SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-154195- -00000-0000

Fecha: 2013-06-28 16:17:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE No. 13-154195

54. TÍTULO **"INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL BIESPECÍFICAS DE IL-1 ALFA Y BETA Y SU USO".**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 16/24**

71. SOLICITANTE **ABBVIE, INC**

DOMICILIO NORTH CHICAGO, ESTADO DE ILLINOIS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA.

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

22. BOGOTÁ, D.C. 28

(FORMA P 10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-154195- -00000-0000
Fecha: 2013-06-28 16:17:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

e radicación

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/US2011/066130	**Fecha**	20/12/11
Publicación Internacional No.	WO 2012/121775 A9	**Fecha**	13/09/12

3 (54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:

"INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL BIESPECÍFICAS DE IL-1 ALFA Y BETA Y SU USO"

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP

C07K 16/24

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.	**ABBVIE, INC.**			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN: 1 North Waukegan Road North, Chicago, IL 60064, Estados Unidos de América. No. TELÉFONO: 3264270

CIUDAD: North Chicago E-MAIL: notificacionespatentes@lloredacamacho.com

DEPARTAMENTO/ESTADO: Illinois NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estado de Delaware, 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.	WU	Chengbin	China

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificacionespatentes@lloredacamacho.com

8 DATOS INVENTOR (ES)

PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
China		Shanghai	300 Jin Xiu Road, #14, Apt. 602 Shanghai, China.

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	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
PAÍS	Colombia	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	

Sdm

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	61/425,671	10/12/21

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 Nº 13-0053551 **Fecha** 04-06-2013

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: 380
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 76
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 2
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.

VER ANEXO CD

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: 13 / 6 / 28 (AAAA / MM / DD)	Recorrido:
2020		4

Tipo de Radicación: Entrada: X Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: | Planilla:

ID	*No. Radicación*	*Consecutivo*	*Item*
1	13-154195	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	*Unidad de Conservación*
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	**Otro**
Item	***Soporte Documental***
7	CD X
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	**Otro**

Observaciones: FOLIO 3 anexos

4

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0053551

Bogotá D.C., Junio 04 de 2013 - 14:12:32

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	534292813	04/06/2013	9.912.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	500.000.00	500.000.00
				$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-154195- -00000-0000
Fecha: 2013-06-28 16:17:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-154195- -00000-0000

Fecha: 2013-06-28 16:17:34 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE U

- ☐ 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

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ 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 ☐

INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL BIESPECÍFICAS DE IL-1 ALFA Y BETA Y SU USO

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a proteínas de enlace multivalentes y multiespecíficas diseñadas, métodos de producción, y específicamente a sus usos en la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades.

SECTOR: Farmacéutico. Proteínas de enlace multivalentes y multiespecificas usados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, cáncer y otras.

INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL BIESPECÍFICAS DE IL-1 ALFA Y BETA Y SU USO

REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica la prioridad a la Solicitud Provisional de Estados Unidos Serie No. 61/425,671 presentada el 21 de Diciembre de 2010, los contenidos de la cual se incorporan en la presente.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a proteínas de enlace multivalentes y multiespecíficas, métodos de producción, y específicamente a 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 genéticamente modificadas, tales como anticuerpos multiespecíficos que enlazan dos o más antígenos son conocidos en el arte. Tales proteínas de enlace multiespecíficas se pueden generar usando fusión de células, conjugación química, o técnicas de ADN recombinante.

Los anticuerpos biespecíficos se han producido usando tecnología de quadroma (ver Milstein and Cuello (1983) Nature 305(5934):537-40) basada en la fusión somática de dos diferentes líneas celulares de hibridoma que expresan anticuerpos monoclonales murinos (mAbs) con las especificidades deseadas del

anticuerpo biespecífico. Debido al apareamiento aleatorio de dos diferentes cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina dentro de la línea celular hibridoma híbrida (o quadroma) resultante, se generan hasta diez diferentes especies de Ig, de las cuales solo uno es el anticuerpo biespecífico funcional. La presencia de subproductos mal apareados, y rendimientos de producción significativamente reducidos, significa que se requieren procedimientos de purificación sofisticados.

Los anticuerpos biespecíficos también se pueden producir por conjugación química de dos diferentes mAbs (ver Staerz et al. (1985) Nature 314(6012):628-31). Este procedimiento no produce preparación homogénea. Otros procedimientos han usado conjugación química de dos diferentes mAbs o fragmentos de anticuerpo menores (ver Brennan et al. (1985) Science 229(4708):81-3).

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

Una amplia variedad de otros formatos de anticuerpo biespecífico recombinante se ha desarrollado (ver Kriangkum et al. (2001) Biomol. Eng. 18(2):31-40). Entre ellos los diacuerpos y moléculas de Fv de cadena única en

tándem, y varios derivados de los mismos, son los más ampliamente usados. Rutinariamente, la construcción de estas moléculas inicia de dos fragmentos Fv de cadena única (scFv) que reconocen diferentes antígenos (ver Economides et al. (2003) Nat. Med. 9(1):47-52). Las moléculas de scFv en tándem (taFv) representan un formato directo que conecta simplemente las dos moléculas de scFv con un enlazante de péptido adicional. Los dos fragmentos scFv presentes en estas moléculas de scFv en tándem forman entidades de plegamiento separadas. Se pueden usar varios enlazantes para conectar los dos fragmentos scFv y enlazantes con una longitud de hasta 63 residuos (ver Nakanishi et al. (2001) Ann. Rev. Immunol. 19:423-74). Aunque los fragmentos scFv parentales se pueden expresar normalmente en forma soluble en bacterias, sin embargo, frecuentemente se observa que las moléculas de scFv en tándem forman agregados insolubles en bacterias. Por lo tanto, los protocolos de replegamiento o el uso de sistemas de expresión de mamífero se aplican rutinariamente para producir moléculas de scFv en tándem solubles. En un estudio reciente, se reportó la expresión *in vivo* por vacas y conejos transgénicos de un scFv en tándem dirigido contra CD28 y un proteoglicano asociado a melanoma (ver Gracie et al. (1999) J. Clin. Invest. 104(10):1393-401). En este constructo, las dos moléculas de scFv se conectaron por un enlazante CH1 y se encontraron concentraciones en suero de hasta 100 mg/L del anticuerpo biespecífico. Varias estrategias que incluyen variaciones del orden de dominio o que usan enlazantes intermedios con flexibilidad o longitud variada se emplearon para permitir la expresión soluble en bacterias. Unos pocos estudios ahora han reportado la expresión de moléculas de scFv en tándem solubles en bacterias (ver Leung et al. (2000) J. Immunol. 164(12):6495-502; Ito et

al. (2003) J. Immunol. 170(9):4802-9; Kami et al. (2002) J. Neuroimmunol. 125(1-2):134-40) usando ya sea un enlazante Ala3 muyr corto o enlazantes ricos en glicina/serina largos. En un estudio reciente, la expresión en fagos de un reportero de scFv en tándem que contiene enlazantes intermedios aleatorizados con una longitud de 3 o 6 residuos se empleó para enriquecer aquellas moléculas que se producen en forma soluble y activa en bacterias. Este procedimiento resultó en el aislamiento de una molécula de scFv en tándem con un enlazante de 6 residuos aminoácidos (ver Arndt and Krauss (2003) Methods Mol. Biol. 207:305-21). No está claro si esta secuencia de enlazante representa una solución general a la expresión soluble de moléculas de scFv en tándem. No obstante, este estudio demostró que la expresión de fagos de moléculas de scFv en tándem en combinación con la mutagénesis dirigida es una herramienta poderosa para enriquecer estas moléculas, las cuales se pueden expresar en bacterias en una forma activa.

Los diacuerpos biespecíficos (Db) utilizan el formato de diacuerpo para expresión. Los diacuerpos se producen de fragmentos scFv reduciendo la longitud del enlazante que conecta el dominio VH y VL a aproximadamente 5 residuos (ver Peipp and Valerius (2002) Biochem. Soc. Trans. 30(4):507-11). Esta reducción de tamaño de enlazante facilita la dimerización de dos cadenas de polipéptido por apareamiento cruzado de los dominios VH y VL. Los diacuerpos biespecíficos se producen expresando, dos cadenas de polipéptido con, ya sea la estructura VHA-VLB y VHB-VLA (configuración VH-VL), o VLA-VHB y VLB-VHA (configuración VL-VH) dentro de la misma célula. Una gran variedad de diferentes diacuerpos biespecíficos se han producido en el pasado y la mayoría de ellos se

expresan en forma soluble en bacterias. Sin embargo, un estudio comparativo reciente demuestra que la orientación de los dominios variables puede influir en la expresión y formación de sitios de enlace activos (ver Mack et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(15):7021-5). No obstante, la expresión soluble en bacterias representa una ventaja importante sobre las moléculas de scFv en tándem. Sin embargo, puesto que dos diferentes cadenas de polipéptido se expresan dentro de una célula única se pueden producir homodímeros inactivos junto con heterodímeros activos. Esto necesita la implementación de etapas de purificación adicionales para obtener preparaciones homogéneas de diacuerpos biespecíficos. Un procedimiento para forzar la generación de diacuerpos biespecíficos es la producción de diacuerpos de botón en ojal (ver Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14):6444-8.18). Esto se demostró para un diacuerpo biespecífico dirigido contra HER2 y CD3. Un botón grande se introdujo en el dominio VH intercambiando Val37 con Phe y Leu 45 con Trp y un ojal complementario se produjo en el dominio VL mutando Phe98 a Met y Tyr87 a Ala, ya sea en los dominios variables anti-HER2 o anti-CD3. Usando este procedimiento, la producción de diacuerpos biespecíficos podría ser incrementada desde 72% por el diacuerpo parental a más de 90% por el diacuerpo de botón en ojal. De manera importante, la producción produce solo una poca disminución como un resultado de estas mutaciones. Sin embargo, una reducción en la actividad de enlace de antígeno se observó para varios constructos. Por consiguiente, este procedimiento más bien elaborado requiere el análisis de varios constructos para identificar aquellas mutaciones que producen molécula heterodimérica con actividad de enlace no alterada. Además, tal procedimiento

requiere la modificación mutacional de la secuencia de inmunoglobulina en la región constante, creando así la forma no nativa y no natural de la secuencia de anticuerpo, lo cual puede resultar en inmunogenicidad incrementada, pobre estabilidad *in vivo*, así como también farmacocinética indeseable.

Los diacuerpos de cadena única (scDb) representan una estrategia alternativa para mejorar la formación de moléculas tipo diacuerpo biespecífico (ver Holliger and Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4):128-30; Wu et al. (1996) Immunotechnology 2(1):21-36). Los diacuerpos de cadena única biespecíficos se producen conectando las dos cadenas de polipéptido formadoras de diacuerpo con un enlazante intermedio adicional con una longitud de aproximadamente 15 residuos aminoácido. En consecuencia, todas las moléculas con un peso molecular correspondiente a diacuerpos de cadena única monoméricos (50-60 kDa) son biespecíficas. Diversos estudios han demostrado que los diacuerpos de cadena única biespecíficos se expresan en bacterias en forma soluble y activa con la mayoría de las moléculas purificadas presentes como monómeros (ver Holliger and Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4): 128-30; Wu et al. (1996) Immunotechnol. 2(1):21-36; Pluckthun and Pack (1997) Immunotechnol. 3(2):83-105; Ridgway et al. (1996) Protein Engin. 9(7):617-21). Por consiguiente, los diacuerpos de cadena única combinan las ventajas de scFvs en tándem (todos los monómeros son biespecíficos) y diacuerpos (expresión soluble en bacterias).

