeat a linker sequence, as taught by Wu, to produce a linking region of desired length with a desirable structure and function; wherein SEQ ID NO: 28 would have been recognized by a person skilled in the art to comprise a direct repeat of SEQ ID NO: 48 of Wu.
Claims 1-3, 5-7, 9-15, 21-50 and 62-76 have industrial applicability under PCT Article 33(4) because the subject matter may be made or used by industry.

ANEXO

El documento que acredita 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 la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está 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

505

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. [illegible]
08 MAY 2012
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

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

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

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



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América)

Estado de) ss:

Condado de)

En este día 12 de julio de 2004, compareció Laura J. Schumacher, a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que ella es I 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.
08 MAY 2012
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

Estado de Illinois

Secretario de Estado

Springfield, Illinois

Apostilla

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

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

Certificado

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

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
08 MAY 2012
VIRVIESCAS CALVETE
CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

519

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 tuvo a la vista
Bogotá, D.C.
08 MAY 2012
VIRVIESCAS CALVETE
VEINTIUNO (EN PROP.)

4

I-168.2

520

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

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

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

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

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

Dado y firmado el 12 de Julio de 2004



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

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

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

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

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

Given and signed this 12th day of July, 2004

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
08 MAY 2012
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

522

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

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

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

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

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

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
08 MAY 2012
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

513.

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0047761

Bogotá D.C., Mayo 14 de 2012 - 17:28:36

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	186859153	14/05/2012	17.695.300.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	590.000.00	590.000.00
				$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-081792- -00000-0000

Fecha: 2012-05-17 16:05:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 523

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-081792- -00000-0000

Fecha: 2012-05-17 16:05:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 523

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO

ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- 1 ☒ Indicación que se solicita una PCT
- 3 ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- 479 ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- 523 ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 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 gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