Más recientemente, los diacuerpos se han fusionado a Fc para generar más moléculas tipo Ig, llamados di-diacuerpos (ver Lu et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(4):2856-65). Además, los constructos de anticuerpo multivalente que

comprenden dos repeticiones de Fab en la cadena pesada de una IgG y que enlazan cuatro moléculas de antígeno se han descrito (ver Publicación PCT No. WO 0177342, y Miller et al. (2003) J. Immunol. 170(9):4854-61).

Existe una necesidad en el arte de proteínas de enlace multivalentes mejoradas que enlacen dos o más antígenos. La Patente de Estados Unidos No. 7,612,181 proporciona una nueva familia de proteínas de enlace que enlazan dos o más antígenos con alta afinidad, y las cuales son llamadas inmunoglobulinas de dominio variable dual (DVD-Ig™). La presente invención proporciona además nuevas proteínas de enlace que enlazan dos o más antígenos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Esta invención pertenece a proteínas de enlace multivalentes que enlazan dos o más antígenos. La presente invención proporciona una nueva familia de proteínas de enlace que enlazan dos o más antígenos con alta afinidad.

En una modalidad, la invención proporciona una proteína de enlace que comprende una cadena de polipéptidos, en donde la cadena de polipéptidos 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 una región Fc y n es 0 o 1. En una modalidad, el VD1 y VD2 en la proteína de enlace son dominios variables de cadena pesada. En otra modalidad, el dominio variable de cadena pesada se selecciona del grupo que consiste de un dominio variable de cadena pesada murino, un dominio variable de cadena pesada humano, un dominio variable de cadena pesada injertado a CDR, y un dominio variable de cadena pesada humanizado. En todavía otra modalidad, VD1 y VD2

enlazan el mismo antígeno. En otra modalidad, VD1 y VD2 enlazan diferentes antígenos. En aún otra modalidad, C es un dominio constante de cadena pesada. Por ejemplo, X1 es un enlazante con la condición que X1 no sea CH1. Por ejemplo, X1 es un enlazante seleccionado del grupo que consiste de AKTTPKLEEGEFSEAR (SEC ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEC ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEC ID NO: 4); SAKTTP (SEC ID NO: 5); RADAAP (SEC ID NO: 6); RADAAPTVS (SEC ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEC ID NO: 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEC ID NO: 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 10); ADAAP (SEC ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEC ID NO: 12); TVAAP (SEC ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEC ID NO: 14); QPKAAP (SEC ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEC ID NO: 16); AKTTPP (SEC ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEC ID NO: 18); AKTTAP (SEC ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEC ID NO: 20); ASTKGP (SEC ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEC ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID NO: 25); GHEAAAVMQVQYP AS (SEC ID NO: 26); TVAAPSVFIFPPTV AAPSVFIFPP (SEC ID NO: 27); y ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO: 28). En una modalidad, X2 es una región Fc. En otra modalidad, X2 es una región Fc variante.

En una modalidad, las proteínas de enlace descritas en la presente comprenden una cadena de polipéptidos, en donde la cadena de polipéptidos comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, C es un dominio constante de cadena pesada, X1 es un enlazante con la condición que

no sea CH1, y X2 es una región Fc.

En una modalidad, VD1 y VD2 en la proteína de enlace son dominios variables de cadena ligera. En una modalidad, el dominio variable de cadena ligera se selecciona del grupo que consiste de un dominio variable de cadena ligera murino, un dominio variable de cadena ligera humano, un dominio variable de cadena ligera injertado a CDR, y un dominio variable de cadena ligera humanizado. En una modalidad, VD1 y VD2 enlazan el mismo antígeno. En otra modalidad, VD1 y VD2 enlazan diferentes antígenos. En una modalidad, C es un dominio constante de cadena ligera. En otra modalidad, X1 es un enlazante con la condición que X1 no sea CL1. En una modalidad, X1 es un enlazante seleccionado del grupo que consiste de AKTTPKLEEGEFSEAR (SEC ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEC ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEC ID NO: 4); SAKTTP (SEC ID NO: 5); RADAAP (SEC ID NO: 6); RADAAPTVS (SEC ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEC ID NO: 8); RADAAAA(G4S)4 (SEC ID NO: 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 10); ADAAP (SEC ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEC ID NO: 12); TVAAP (SEC ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEC ID NO: 14); QPKAAP (SEC ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEC ID NO: 16); AKTTPP (SEC ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEC ID NO: 18); AKTTAP (SEC ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEC ID NO: 20); ASTKGP (SEC ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEC ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID NO: 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEC ID NO: 26); TVAAPSVFIFPPTV AAPSVFIFPP (SEC ID NO:27); y ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO: 28). En una

modalidad, la proteína de enlace no comprende X2.

En una modalidad, tanto las cadenas pesada variable como ligera variable comprenden el mismo enlazante. En otra modalidad, las cadenas pesada variable y ligera variable comprenden diferentes enlazantes. En otra modalidad, tanto las cadenas pesada variable como ligera variable comprenden un enlazante corto (aproximadamente 6 aminoácidos). En otra modalidad, tanto las cadenas pesada variable como ligera variable comprenden un enlazante largo (más de 6 aminoácidos). En otra modalidad, la cadena pesada variable comprende un enlazante corto y la cadena ligera variable comprende un enlazante largo. En otra modalidad, la cadena pesada variable comprende un enlazante largo y la cadena ligera variable comprende un enlazante corto.

En una modalidad, las proteínas de enlace descritas en la presente comprenden una cadena de polipéptidos, en donde la cadena de polipéptidos comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera, VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera, C es un dominio constante de cadena ligera, X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1, y X2 no comprende una región Fc.

En otra modalidad, la invención proporciona una proteína de enlace que comprende dos cadenas de polipéptidos, en donde la primera cadena de polipéptidos comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, C es un dominio constante de cadena pesada, X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1, y X2 es una región Fc; y la segunda cadena de polipéptidos comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer

dominio variable de cadena ligera, VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera, C es un dominio constante de cadena ligera, X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1, y X2 no comprende una región Fc. En una modalidad particular, la proteína de enlace de Dominio Variable Dual (DVD) comprende cuatro cadenas de polipéptidos en donde las primeras dos cadenas de polipéptidos comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, respectivamente, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, C es un dominio constante de cadena pesada, X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1, y X2 es una región Fc; y las segundas dos cadenas de polipéptidos comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n respectivamente, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera, VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera, C es un dominio constante de cadena ligera, X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1, y X2 no comprende una región Fc. Tal proteína de enlace de Dominio Variable Dual (DVD) tiene cuatro sitios de enlace de antígeno.

En otra modalidad, las proteínas de enlace descritas en la presente enlazan uno o más objetivos. En una modalidad, el objetivo se selecciona del grupo que consiste de citocinas, proteínas de superficie celular, enzimas y receptores. En otra modalidad, la proteína de enlace modula una función biológica de uno o más objetivos. En otra modalidad, la proteína de enlace neutraliza uno o más objetivos. Las proteínas de enlace de la invención enlazan citocinas seleccionadas del grupo que consiste de linfocinas, monocinas, hormonas de polipéptido, receptores, o marcadores de tumor. Por ejemplo, las DVD-Igs de la invención son capaces de enlazar dos o más de las siguientes: Interleucina-1 alfa

(IL-Iα) e Interleucina-1 beta (IL-Iβ).

En una modalidad, la proteína de enlace que enlaza IL-1α (sec. 3) e IL-1β (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD-Ig de SEC ID NO. 52 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de DVD-Ig de SEC ID NO. 53.

En una modalidad, la proteína de enlace que enlaza IL-1α (sec. 2) e IL-1β (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD-Ig seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO. 54 y SEC ID NO. 56; y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de DVD-Ig seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO. 55 y SEC ID NO. 57. En una modalidad, la proteína de enlace que enlaza IL-1α (sec. 2) e IL-1β (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD-Ig de SEC ID NO. 54 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de DVD-Ig de SEC ID NO: 55. En otra modalidad, la proteína de enlace que enlaza IL-1α (sec. 2) e IL-1β (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD-Ig de SEC ID NO. 56 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de DVD-Ig de SEC ID NO: 57.

En una modalidad, la proteína de enlace que enlaza IL-1α (sec. 1) e IL-1β (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD-Ig seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO. 58 y SEC ID NO. 60; y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de DVD-Ig seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO. 59 y SEC ID NO. 61. En una modalidad, la proteína de enlace que enlaza IL-1α (sec. 1) e IL-1β (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD-Ig de SEC ID NO. 58 y una

secuencia de aminoácidos de cadena ligera de DVD-Ig de SEC ID NO: 59. En otra modalidad, la proteína de enlace que enlaza IL-1α (sec. 1) e IL-1β (sec. 1) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD-Ig de SEC ID NO. 60 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de DVD-Ig de SEC ID NO: 61.

En una modalidad, la proteína de enlace que enlaza IL-1α (sec. 3) e IL-1β (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD-Ig de SEC ID NO. 62 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de DVD-Ig de SEC ID NO. 63.

En una modalidad, la proteína de enlace que enlaza IL-1α (sec. 4) e IL-1β (sec. 2) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD-Ig de SEC ID NO. 64 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de DVD-Ig de SEC ID NO. 65.

En una modalidad, la proteína de enlace que enlaza IL-1α (sec. 4) e IL-1β (sec. 3) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD-Ig de SEC ID NO. 66 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de DVD-Ig de SEC ID NO. 67.

En una modalidad, la proteína de enlace que enlaza IL-1α (sec. 4) e IL-1β (sec. 4) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD-Ig de SEC ID NO. 68 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de DVD-Ig de SEC ID NO. 69.

En una modalidad, la proteína de enlace que enlaza IL-1α (sec. 4) e IL-1β (sec. 5) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de DVD-Ig de SEC ID NO. 70 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de

DVD-Ig de SEC ID NO. 71.

En otra modalidad, la invención proporciona una proteína de enlace que comprende una cadena de polipéptidos, en donde la cadena de polipéptidos comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo progenitor, o porción de enlace de antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo progenitor, o porción de enlace de antígeno del mismo, el cual puede ser el mismo o diferente del primer anticuerpo progenitor; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde el (X1)n ya sea está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde el (X2)n ya sea está presente o ausente. En una modalidad, la región Fc está ausente de la proteína de enlace.

En otra modalidad, la invención proporciona una proteína de enlace que comprende una cadena de polipéptidos, en donde la cadena de polipéptidos comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, el cual puede ser el mismo o diferente del primer anticuerpo progenitor; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde el (X1)n ya sea está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde el (X2)n ya sea está presente o ausente. En una modalidad, (X2)n está ausente de la proteína de enlace.

En otra modalidad, la proteína de enlace de la invención comprende

primera y segunda cadenas de polipéptidos, en donde la primera cadena de polipéptidos comprende un primer VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, el cual puede ser el mismo o diferente del primer anticuerpo progenitor; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde el (X1)n ya sea está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde el (X2)n ya sea está presente o ausente; y en donde la segunda cadena de polipéptidos comprende un segundo VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, el cual puede ser el mismo o diferente del primer anticuerpo progenitor; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde el (X1)n ya sea está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde el (X2)n ya sea está presente o ausente. En otra modalidad, la proteína de enlace comprende dos primeras cadenas de polipéptidos y dos segundas cadenas de polipéptidos. En todavía otra modalidad, (X2)n está ausente del segundo polipéptido. En aún otra modalidad, la región Fc, si está presente en el primer polipéptido se selecciona del grupo que consiste de región Fc de secuencia nativa y una región Fc de secuencia variante. En aún otra modalidad, la región Fc se selecciona del grupo que consiste

de una región Fc de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, y una IgD.

En otra modalidad, la proteína de enlace de la invención es una DVD-Ig que enlaza dos antígenos que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, en donde, cada una de las primera y tercera cadenas de polipéptidos comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, el cual puede ser el mismo o diferente del primer anticuerpo progenitor; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde el (X1)n ya sea está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde el (X2)n ya sea está presente o ausente; y en donde cada una de las segunda y cuarta cadenas de polipéptido comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, el cual puede ser el mismo o diferente del primer anticuerpo progenitor; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde el (X1)n ya sea está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde el (X2)n ya sea está presente o ausente.´

La invención proporciona un método para producir una proteína de enlace de DVD-Ig preseleccionando los anticuerpos progenitores. En una modalidad, el método para producir una Inmunoglobulina de Dominio Variable que

enlaza dos antígenos que comprende las etapas de a) obtener un primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, que enlaza un primer antígeno; b) obtener un segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, que enlaza un segundo antígeno; c) construir primera y tercera cadenas de polipéptidos, 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 del primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido del segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, el cual puede ser el mismo o diferente del primer anticuerpo progenitor; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde el (X1)n ya sea está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde el (X2)n ya sea está presente o ausente; d) construir segunda y cuarta cadenas de polipéptidos, cada una de las cuales comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido del primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido del segundo anticuerpo progenitor o enlace de antígeno del mismo, el cual puede ser el mismo o diferente del primer anticuerpo progenitor; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde el (X1)n ya sea está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde el (X2)n ya sea está presente o ausente; y e) expresar las primera, segunda, tercera y cuarta cadenas de polipéptidos; de modo que se genera una molécula de DVD-Ig que enlaza el primer y segundo antígeno.

En aún otra modalidad, la invención proporciona un método para generar una molécula de DVD-Ig que enlaza dos antígenos con propiedades deseadas que comprende las etapas de a) obtener un primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, que enlaza un primer antígeno y que posee al menos una propiedad deseada exhibida por la molécula de DVD-Ig; b) obtener un segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, que enlaza un segundo antígeno y que posee al menos una propiedad exhibida deseada por la molécula de DVD-Ig; c) construir primera y tercera cadenas de polipéptidos que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido del primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido del segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, el cual puede ser el mismo o diferente del primer anticuerpo progenitor; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde el (X1)n ya sea está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde el (X2)n ya sea está presente o ausente; d) construir segunda y cuarta cadenas de polipéptidos que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido del primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido del segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, el cual puede ser el mismo o diferente del primer anticuerpo progenitor; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlazante con la condición que no sea CH1, en donde el (X1)n ya sea está presente o ausente; y

(X2)n no comprende una región Fc, en donde el (X2)n ya sea está presente o ausente; e) expresar las primera, segunda, tercera y cuarta cadenas de polipéptidos; de modo que se genera una Inmunoglobulina de Dominio Variable que enlaza el primero y el segundo antígeno con propiedades deseadas.

En una modalidad, el VD1 de las primera y segunda cadenas de polipéptidos descritas en la presente se obtienen del mismo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo. En otra modalidad, el VD1 de las primera y segunda cadenas de polipéptidos descritas en la presente se obtienen de diferentes anticuerpos progenitores o porciones de enlace de antígeno de los mismos. En otra modalidad, el VD2 de las primera y segunda cadenas de polipéptidos descritas en la presente se obtienen del mismo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo. En otra modalidad, el VD2 de las primera y segunda cadenas de polipéptidos descritas en la presente se obtienen de diferentes anticuerpos progenitores o porciones de enlace de antígeno de los mismos.

En una modalidad, el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, son los mismos anticuerpos. En otra modalidad el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, son diferentes anticuerpos.

En una modalidad, el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza un primer antígeno y el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza un segundo

antígeno. En una modalidad particular, los primer y segundo antígenos son los mismos antígenos. En otra modalidad, los anticuerpos progenitores enlazan diferentes epítopes en el mismo antígeno. En otra modalidad los primer y segundo antígenos son antígenos diferentes. En otra modalidad, el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza el primer antígeno con una potencia diferente de la potencia con la cual el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza el segundo antígeno. En todavía otra modalidad, el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza el primer antígeno con una afinidad diferente de la afinidad con la cual el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza el segundo antígeno.

En otra modalidad el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, se seleccionan del grupo que consiste de, anticuerpo humano, anticuerpo injertado a CDR, y anticuerpo humanizado. En una modalidad, las porciones de enlace de antígeno se seleccionan del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región de bisagra; un fragmento Fd que consiste de los dominios de VH y CH1; un fragmento Fv que consiste de los dominios de VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, un fragmento dAb, una región determinante de complementariedad aislada (CDR), un anticuerpo de cadena única, y diacuerpos.

En otra modalidad, la proteína de enlace de la invención posee al menos una propiedad deseada exhibida por el primer anticuerpo progenitor o

porción de enlace de antígeno del mismo, o el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo. Alternativamente, el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo y el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo posee al menos una propiedad deseada exhibida por la Inmunoglobulina de Dominio Variable. En una modalidad, la propiedad deseada se selecciona de uno o más parámetros de anticuerpo. En otra modalidad, los parámetros de anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítope, estabilidad, solubilidad, eficiencia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y enlace de antígeno ortólogo. En una modalidad, la proteína de enlace es multivalente. En otra modalidad, la proteína de enlace es multiespecífica. Las proteínas de enlace multivalente y/o multiespecíficas descritas en la presente tienen propiedades deseables particularmente desde un punto de vista terapéutico. Por ejemplo, la proteína de enlace 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 enlazan; (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 se enlaza también. El “anticuerpo progenitor” el cual proporciona al menos una especificidad de enlace de antígeno de las proteínas de enlace multivalentes y/o multiespecíficas puede ser uno el cual es internalizado (y/o catabolizado) por una célula que expresa un antígeno al cual el anticuerpo se enlaza; y/o puede ser un anticuerpo agonista, inductor de muerte celular y/o inductor de apoptosis, y la proteína de enlace

multivalente y/o multiespecífica como se describe en la presente puede exhibir mejorías en una o más de estas propiedades. Además, el anticuerpo progenitor puede carecer de una o más de estas propiedades, pero puede estar dotado con las mismas cuando se construye como una proteína de enlace multivalente como se describe en la presente.

En otra modalidad, la proteína de enlace de la invención tiene una constante de velocidad de asociación (Kon) para uno o más objetivos seleccionados del grupo que consiste de: al menos aproximadamente $10^2M^{-1}S^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3M^{-1}S^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4M^{-1}S^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5M^{-1}S^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6M^{-1}S^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón superficial. En una modalidad, la proteína de enlace de la invención tiene una constante de velocidad de asociación (Kon) para uno o más objetivos entre aproximadamente $10^2M^{-1}S^{-1}$ y aproximadamente $10^3M^{-1}S^{-1}$; entre aproximadamente $10^3M^{-1}S^{-1}$ y aproximadamente $10^4M^{-1}S^{-1}$; entre aproximadamente $10^4M^{-1}S^{-1}$ y aproximadamente $10^5M^{-1}S^{-1}$; o entre aproximadamente $10^5M^{-1}S^{-1}$ y aproximadamente $10^6M^{-1}S^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón superficial.

En otra modalidad, la proteína de enlace tiene una constante de velocidad de disociación (Koff) para uno o más objetivos seleccionados del grupo que consiste de: a lo sumo aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; a lo sumo aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; a lo sumo aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; y a lo sumo aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón superficial. En una modalidad, la proteína de enlace de la invención tiene una constante de velocidad de disociación (Koff) para uno o más objetivos de aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$ a aproximadamente

$10^{-4}s^{-1}$; de aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$ a aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; o de aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$ a aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón superficial.

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

En otra modalidad, las proteínas de enlace descritas en la presente son conjugados que adicionalmente comprenden un agente seleccionado del grupo que consiste de una molécula de inmunoadhesión, un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico, y un agente citotóxico. En una modalidad, el agente de formación de imágenes se selecciona del grupo que consiste de una radioetiqueta, una enzima, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta bioluminiscente, una etiqueta magnética, y biotina. En otra modalidad, el agente de formación de imágenes es una radioetiqueta seleccionada del grupo que consiste de: ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, y ^{153}Sm. En

todavía otra modalidad, el agente terapéutico o citotóxico se selecciona del grupo que consiste de un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, toxina, y un agente apoptótico.

En otra modalidad, las proteínas de enlace descritas en la presente enlazan una proteína celular y un agente seleccionado del grupo que consiste de una molécula de inmunoadhesión, un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico, y un agente citotóxico. En una modalidad, el agente de formación de imágenes se selecciona del grupo que consiste de una radioetiqueta, una enzima, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta bioluminiscente, una etiqueta magnética, y biotina.

En otra modalidad, el agente de formación de imágenes es una radioetiqueta seleccionada del grupo que consiste de ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, y ^{sure}Sm. En todavía otra modalidad, el agente terapéutico o citotóxico se selecciona del grupo que consiste de un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, toxina, y un agente apoptótico.

En otra modalidad, las proteínas de enlace descritas en la presente son una proteína de enlace cristalizada y existen como un cristal. En una modalidad, el cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico libre de portador. En todavía otra modalidad, la proteína de enlace cristalizada tiene una vida media mayor in vivo que la contraparte soluble de la proteína de enlace. En aún otra modalidad, la proteína de enlace cristalizada retiene actividad biológica.

En otra modalidad, las proteínas de enlace descritas en la presente son glicosiladas. Por ejemplo, la glicosilación es un patrón de glicosilación humana.

Un aspecto de la invención pertenece a un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de las proteínas de enlace descritas en la presente. Una modalidad adicional proporciona un vector que comprende el ácido nucleico aislado descrito en la presente en donde el vector se selecciona del grupo que consiste de pcADN; pTT (Durocher et al. (2002) Nucl. Acids Res. 30:2; pTT3 (pTT con múltiple sitio de clonación adicional; pEFBOS (Mizushima and Nagata, (1990) Nucl. Acids Res. 18:17); pBV; pJV; pcADN3.1 TOPO, pEF6 TOPO y pBJ. En una modalidad, el vector es un vector descrito en la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 20090239259.

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

En una modalidad, dos o más DVD-Igs, por ejemplo, con diferentes especificidades, se producen en una célula huésped recombinante única. Por ejemplo, la expresión de una mezcla de anticuerpos se ha llamado Oligoclonics™ Merus B.V., The Netherlands; Patentes de Estados Unidos Nos. 7,262,028 y

7,429,486.

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

Una modalidad proporciona una composición para la liberación de una proteína de enlace en donde la composición comprende una formulación que a su vez comprende una proteína de enlace cristalizada, como se describe en la presente, y un ingrediente, y al menos un portador polimérico. Por ejemplo, el portador polimérico comprende uno o más polímeros seleccionados del grupo que consiste de poli (ácido acrílico), poli (cianoacrilatos), poli (aminoácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (b-hidroxibutirato), poli (caprolactona), poli (dioxanona); poli (etilenglicol), poli ((hidroxipropil) metacrilamida, poli [(órgano)fosfaceno], poli (orto ésteres), poli (alcohol vinílico), poli (vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico-éter alquil vinílico, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos. Por ejemplo, el ingrediente se selecciona del grupo

que consiste de albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil-B-ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol. Otra modalidad proporciona un método para tratar un mamífero que comprende la etapa de administrar al mamífero una cantidad efectiva de la composición descrita en la presente.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de enlace, como se describe en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad adicional, la composición farmacéutica comprende al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno. Por ejemplo, el agente adicional se selecciona del grupo que consiste de: un agente terapéutico, un agente de formación de imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de angiogénesis (incluyendo pero no limitado a un anticuerpo anti-VEGF o una tramapa de VEGF), un inhibidor de cinasa (incluyendo pero no limitado a una KDR y un inhibidor de TIE-2), un bloqueador de molécula de co-estimulación (incluyendo pero no limitado a anti-B7.1, anti-B7.2, CTLA4-Ig, anti-CD20), un bloqueador de molécula de adhesión (incluyendo pero no limitado a un anticuerpo anti-LFA-1, un anticuerpo anti-E/L selectina, un inhibidor de molécula pequeña), un anticuerpo anti-citocina o fragmento funcional del mismo (incluyendo pero no limitado a un anticuerpo de receptor anti-IL-18, anti-TNF, y anti-IL-6/citocina), metotrexato, ciclosporina, rapamicina, FK506, una etiqueta detectable o reportero, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco anti-inflamatorio no esteroide (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticoesteroide, un esteroide anabólico, una eritroproyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una

hormona del crecimiento, un fármaco de remplazo de hormonas, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citocina, y un antagonista de citocina.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar un sujeto humano que sufre de un trastorno en el cual el objetivo, u objetivos, capaces de ser unidos por la proteína de enlace descrita en la presente es nocivo, que comprende administrar al sujeto humano una proteína de enlace descrita en la presente de modo que la actividad del objetivo, u objetivos, en el sujeto humano se inhibe y uno o más síntomas se alivian o se logra 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 ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus insulinodependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis escleroderma, enfermedad de injerto versus huésped, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, Enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, Purpúrea de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasíticas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversal aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson,

enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, malignidades, insuficiencia cardiaca, infarto al miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular esporádica tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria (aguda) en adultos, alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriática, artropatía colítica ulcerativa, sinovitis enteropática, clamidia, yersinia y artropatía asociada con salmonella, espondiloartropatía, arterioesclerosis/enfermedad ateromatosa, alergia atópica, enfermedad bulosa autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica positiva de Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, enfermedad de Royal Free/encefalitis miálgica, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, Síndrome de Enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida, Enfermedades Relacionadas con Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, insuficiencia de ovarios, insuficiencia de ovarios prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad de tejido conjuntivo asociada con enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad de tejido conjuntivo mezclada asociada con enfermedad pulmonar, esclerosis sistémica asociada con enfermedad pulmonar intersticial, artritis reumatoide asociada con enfermedad pulmonar intersticial, lupus eritematoso sistémico asociado con enfermedad pulmonar,

dermatomiositis/polimiositis asociada con enfermedad pulmonar, enfermedad de Sjörgren asociada con enfermedad pulmonar, espondilitis anquilosante asociada con enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, hemosiderosis asociada con enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármaco, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrante linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial post-infecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo 1 (hepatitis lupoide o autoinmune clásica), hepatitis autoinmune tipo 2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM), hipoglicemia mediada autoinmune, resistencia a insulina tipo B con acanthosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con trasplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada con trasplante de órganos, osteoartrosis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2, luecopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de lyme, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad de espermas, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpatética, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad de tejido conjuntivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, Enfermedad de Still, esclerosis sistémica, Síndrome de Sjörgren, Arteritis/enfermedad de Takayasu, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad de tiroides autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitíligo,

enfermedad hepática aguda, enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis alcohólicas, lesión hepática inducida por alcohol, coleosatatis, enfermedad hepática idiosincrática, hepatitis inducida por fármaco, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por estreptococos de grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas tipo Th2 y tipo Th1, dolor agudo y crónico (formas diferentes de dolor), y cánceres tales como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovarios, próstata y rectal y malignidades hematopoyéticas (leucemia y linfoma), Abetalipoproteinemia, Acrocianosis, procesos infecciosos o parasíticos agudos y 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 por SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica por contacto, rinitis alérgica, rechazo de aloinjerto, deficiencia de antitripsina alfa-1, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de células del cuerno anterior, terapia anti-cd3, síndrome antifosfolípidos, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticas y periféricas, disección aórtica, hipertensión arterial, arterioesclerosis, fistula arteriovenosa, ataxia, fibrilación atrial (sostenida o paroxismal), aleteo atrial, bloque atrioventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto de huesos, rechazo de trasplante de médula ósea (BMT), bloque de ramificación de haces, linfoma de Burkitt, quemaduras, arritmias cardiacas, síndrome de aturdimiento cardiaco, tumores cardiacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación de desvío cardiopulmonar, rechazo de trasplante de cartílago, degeneraciones córticas

cerebelares, trastornos cerebelares, taquicardia atrial caótica o multifocal, trastornos asociados con 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 arteria coronaria, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis en cultivo negativo, fibrosis quística, trastornos asociados con terapia de citocina, Demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre por dengue hemorrágico, dermatitis, afecciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad diabética aterioesclerótica, enfermedad de cuerpo de Lewy difuso, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos de los ganglios basales, síndrome de Down en edad media, trastornos del movimiento inducidos por fármacos inducidos por fármacos los cuales bloquean los receptores de dopamina del SNC, sensibilidad a fármacos, eczema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por virus de epstein-barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y cerebelares, linfohistiocitosis hematofagocítica familiar, rechazo de implante del timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos arteriales periféricos funcionales, sepsis fúngica, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, sepsis gram negativa, sepsis gram positiva, granulomas debido a organismos intracelulares, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hallerrorden-Spatz, tiroiditis de hashimoto, fiebre del heno, rechazo de trasplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, púrpura trombocitopénica trombolítica/síndrome urémico hemolítico, hemorragia, hepatitis (A), arritmias de

haz His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimiento hipercinático, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos del movimiento hipocinético, evaluación del eje hipotalámico-pituitaria-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpo, Astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza a, exposición a radiación ionizante, neuritis iridociclitis/uveítis/óptica, lesión por isquemia-reperfusión, apoplejía isquémica, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo de trasplante de riñón, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo de trasplante de hígado, linfedema, malaria, Linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococemia, enfermedades metabólicas/idiopáticas, cefalea por migraña, mitocondrial, trastorno de sistemas múltiples, enfermedad de tejido conjuntivo mezclada, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, mycobacterium avium intracellulare, mycobacterium tuberculosis, síndrome mielodiplásico, infarto al miocardio, trastornos isquémicos miocárdicos, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofias musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma no de hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos arteriales oclusivos, terapia de okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos inversos de vasectomía/orquitis, organomegalia, osteoporosis, rechazo de trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome

paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad, rechazo de trasplante de paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad pericardiaca, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía por pneumocystis carinii, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal, y síndrome de cambios de la piel), síndrome de post-perfusión, síndrome de post-bomba, síndrome de cardiotomía post-MI, preeclampsia, parálisis de supranúcleo progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación, Enfermedad y fenómeno de Raynaud, enfermedad de Raynoud, enfermedad de Refsum, taquicardia de QRS estrecha regula, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, Demencia senil de tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, apoplejía, anemia por células falciformes, rechazo de aloinjerto de piel, síndrome de cambios de la piel, rechazo de trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelares, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, Síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxis sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumatoide juvenil sistémica, células T o FAB ALL, Telangiectasia, tromboangitis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, trauma/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades cardiacas valvulares, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, meningitis aséptica/encefalitis

vital, síndrome hemafagocítico vital asociado, síndrome de Wemicke-Korsakoff, Enfermedad de Wilson, rechazo de aloinjerto de cualquier órgano o tejido, síndromes coronarios agudos, polineuritis idiopática aguda, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still en adultos, alopecia areata, anafilaxis, síndrome de anticuerpo anti-fosfolípido, anemia aplásica, arterioesclerosis, eczema atópica, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con infección estreptocócica, enteropatía autoinmune, pérdida de audición autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, insuficiencia de ovarios prematura autoinmune, blefaritis, bronquiectasis, penfigoide buloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolípido catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, penfigoide cicatricial, síndrome clínicamente aislado (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno siquiátrico de comienzo infantil, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, diabetes mellitus, hernia de disco, prolapso de disco, anemia hemolítica inmune inducida por fármaco, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, episcleritis, eritema multiforme, eritema multiforme mayor, penfigoide gestacional, síndrome de Guillain-Barré (GBS), fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad de Parkinson idiopática, neumonía intersticial idiopática, alergia mediada por IgE, anemia hemolítica inmune, miositis de cuerpo de inclusión, enfermedad inflamatoria ocular infecciosa, enfermedad desmielinizante inflamatoria, enfermedad cardiaca inflamatoria, enfermedad renal inflamatoria, IPF/UIP, iritis, queratitis, queratojuntivitis sicca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, histiocitosis de

células de Langerhan, livedo reticularis, degeneración macular, poliangeítis microscópica, morbus bechterev, trastornos de neuronas motoras, penfigoide de membrana mucosa, insuficiencia de múltiples órganos, miastenia grave, síndrome mielodisplásica, miocarditis, trastorno de raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis no A no B, neuritis óptica, osteolisis, cáncer de ovarios, JRA pauciarticular, enfermedad oclusiva de arteria periférica (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad de arteria periférica (PAD), flebitis, poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), policondritis, polimialgia reumática, poliosis, JRA poliarticular, síndrome de deficiencia poliendocrina, polimiositis, polimialgia reumática (PMR), síndrome post-bomba, Parkinsonismo primario, cáncer de próstata y rectal y malignidades hematopoyéticas (leucemia y linfoma), prostatitis, aplasia de glóbulos rojos puros, insuficiencia adrenal primaria, neuromielitis óptica recurrente, restenosis, enfermedad cardiaca reumática, safo (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostotis, y osteítis), escleroderma, amiloidosis secundaria, choque pulmonar, escleritis, ciática, insuficiencia adrenal secundaria, enfermedad de tejido conjuntivo asociada con silicona, dermatosis de sneddon-wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrólisis epidérmica tóxica, mielitis transversal, TRAPS (receptor de factor de necrosis de tumor, reacción alérgica tipo I, diabetes tipo II, urticaria, neumonía intersticial usual (UIP), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, Síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome de VKH), degeneración macular húmeda, curación de heridas, yersinia y artropatía asociada con salmonella.

En una modalidad, las enfermedades que se pueden tratar o

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

En una modalidad, los anticuerpos de la invención o porciones de enlace de antígeno de los mismos, se usan para tratar cáncer o en la prevención o inhibición de metástasis de los tumores descritos en la presente ya sea cuando se usan solos o en combinación con radioterapia y/u otros agentes quimioterapéuticos.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar un paciente que sufre de un trastorno que comprende la etapa de administrar cualquiera de las proteínas de enlace descritas en la presente antes, concurrentemente, o después de la administración de un segundo agente, como se

discute en la presente. En una modalidad particular, el segundo agente se selecciona del grupo que consiste de debudenósido, factor de crecimiento epidérmico, corticoesteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor IL-1, mAbs anti-IL-1β, mAbs del receptor anti-IL-6 o IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos de piridinil-imidazol, anticuerpos o agonistas de TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD-19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, ibuprofeno, corticoesteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasas, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, inhibidores de cinasa IRAK, NIK, IKK, p38, MAP, inhibidores de enzima que convierte IL-1β, inhibidores de enzima que convierte TNFα, inhibidores de señalización de células T, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima que convierte la angiotensinas, receptores de citocina soluble, receptor de TNF p55 soluble, receptor de TNF p75 soluble, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citocinas anti-inflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ.

En una modalidad particular, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se administran al paciente por al menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario,

intracelíaco, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocardico, intraosteal, intrapélvico, intrapericardiaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, y transdérmico.

Un aspecto de la invención proporciona al menos un anticuerpo anti-idiotípico para al menos una proteína de enlace de la presente invención. El anticuerpo anti-idiotípico incluye cualquier molécula que contiene proteína o péptido que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina tal como, pero no limitado a, al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de enlace de ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región de armazón, o cualquier porción de la misma, que se puede incorporar en una proteína de enlace de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Esta invención pertenece a proteínas de enlace multivalente y/o multiespecífico que enlazan dos o más antígenos. Específicamente, la invención se refiere a Inmunoglobulina de Dominios Variables (DVD-Ig), y composiciones farmacéuticas de la misma, así como también ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante y células huéspedes para producir tales DVD-Igs. Los métodos para usar las DVD-Igs de la invención para detectar antígenos específicos, ya sea in vitro o in vivo también se abarcan por la invención.

A menos que se defina de otra manera en la presente, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención deben tener los significados que son comúnmente entendidos por aquellos de experiencia ordinaria en el arte. El significado y alcance de los términos deben ser claros, sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente toman precedente sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Además, a menos que se requiera por contexto de otra manera, los términos singulares deben incluir pluralidades y los términos plurales deben incluir el singular. En esta solicitud, el uso de “o” significa “y/o” a menos que se establezca de otra manera. Además, el uso del término “incluyendo”, así como también otras formas, tal como “incluye” e “incluido”, no es limitante. Además, los términos tales como “elemento” o “componente” abarca ambos elementos y componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se establezca específicamente de otra manera.

Generalmente, las nomenclaturas usadas en conexión con, y técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de ácido nucleico y proteína e hibridización descritas en la presente son aquellas conocidas y comúnmente usadas en el arte. Los métodos y técnicas de la presente invención son generalmente realizados de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en el arte y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten en toda la presente especificación a menos que se indique de otra manera. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como comúnmente se realiza en el arte o como se describe en la presente. Las nomenclaturas usadas en conexión con, y los procedimientos de laboratorios y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y química farmacéutica y medicinal descritas en la presente son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en el arte. Las técnicas estándares se usan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y suministro, y tratamiento de pacientes.

De modo que la presente invención pueda ser más fácilmente entendida, los términos escogidos se definen a continuación.

El término “polipéptido” se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos “péptido” y “proteína” se usan intercambiablemente con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término “polipéptido” abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteína y análogos de polipéptido de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico. El término “polipéptido” abarca

polipéptido y fragmentos y variantes (incluyendo fragmentos de variantes) del mismo, a menos que se contradiga de otra manera por contexto. Para un polipéptido antigénico, un fragmento de polipéptido opcionalmente contiene al menos un epítope contiguo o no lineal de polipéptido. Los límites precisos de al menos un fragmento de epítope se pueden confirmar usando experiencia ordinaria en el arte. 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 de un polipéptido es como se describe en la presente.

El término “proteína aislada” o “polipéptido aislado” es una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación no se asocia con componentes naturalmente asociados que lo acompañan en su estado nativo; sustancialmente está libre de otras proteínas de la misma especie; se expresa por una célula de una especie diferente; o no se presenta en la naturaleza. Por consiguiente, un polipéptido que es químicamente sintetizado o sintetizado en un sistema celular diferente de la célula de la cual naturalmente se origina será “aislado” de sus componentes naturalmente asociados. Una proteína también se puede volver sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados por aislamiento, usando técnicas de purificación de proteína bien conocidas en el arte.

El término “recuperación” se refiere al proceso de volver una especie química tal como un polipéptido sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados por aislamiento, por ejemplo, usando técnicas de purificación de proteína bien conocidas en el arte.

El término “actividad biológica” se refiere a cualquiera o más propiedades biológicas inherentes de una molécula (si se presenta naturalmente como se encuentra in vivo, o se proporciona o habilita por medios recombinantes). Las propiedades biológicas incluyen, pero no se limitan a, enlace de receptor; inducción de proliferación celular, inhibición del crecimiento celular, inducciones de otras citocinas, inducción de apoptosis, y actividad enzimática. La actividad biológica también incluye la actividad de una molécula de Ig.

Los términos “enlace específico” o “específicamente enlazando” con referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína, o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción es dependiente de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítope) en las especies químicas; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y enlaza una estructura de proteína específica antes que proteínas generalmente. Si un anticuerpo es específico para el epítope “A”, la presencia de una molécula que contiene epítope A (o libre, no etiquetado A), en una reacción que contiene “A” etiquetado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A etiquetado unido al anticuerpo.

El término “anticuerpo” ampliamente se refiere a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) comprendida de cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento, mutante, variante, o derivación funcional del mismo, que retiene las características de enlace de epítope esenciales de una molécula de Ig. Tales formatos de anticuerpo mutante, variante, o derivado se conocen en el arte. Las modalidades no limitantes de los cuales se discuten a continuación.

En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada está

comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida de un dominio, Cl. Las regiones VH y VL se pueden adicionalmente subdividir en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, llamadas regiones de armazón (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, arregladas desde amino-término a carboxi-término en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

El término “región Fc” se usa para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, la cual se puede generar por digestión de papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. 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 remplazos de residuos aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora de anticuerpo se conocen en el arte (Patentes de Estados Unidos Nos. 5,648,260 y 5,624,821). La porción Fc de un anticuerpo media diversas funciones efectoras importantes por ejemplo, inducción de citocina, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente de

complemento (CDC) y vida media/velocidad de depuración de anticuerpo y complejos de antígeno-anticuerpo. En algunos casos estas funciones efectoras son deseables para un anticuerpo terapéutico pero en otros casos pueden ser no necesarias o aún perjudiciales, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humana, particularmente IgG1 e IgG3, median ADCC y CDC vía el enlace a FcγRs y C1q de complemento, respectivamente. Los receptores de Fc neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la vida media circulante de anticuerpos. En aún otra modalidad al menos un residuo aminoácido se remplaza en la región constante del anticuerpo, por ejemplo la región Fc del anticuerpo, de modo que las funciones efectoras del anticuerpo se alteran. La dimerización de dos cadenas pesadas idénticas de una inmunoglobulina se media por la dimerización de dominios CH3 y se estabiliza por los enlaces de disulfuro dentro de la región de bisagra (Huber et al. (1976) Nature 264:415-20; Thies et al. (1999) J. Mol. Biol. 293:67-79). La mutación de residuos cisteína dentro de las regiones de bisagra para prevenir los enlaces de disulfuro de cadena pesada-cadena pesada desestabilizarán la dimerización de dominios CH3. Los residuos responsables de la dimerización de CH3 se han identificado (Dall' Acqua (1998) Biochem. 37:9266-73.). Por lo tanto, es posible generar una media Ig monovalente. De manera interesante, estas moléculas de media Ig monovalente se han encontrado en la naturaleza tanto para subclases de IgG como IgA (Seligman (1978) Ann. Immunol. 129:855-70; Biewenga et al. (1983) Clin. Exp. Immunol. 51:395-400). La estequiometría de FcRn: región Fc de Ig se ha determinado como 2:1 (West et al. (2000) Biochem. 39:9698-708), y media Fc es suficiente para mediar el enlace de FcRn (Kim et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:542-548.). Las

mutaciones para interrumpir la dimerización del dominio CH3 no puede tener mayor efecto adverso en su enlace de FcRn ya que los residuos importantes para la dimerización de CH3 se ubican en la interfaz interna de estructura de hoja b de CH3, mientras que la región responsable para el enlace de FcRn se ubica en la interfaz externa de los dominios CH2-CH3. Sin embargo, la molécula de media Ig puede tener cierta ventaja en la penetración de tejido debido a su tamaño menor que aquella de un anticuerpo regular. En una modalidad, al menos un residuo aminoácido se remplaza en la región constante de la proteína de enlace de la invención, por ejemplo la región Fc, de modo que la dimerización de las cadenas pesadas se interrumpe, resultando en moléculas de media DVD-Ig. La actividad anti-inflamatoria de IgG es completamente dependiente de la sialilación del glicano N-enlazado del fragmento Fc de IgG. Los requerimientos de glicano precisos para la actividad anti-inflamatoria se han determinado, de modo que un fragmento Fc de IgG1 apropiado se puede crear, generando una Fc de IgG1 sialilada completamente recombinante con potencia grandemente mejorada (Anthony et al. (2008) Science 320:373-376).

El término “porción de enlace de antígeno” de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de enlazar específicamente un antígeno. Se ha mostrado que la función de enlace de antígeno de un anticuerpo se puede realizar por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Tales modalidades de anticuerpo también pueden ser formatos biespecíficos, específicos duales, o multi-específicos; que específicamente enlazan a dos o más diferentes antígeno. Los ejemplos de fragmentos de enlace que se abarcan dentro del término “porción de enlace de antígeno” de un anticuerpo

incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) Nature 341:544-546, Publicación PCT WO 90/05144), el cual comprende un dominio variable único; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican para genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, por un enlazante sintético que los habilita para volverse como una cadena de proteína única en la cual el par de regiones de VL y VH forma moléculas moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); ver por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena única también se proponen para ser abarcados dentro del término “porción de enlace de antígeno” de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos de cadena única, tales como diacuerpos también se abarcan. Los diacuerpos son bivalentes, anticuerpos biespecíficos en los cuales los dominios VH y VL se expresan en una cadena única de polipéptidos, pero usando un enlazante que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando a los dominios para aparearse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de enlace de antígeno (ver, por ejemplo, Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Tales porciones de

enlace de anticuerpo se conocen en el arte (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5). Además los anticuerpos de cadena única también incluyen “anticuerpos lineales” que comprenden un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) los cuales, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de enlace de antígeno (Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8(10):1057-1062; y Patente de Estados Unidos No. 5,641,870).

El término “proteína de enlace multivalente” se usa en toda esta especificación para denotar una proteína de enlace que comprende dos o más sitios de enlace de antígeno. En una modalidad, la proteína de enlace multivalente se modifica genéticamente para tener los tres o más sitios de enlace de antígeno, y generalmente no es un anticuerpo que se presenta naturalmente. El término “proteína de enlace multiespecífico” se refiere a una proteína de enlace que enlaza dos o más objetivos relacionados o no relacionados. Las proteínas de enlace de dominio variable dual (DVD) de la invención comprenden dos o más sitios de enlace de antígeno y son proteína de enlace tetravalentes o multivalentes. Las DVD pueden ser monoespecíficas, es decir, capaces de enlazar un antígeno o multiespecíficos, es decir capaces de enlazar dos o más antígeno. Las proteínas de enlace de DVD que comprenden dos polipéptidos de DVD de cadena pesada y dos polipéptidos de DVD de cadena ligera son referidas como DVD-Ig. Cada mitad de una DVD-Ig comprende un polipéptido de DVD de cadena pesada, y un polipéptido de DVD de cadena ligera, y dos sitios de enlace de antígeno. Cada sitio de enlace comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera con un total de 6 CDRs involucradas en el enlace de antígeno por

sitio de enlace de antígeno.

El término “anticuerpo biespecífico” se refiere a anticuerpos de longitud completa que se generan por tecnología de quadroma (ver Milstein and Cuello (1983) Nature 305(5934):537-40), por conjugación química de dos diferentes anticuerpos monoclonales (ver Staerz et al. (1985) Nature 314(6012):628-31), o por botón en ojal o procedimientos similares los cuales introducen mutaciones en la región Fc (ver Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14):6444-8.18), resultando en múltiples diferentes especies de inmunoglobulina de las cuales solo una es el anticuerpo biespecífico funcional. Por función molecular, un anticuerpo biespecífico enlaza un antígeno (o epítope) en uno de sus dos brazos de enlace (un par de HC/LC), y enlaza un antígeno diferente (o epítope) en su segundo brazo (un par diferente de HC/LC). Por esta definición, un anticuerpo biespecífico tiene dos brazos de enlace de antígeno distintos (tanto en secuencias de CDR como especificidad), y es monovalente para cada antígeno que lo enlaza.

El término “anticuerpo específico dual” se refiere a anticuerpos de longitud completa que pueden enlazar dos diferentes antígenos (o epítopes) en cada uno de sus dos brazos de enlace (un par de HC/LC) (ver Publicación PCT No. WO 02/02773). Por consiguiente, una proteína de enlace específica dual tiene dos brazos de enlace de antígeno, con secuencias de CDR idénticas y especificidad idénticas, y es bivalente para cada antígeno al cual enlaza.

Un “sito de enlace de antígeno funcional” de una proteína de enlace es uno que enlaza un antígeno de objetivo. La afinidad de enlace de antígeno del sitio de enlace de antígeno no es necesariamente tan fuerte como el anticuerpo

progenitor del cual el sitio de enlace de antígeno se deriva, pero la capacidad de enlazar antígeno debe ser medible usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos evaluando el enlace de anticuerpo a un antígeno. Además, la afinidad de enlace de antígeno de cada uno de los sitios de enlace de antígeno de un anticuerpo multivalente en la presente no necesita ser cuantitativamente la misma.

El término “citocina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular, las cuales actúan en otra población celular como mediadores intercelulares. Los ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas, y hormonas de polipéptido tradicionales. Incluida entre las citocinas está la hormona de crecimiento tal como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana N-metionil, y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroides; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glicoproteína tal como hormona estimulante de folículos (FSH), hormona estimulante de tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblasto; prolactina; placentalactogeno; factor de necrosis de tumor alfa y beta; sustancia inhibidora de mullerian; péptido asociado con gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento de nervios tal como NGF-alfa; factor de crecimiento de plaquetas; factor de crecimiento placentario; factor de crecimiento de transformación (TGFs) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento tipo insulina 1 y 11; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón-alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSFs) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de macrófagos de granulocitos (GM-CSF); y CSF de

granulocitos (G-CSF); interleucinas (ILs) tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-1O, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, e IL-33; un factor de necrosis de tumor tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores de polipéptido incluyendo LIF y ligando kit (KL). El término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencias nativas.

El término “enlazante” se usa para denotar polipéptidos que comprenden dos o más residuos aminoácido unidos por enlaces de péptido y se usan para enlazar una o más porciones de enlace de antígeno. Tales polipéptidos enlazantes son bien conocidos en el arte (ver por ejemplo, Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Los enlazantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, AKTTPKLEEGEFSEAR (SEC ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEC ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEC ID NO: 4); SAKTTP (SEC ID NO: 5); RADAAP (SEC ID NO: 6); RADAAPTVS (SEC ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEC ID NO: 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEC ID NO: 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 10); ADAAP (SEC ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEC ID NO: 12); TVAAP (SEC ID NO: l3); TVAAPSVFIFPP (SEC ID NO: 14); QPKAAP (SEC ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEC ID NO: 16); AKTTPP (SEC ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEC ID NO: 18); AKTTAP (SEC ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEC ID NO: 20); ASTKGP (SEC ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO: 22); GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEC ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID NO: 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEC ID NO: 26); TVAAPSVFIFPPTV AAPSVFIFPP (SEC

ID NO: 27); y ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO: 28).

Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Las secuencias de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada y cadena ligera de IgG humana se conocen en el arte.

El término “anticuerpo monoclonal” o “mAb” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para posibles mutaciones que se presentan naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un antígeno único. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpo policlonal que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada mAb se dirige contra un determinante único en el antígeno. El modificador “monoclonal” no será construido como que requiere producción del anticuerpo por cualquier método particular.

El término “anticuerpo humano” incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o de sitio específico in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDRs y en particular CDR3. Sin embargo, el término “anticuerpo humano” no se propone que incluya anticuerpos en los cuales las secuencias de CDRs derivadas

de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias de armazón humanas.

El término “anticuerpo humano recombinante” incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (descrito adicionalmente en la Sección 11C, a continuación), anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpo humano combinatorial recombinante (Hoogenboom (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy and Highsmith (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo and Larrick (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom and Chames (2000) Immunol. Today 21:371-378), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (ver, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann and Green (2002) Current Opino Biotechnol. 13:593-597; Little et al. (2000) Immunol. Today 21:364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucra empalme de secuencias de gen de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis in vitro (o, cuando es un animal transgénico para secuencia de Ig humana se usa mutagénesis somática in vivo) y por consiguiente las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, mientras se derivan y relacionan con las secuencias de VH y VL de línea germinal humana, no pueden

existir naturalmente dentro del reportero de línea germinal de anticuerpo humano in vivo.

Un anticuerpo de “afinidad madura” es un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDRs del mismo que resultan en un mejoramiento en la afinidad del anticuerpo para antígeno, en comparación con un anticuerpo progenitor el cual no posee aquellas alteraciones. Los anticuerpos de afinidad madurada ejemplares tendrán afinidades nanomolares o aún picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos de afinidad madura se producen por procedimientos conocidos en el arte. Marks et al. (1992) Bio/Technology 10:779-783 describe maduración de afinidad por transposición de dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos de armazón se describe por: Barbas et al. (1994) Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-38l3; Schier et al. (1995) Gene 169:147-155; Yelton et al. (1995) J. Immunol. 155:1994-2004; Jackson et al. (1995) J. Immunol. 154(7):3310-9; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896 y mutación selectiva en posiciones de mutagénesis selectivas, posiciones de hipermutación o contacto con un residuo aminoácido que mejora la actividad como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 6,914,128.

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

El término “anticuerpo injertado a CDR” se refiere a anticuerpos los cuales comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de

una especie pero en los cuales las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL se remplazan con secuencias de CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas en las cuales una o más de las CDRs murinas (por ejemplo, CDR3) se han remplazado con secuencias de CDR humanas.

El término “anticuerpo humanizado” se refiere a anticuerpos los cuales comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, un ratón) pero en las cuales al menos una porción de la secuencia de VH y/o VL se ha alterado para ser más “tipo humana”, es decir, más similar a secuencias variables de línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado a CDR, en el cual las secuencias de CDR no humanas se introducen en secuencias de VH y VL humanas para remplazar las secuencias de CDR humanas correspondientes. Además el “anticuerpo humanizado” es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo el cual enlaza inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y el cual comprende una región de armazón (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. El término “sustancialmente” en el contexto de una CDR se refiere 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 con la secuencia de aminoácidos de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables

(Fab, Fab', $F(ab')_2$, FabC, Fv) en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones de armazón son aquellas de una secuencia se consenso de inmunoglobulina humana. En una modalidad, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera así como también 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 modalidades, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena ligera humanizada. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena pesada humanizada. En modalidades específicas, un anticuerpo humanizado solamente contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

Los términos “numeración Kabat”, “definiciones Kabat” y “etiquetado kabat” se usan intercambiablemente en la presente. Estos términos, los cuales se reconocen en el arte, se refieren a un sistema de numeración de residuos aminoácidos los cuales son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de enlace de antígeno del mismo (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 y Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Para la región variable de cadena pesada,

la región hipervariable varía desde las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para CDR1, posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2, y posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable varía de las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2, y posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

El término “CDR” se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de las secuencias variables de anticuerpo. Hay tres CDRs en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, las cuales se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término “conjunto de CDR” se refiere a un grupo de tres CDRs que se presentan en una región variable única que enlaza el antígeno. Los límites exactos de estas CDRs se han definido de manera diferente de acuerdo con diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991)) no solamente proporciona un sistema de numeración de residuos no ambiguo aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino también proporciona límites de residuo precisos que definen las tres CDRs. Estas CDRs se pueden referir como CDRs de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917 y Chothia et al. (1989) Nature 342:877-883) encontraron que ciertas sub-porciones dentro de las CDRs de Kabat adoptan conformaciones de esqueleto de péptido casi idénticas, a pesar de tener mayor diversidad al nivel de secuencia de aminoácidos. Estas sub-porciones fueron designadas como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde “L” y “H” designan las regions

de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden ser referidas como CDRs de Chothia, las cuales tienen límites que se superponen con las CDRs de Kabat. Otros límites que definen CDRs superpuestas con las CDRs de Kabat se han descrito por Padlan (1995) FASEB J. 9:133-139 y MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5):732-45). Aún otras definiciones de límite de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sietmas en la presente, sino en todo caso se superpondrán con las CDRs de Kabat, aunque se puedan acortar o alargar a la luz de la predicción o hallazgos experimentales que los grupos de residuos o residuos particulares o aún CDRs completas no impactan significativamente en el enlace de antígeno. Los métodos usados en la presente pueden utilizar CDRs definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque ciertas modalidades usan CDRs derinidas por Kabat o Chothia.

El término “armazón” o “secuencia de armazón” se refiere a las secuencias remanentes de una región variable menos las CDRs. Debido a que la definición exacta de una secuencia de CDR se puede determinar por diferentes sistemas, el significado de una secuencia de armazón se somete a interpretraciones correspondientemente diferentes. Las seis CDRs (CDR-L1, -L1, y –L1 de cadena ligera y CDR-H1, -H2, y -H3 de cadena pesada) también dividen las regiones de armazón en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en la cual CDR1 se posiciona entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de armazón, como es referida por otros, representa las FR combinadas dentro de la región variable de una cadena de inmunoglobulina única que se presenta

naturalmente. Una FR representa una de las cuatro sub-regiones, y FRs representa dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región de armazón.

El término “gen de anticuerpo de línea germinal” o “fragmento de gen” se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han sufrido el proceso de maduración que conduce al rearreglo genético y mutación para expresión de una inmunoglobulina particular. (Ver, por ejemplo, Shapiro et al. (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3):183-200; Marchalonis et al. (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484:13-30). Una de las ventajas proporcionadas por varias modalidades de la presente invención se rechaza del reconocimiento que los genes de anticuerpo de línea germinal son más probables que los genes de anticuerpo maduros para conservar estructuras de secuencia de aminoácidos esenciales características de individuos en las especies, por lo tanto es menor probable que sean reconocidos como de una fuente extraña cuando se usan terapéuticamente en esta especie.

El término “neutralización” se refiere a contrarrestar la actividad biológica de un antígeno cuando una proteína de enlace específicamente enlaza el antígeno. En una modalidad, la proteína de enlace neutralizante enlaza la citocina y reduce su actividad biológicamente por al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más.

El término “actividad” incluye actividades tales como la afinidad y especificidad de enlace de una DVD-Ig para dos o más antígenos.

El término “epítope” incluye cualquier determinante de polipéptido capaz del enlace específico a una inmunoglobulina o receptor de células T. en

ciertas modalidades, los determinantes de epítope incluyen agrupamientos de superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, o sulfonilo, y, en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específica. Un epítope es una región de un antígeno que se une por un anticuerpo. Un epítope por consiguiente consiste de los residuos aminoácidos de una región de un antígeno (o fragmento del mismo) conocidos por enlazar el sitio complementario en el socio de enlace específico. Un fragmento antigénico puede contener más de un epítope. En ciertas modalidades, se dice que un anticuerpo específicamente enlaza un antígeno cuando reconoce su antígeno objetivo en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Se dice que los anticuerpos "enlazan al mismo epítope" si los anticuerpos compiten cruzado (uno previene el efecto de enlace o de modulación del otro). Además las definiciones estructurales de epítopes (superposición, similar, idéntica) son informativas, pero las definiciones funcionales son con frecuencia más relevantes ya que abarcan parámetros estructurales (enlace) y funcionales (modulación, competición).

El término "resonancia de plasmón de superficie" se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real por detección de alteraciones en concentraciones de proteína dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo usando el sistema BIAcore® (BIAcore Intemational AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, ver Jönsson et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jönsson et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-l31; y Johnnson, et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

El término "K_{on}" se refiere a una constante de velocidad de asociación para la asociación de una proteína de enlace (por ejemplo, un anticuerpo) al antígeno para formar, por ejemplo, el complejo de anticuerpo/antígeno como se conoce en el arte. La "K_{on}" también se conoce por los términos "constante de velocidad de asociación", o "Ka", como se usa intercambiablemente en la presente. Este valor que indica la velocidad de enlace de un anticuerpo a su antígeno objetivo o la velocidad de formación de complejo entre un anticuerpo y antígeno también se muestra por la ecuación a continuación:

Anticuerpo ("Ab") + Antígeno ("Ag") $\rightarrow$ Ab-Ag.

El término "K_{off}" se refiere a la constante de velocidad de disociación para disociación, o "constante de velocidad de disociación" de una proteína de enlace (por ejemplo, un anticuerpo) de, por ejemplo, el complejo de anticuerpo/antígeno como se conoce en el arte. La "K_{off}" también se conoce por los términos "constante de velocidad de disociación" o "Kd" como se usa intercambiablemente en la presente. Este valor indica la velocidad de disociación de un anticuerpo de su antígeno objetivo o separación del complejo Ab-Ag con el tiempo en anticuerpo y antígeno libres como se muestra por la ecuación a continuación:

Ab + Ag $\leftarrow$ Ab-Ag.

El término "K_D" se refiere a la "constante de disociación de equilibrio", o "KD", como se usa intercambiablemente en la presente, se refiere al valor obtenido en una medición de titulación en equilibrio, o 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 de equilibrio se usan para representar la afinidad de enlace de un anticuerpo a un antígeno. Los métodos para determinar las constantes de velocidad de asociación y disociación son bien conocidas en el arte. El uso de técnicas basadas en fluorescencia ofrece alta sensibilidad y la capacidad de examinar muestras en amortiguadores fisiológicos en equilibrio. Otros instrumentos y procedimientos experimentales tal como un ensayo BIAcore® (análisis de interacción biomolecular) se puede usar (por ejemplo, instrumento disponibles de BIAcore Intemational AB, una compañía de GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Adicionalmente, un ensayo KinExA® (Ensayo de Exclusión Cinética), disponible de Sapidyne Instruments (Boise, Idaho) también se puede usar.

"Etiqueta" y "etiqueta detectable" significan una porción unida a un socio de enlace específico, tal como un anticuerpo o un analito, por ejemplo, para volver detectable la reacción entre miembros de un par de enlace específico, tal como un anticuerpo y un analito, y el socio de enlace específico, por ejemplo, anticuerpo o analito, así etiquetado es referido como "detectablemente etiquetado". Por consiguiente, el término "proteína de enlace etiquetada" se refiere a una proteína con una etiqueta incorporada que proporciona la identificación de la proteína de enlace. En una modalidad, la etiqueta es un marcador detectable que puede producir una señal que es detectable por medio visual o instrumental, por ejemplo, incorporación de un aminoácido radioetiquetado o unión a un polipéptido de porciones de biotinilo que se puede detectar por avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar por métodos ópticos o colorimétricos. Los ejemplos de etiquetas

para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, o ^{153}Sm); cromógenos, etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánido), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotinilo; epítopes de polipéptido predeterminados reconocidos por un reportero secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de enlace para anticuerpos secundarios, dominios de enlace de metal, y marcas de epítope); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio. Los ejemplos representativos de etiquetas comúnmente empleadas para inmunoensayos incluyen porciones que producen luz, por ejemplo, compuestos de acridinio, y porciones que producen fluorescencia, por ejemplo, fluoresceína. Otras etiquetas se describen en la presente. A este respecto, la porción por sí misma no puede ser detectablemente etiquetada pero puede llegar a ser detectable en reacción con todavía otra porción. El uso de “detectablemente etiquetada” se propone que abarque el último tipo de etiquetado detectable.

El término “conjugado” se refiere a una proteína de enlace tal como un anticuerpo, químicamente enlazado a una segunda porción química, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término “agente” denota un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos. En una modalidad, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, toxina de tos ferina, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorrubicina, daunorrubicina,

dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Cuando se emplea en el contexto de un inmunoensayo, el anticuerpo de conjugado puede ser un anticuerpo detectablemente etiquetado usado como el anticuerpo de detección.

Los términos “cristal” y “cristalizado” se refieren a una proteína de enlace (por ejemplo, un anticuerpo), o porción de enlace de antígeno del mismo, que existe en la forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, el cual es distinto de otras formas tal como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos de arreglos tridimensionales repetidos, regulares de átomos, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos), o montajes moleculares (por ejemplo, complejos de antígeno/anticuerpo). Estos arreglos tridimensionales son arreglados de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que son bien entendidas en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal se llama la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en un arreglo que conforma una simetría cristalográfica bien definida dada proporciona la “celda unitaria” del cristal. La repetición de la celda unitaria por traslaciones regulares en todas las tres dimensiones proporciona el cristal. Ver Giege and Ducruix (1999) Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York.

El término “polinucleótido” significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN de

cadena única y doble.

El término “polinucléotido aislado” debe significar un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, ADNc, o sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el “polinucleótido aislado” no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido con el cual el “polinucleótido aislado” se encuentra en la naturaleza; se enlaza operativamente a un polinucleótido que no se enlaza en la naturaleza; o no se presenta en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término “vector”, se propone que se refiera a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha enlazado. Un tipo de vector es un “plásmido” el cual se refiere a un bucle de ADN de cadena doble circula en el cual los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de la replicación autónoma en una célula huésped en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped en la introducción en la célula huésped, y se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales se enlazan operativamente. Tales vectores son referidos en la presente como “vectores de expresión recombinante” (o simplemente “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes están frecuentemente en la forma de plásmidos. En la presente especificación,

"plásmido" y "vector" se pueden usar intercambiablemente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la invención se propone que incluya tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), los cuales sirven como funciones equivalentes.

El término "operativamente enlazado" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera propuesta. Una secuencia de control "operativamente enlaza" a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "operativamente enlazadas" incluyen tanto secuencias de control de expresión que están contiguas con el gen de interés y secuencias de control de expresión que actúan in *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de expresión" se refiere a secuencias de polinucleótido las cuales son necesarias para efectuar la expresión y procesamiento de secuencias codificantes a las cuales se ligan. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias de promotor y mejorador, terminación, iniciación de transcripción apropiadas; señales de procesamiento de ARN eficientes tales como señales de poliadenilación y empalme; secuencias que estabilizan el mARN citoplásmico; secuencias que mejoran la eficiencia de traducción (es decir, secuencia de consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína, y cuando sea deseado, secuencias que mejoran la secreción de proteína. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped, en procariotas, tales secuencias de control

generalmente incluyen promotor, sitio de enlace ribosomal, y secuencia de terminación de transcripción; en eucariotas, generalmente tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de transcripción. El término “secuencias de control” se propone que incluya componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias guía y secuencias de socio de fusión.

“Transformación”, se refiere a cualquier proceso por el cual el ADN exógeno entra en una célula huésped. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales usando varios métodos bien conocidos en el arte. La transformación se puede basar en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico extrañas en una célula huésped procariota o eucariota. El método se selecciona con base en la célula huésped que se transforma y puede incluir, pero no se limita a, infección viral, electroporación, lipofección, y bombardeo de partículas. Tales células “transformadas” incluyen células establemente transformadas en las cuales el ADN insertado es capaz de la replicación ya sea como un plásmido autónomamente replicado o como parte del cromosoma huésped. También incluyen células las cuales expresan temporalmente el ARN o ADN insertado por períodos de tiempo limitados.

El término “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”), se propone que se refiera a una célula en la cual el ADN exógeno se ha introducido. En una modalidad, la célula huésped comprende dos o más (por ejemplo, múltiples) ácidos nucleicos que codifican anticuerpos, tales como las células huéspedes descritas en la Patente de Estados Unidos No. 7,262,028, por

ejemplo. Tales términos se proponen que se refieran no solamente a la célula objeto particular, sino también a la progenie de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones subsiguientes debido a cualquier mutación o influencias ambientales, tal progenie no puede, en efecto, ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluye dentro del alcance del término “célula huésped”. En una modalidad, las células huéspedes incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas de cualquiera de los reinos de vida. En otra modalidad, las células eucariotas incluyen, células protistas, fúngicas, de plantas y animales. En otra modalidad, las células huéspedes incluyen pero no se limitan a la línea celular procariota E. coli; líneas celulares de mamífero CHO, HEK 293, COS, NS0, SP2 y PER.C6; la línea celular de insecto Sf9; y la célula fúngica Saccharomyces cerevisiae.

Se pueden usar técnicas estándares para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótido, y cultivo de tejido y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como comúnmente se realiza en el arte o como se describe en la presente. Las técnicas y procedimientos anteriores se pueden realizar generalmente de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en el arte y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten en toda la presente especificación. Ver por ejemplo, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

“Organismo transgénico”, como se conoce en el arte, se refiere a un

organismo que tiene células que contienen un transgen, en donde el transgen introducido en el organismo (o un ancestro del organismo) expresa un polipéptidno no expresado naturalmente en el organismo. Un “transgen” es un constructo de ADN, el cual es establemente y operativamente integrado en el genoma de una célula de la cual se desarrolla un organismo transgénico, dirigiendo la expresión de un producto de gen codificado en uno o más tipos de células o tejidos del organismo transgénico.

Los términos “regular” y “modular” se refieren a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de una citocina). La modulación puede ser un incremento o una disminución en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula de interés. Las actividades y funciones ejemplares de una molécula incluyen, pero no se limitan a, características de enlace, actividad enzimática, activación de receptor celular, y transducción de señal.

De manera correspondiente, el término “modulador” es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de una citocina). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o disminución en la magnitud de una cierta actividad o función de una molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del modulador. En ciertas modalidades, un modulador es un inhibidor, el cual disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Los inhibidores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, carbohidratos o moléculas orgánicas pequeñas. Los pepticuerpos se describen, por ejemplo, en la Publicación PCT No.

WOO1/83525.

El término “agonista”, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, causa un incremento en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del agonista. Los agonistas de interés particulares pueden incluir, pero no se limitan a, polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratros, o cualquiera de las otras moléculas que enlazan el antígeno.

El término “antagonista” o “inhibidor” se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés causa una disminución en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del antagonista. Los antagonistas de interés particulares incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica del antígeno. Los antagonistas e inhibidores de antígenos pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, o cualquiera de las otras moléculas, las cuales enlazan el antígeno.

El término “cantidad efectiva” se refiere a la cantidad de una terapia la cual es suficiente para reducir o aliviar la severidad y/o duración de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, inhibir o prevenir el avance de un trastorno, causar la regresión de un trastorno, inhibir o prevenir la recurrencia, desarrollo, comienzo o progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o mejorar o aumentar los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico).

Los términos “paciente” y “sujeto” se pueden usar

intercambiablemente en la presente para referirse a un animal, tal como un mamífero, incluyendo un primate (por ejemplo, un humano, un mono, y un chimpancé), un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un cobayo, un gato, un perro, una rata, un ratón, y una ballena), un pájaro (por ejemplo, un pato o un ganso), y un tiburón. Preferiblemente, el paciente o sujeto es un humano, tal como un ser humano tratado o valorado con una enfermedad, trastorno o afección, un humano en riesgo de una enfermedad, trastorno o afección, un humano que tiene una enfermedad, trastorno o afección, y/o ser humano tratado para una enfermedad, trastorno o afección.

El término “muestra” se usa en este sentido más amplio. Una “muestra biológica” incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia de un ser viviente o ser antes viviente. Tales seres vivientes incluyen, pero no se limitan a, humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre (por ejemplo, sangre entera), plasma, suero, orina, fluido amniótico, fluido sinovial, células endoteliales, leucocitos, monocitos, otras células, órganos, tejidos, médula ósea, nódulos linfáticos y bazo.

“Componente”, “componentes” y “al menos un componente” se refieren generalmente a un anticuerpo de captura, un anticuerpo conjugado o de detección, un control, un calibrador, una serie de calibradores, un panel de sensibilidad, un contenedor, un amortiguador, un diluyente, una sal, una enzima, un co-factor para una enzima, un reactivo de detección, una solución/reactivo de pretratamiento, un sustrato (por ejemplo, como una solución), una solución de

detención, y similares que se pueden incluir en un kit para ensayo de una muestra de prueba, tal como una muestra de orina, suero o plasma del paciente, de conformidad con los métodos descritos en la presente y otros métodos conocidos en el arte. Por consiguiente, en el contexto de la presente descripción, “al menos un componente”, “componente” y “componentes” puede incluir un polipéptido u otro analito como anteriormente, tal como una composición que comprende un analito tal como polipéptido, el cual opcionalmente se inmoviliza en un soporte sólido, tal como por enlace a un anticuerpo anti-analito (por ejemplo, anti-polipéptido). Algunos componentes pueden estar en solución o liofilizados para reconstitución para el uso en un ensayo.

“Control” se refiere a una composición conocida por no contener analito (“control negativo”) o contener analito (“control positivo”). Un control positivo puede comprender una concentración conocida de analito. “Control”, “control positivo”, y “calibrador” se pueden usar intercambiablemente en la presente para referirse a una composición que comprende una concentración conocida de analito. Un “control positivo” se puede usar para establecer las características de desempeño de enlace y es un indicador útil de la integridad de reactivos (por ejemplo, analitos).

“Corte predeterminado” y “nivel predeterminado” se refieren generalmente a un valor de corte de ensayo que se usa para valorar los resultados de eficacia de diagnóstico/pronóstico/terapéutica comparando los resultados de ensayo contra el corte/nivel predeterminado, donde el corte/nivel predeterminado ya se ha enlazado o asociado con varios parámetros clínicos (por ejemplo, severidad de la enfermedad, progresión/no progresión/mejoramiento, etc.).

Mientras que la presente descripción puede proporcionar niveles predeterminados ejemplares, es bien conocido que los valores de corte pueden variar dependiendo de la naturaleza del inmunoensayo (por ejemplo, anticuerpos empleados, etc.). Adicionalmente está dentro de la experiencia ordinaria de uno en el arte adaptar la descripción en la presente para otros inmunoensayos para obtener valores de corte específicos de inmunoensayo para aquellos otros inmunoensayos basados en esta descripción. Mientras que el valor preciso del corte/nivel predeterminado puede variar entre los ensayos, las correlaciones como se describe en la presente (si las hay) deben ser generalmente aplicables.

"Reactivo de pretratamiento", por ejemplo, reactivos de lisis, precipitación y/o solubilización como se usa en un ensayo de diagnóstico como se describe en la presente es uno que somete a lisis cualquiera de las células y/o solubiliza cualquier analito que está presente en una muestra de prueba. El pretratamiento no es necesario para todas las muestras, como se describe adicionalmente en la presente. Entre otras cosas, la solubilización del analito (por ejemplo, polipéptido de interés) puede implicar la liberación del analito de cualquiera de las proteínas de enlace endógenas presentes en la muestra. Un reactivo de pretratamiento puede ser homogéneo (no requiere una etapa de separación) o heterogéneo (requiere una etapa de separación). Con el uso de un reactivo de pretratamiento heterogéneo hay remoción de cualquiera de las proteínas de enlace de analito precipitadas de la muestra de prueba previo a proceder a la siguiente etapa del ensayo.

"Reactivos de control de calidad" en el contexto de inmunoensayos y kits descritos en la presente, incluyen, pero no se limitan a, calibradores, controles,

y paneles de sensibilidad. Un “calibrador” o “estándar” típicamente se usa (por ejemplo, uno o más, tal como una pluralidad) para establecer las curvas de calibración (estándar) para la interpolación de la concentración de un analito, tal como un anticuerpo o un analito. Alternativamente, un calibrador único, el cual está cerca de un corte positivo/negativo predeterminado, se puede usar. Múltiples calibradores (es decir, más de un calibrador o una cantidad variada de calibradores) se puede usar en conjunto para comprender un “panel de sensibilidad”.

“Riesgo” se refiere a la posibilidad o probabilidad de un evento particular que ocurre ya sea actualmente o en algún punto en el futuro. “Estratificación de riesgo” se refiere a un arreglo de factores de riesgo clínico conocidos que permite a los médicos clasificar los pacientes en un riesgo bajo, moderado, alto o más alto de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección particular.

“Específico” y “especificidad” en el contexto de una interacción entre miembros de un par de enlace específico (por ejemplo, un antígeno (o fragmento del mismo) y un anticuerpo (o fragmento antigénicamente reactivo del mismo)) se refieren a la reactividad selectiva de la interacción. La frase “específicamente enlaza a” y fases análogas se refieren a la capacidad de anticuerpos (o fragmentos antigénicamente reactivos de los mismos) para enlazar específicamente al analito (o un fragmento del mismo) y no enlazar específicamente a otras entidades.

“Socio de enlace específico” es un miembro de un par de enlace específico. Un par de enlace específico comprende dos diferentes moléculas, las cuales específicamente se enlazan entre sí a través de medios químicos o físicos.

Por lo tanto, además de los pares de enlace específico de antígeno y anticuerpo de inmunoensayos comunes, otros pares de enlace específico pueden incluir biotina y avidina (o estreptavidina), carbohidratos y lectinas, secuencias de nucleótido complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores y enzimas, inhibidores de enzima y enzimas, y similares. Además, los pares de enlace específicos pueden incluir miembros que son análogos de los miembros de enlace específico originales, por ejemplo, un análogo de analito. Los miembros de enlace específico inmunorreactivos incluyen antígenos, fragmentos de antígeno, y anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales y policlonales así como también complejos, fragmentos, y variantes (incluyendo fragmentos de variantes) de los mismos, si se aíslan o se producen recombinantemente.

"Variante" significa un polipéptido que difiere de un polipéptido dado (por ejemplo, anticuerpo anti-polipéptido o polipéptido de IL-18, BNP, NGAL o VIH) en secuencia de aminoácidos por la adición (por ejemplo, inserción), supresión, o sustitución conservadora de aminoácidos, pero que retiene la actividad biológica del polipéptido dado (por ejemplo, una IL-18 variante puede competir con el anticuerpo anti-IL-18 para el enlace a IL-18). Una sustitución conservadora de un aminoácido, es decir, reemplazo de un aminoácido con un diferente aminoácido de propiedades similares (por ejemplo, hidrofilicidad y grado y distribución de regiones cargadas) se reconoce en el arte que típicamente involucra un cambio menor. Estos cambios menores se pueden identificar, en parte, considerando el índice hidropático de aminoácidos, como se entiende en el arte (ver, por ejemplo, Kyte et al. (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-132). El índice hidropático de un aminoácido se basa en una consideración de su hidrofobicidad y carga. Se conoce en el arte que

los aminoácidos de índices hidropáticos similares se pueden sustituir y aún retener la función de proteína. En un aspecto, los aminoácidos que tienen índices hidropáticos de ± 2 se sustituyen. La hidrofilicidad de aminoácidos también se puede usar para revelar las sustituciones que resultarían en proteínas que retienen la función biológica. Una consideración de la hidrofilicidad de aminoácidos en el contexto de un péptido permite el cálculo de la hidrofilicidad promedio local más grande de este péptido, una medida útil que se ha reportado que se correlaciona bien con la antigenicidad e inmunogenicidad (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 4,554,101). La sustitución de aminoácidos que tienen valores de hidrofilicidad similares puede resultar en péptidos que retienen actividad biológica, por ejemplo inmunogenicidad, como se entiende en el arte. En un aspecto, las sustituciones se realizan con aminoácidos que tienen valores de hidrofilicidad dentro de ± 2 uno de otro. Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofilicidad de aminoácidos son influenciados por la cadena lateral particular de este aminoácido. Consistente con esta observación, las sustituciones de aminoácido que son compatibles con la función biológica se entiende que dependen de la similitud relativa de los aminoácidos, y particularmente las cadenas laterales de aquellos aminoácidos, como se revela por la hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga, tamaño, y otras propiedades.

"Variante" también se puede usar para describir un polipéptido o fragmento del mismo que se ha procesado diferencialmente, tal como por proteólisis, fosforilación, u otra modificación post-traduccional, aún retiene su actividad biológica o reactividad de antígeno, por ejemplo, la capacidad de enlazar a IL-18. El término "variante" abarca fragmentos de una variante a menos que se

contradiga de otra manera por contexto.

I. Generación de proteína de enlace de DVD

La invención pertenece a proteínas de enlace de Dominio Variable Dual que enlazan uno o más objetivos y métodos para producir las mismas. En una modalidad, la proteína de enlace comprende una cadena de polipéptidos, en donde la cadena de polipéptidos comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, C es un dominio constante, X1 representa un aminoácido o polipéptido, X2 representa una región Fc y n es 0 o 1. La proteína de enlace de la invención se puede generar usando varias técnicas. La invención proporciona vectores de expresión, célula huésped y métodos para generar la proteína de enlace.

A. Generación de anticuerpos monoclonales progenitores

Los dominios variables de la proteína de enlace de DVD se pueden obtener de anticuerpos progenitores, incluyendo mAbs policlonales que enlazan antígenos de interés. Estos anticuerpos se pueden presentar naturalmente o se pueden generar por tecnología recombinante.

Los mAbs se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en el arte incluyendo el uso de hibridoma, recombinante, y tecnologías de expresión en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los mAbs se pueden producir usando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en el arte y enseñadas, por ejemplo, en Harlow et al. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.); Hammerling

et al. (1981) en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, NY). El término “anticuerpo monoclonal” no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. El término “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo que se deriva de un clon único, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota, o fago, y no el método por el cual se produce. Los hibridomas se seleccionan, clonan y seleccionan adicionalmente para características deseables, incluyendo crecimiento de hibridoma robusto, alta producción de anticuerpo y características de anticuerpo deseables, como se discute en el Ejemplo 1 a continuación. Los hibridomas se pueden cultivar y expandir *in vivo* en animales singeneicos, en animales que carecen de un sistema inmune, por ejemplo, ratones desnudos, o en cultivo celular *in vitro*. Los métodos para seleccionar, clonar y expandir hibridomas son bien conocidos por aquellos de experiencia ordinaria en el arte. En una modalidad particular, los hibridomas son hibridomas de ratón. En otra modalidad, los hibridomas se producen en una especie no de ratón no humana tales como ratas, oveja, cerdos, cabras, vacas o caballos. En otra modalidad, los hibridromas son hibridomas humanos, en los cuales un mieloma no secretor humano se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo que enlaza un antígeno específico.

Los mAbs recombinantes también se generan de linfocitos aislados únicos usando un procedimiento referido en el arte como el método de anticuerpo de linfocito seleccionado (SLAM), como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5,627,052; Publicación PCT No. WO 92/02551; y Babcock et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848. En este método, los anticuerpos de interés que secretan células únicas, por ejemplo, linfocitos derivados de un animal

inmunizado, se identifican, y, los cADNs de región variable de cadena pesada y ligera se rescatan de las células por PCR de transcriptasa inversa y estas regiones variables luego se pueden expresar, en el contexto de las regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas), en células huéspedes de mamífero, tales como células COS o CRO. Las células huéspedes transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados in vivo, luego pueden sufrir adicionalmente análisis y selección in vitro, por ejemplo cribando las células transfectadas para aislar las células que expresan anticuerpos al antígeno de interés. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas adicionalmente se pueden manipular in vitro, tal como por métodos de maduración de afinidad in vitro tales como aquellos descritos en las Publicaciones PCT Nos. WO 97/29131 and WO 00/56772.

Los anticuerpos monoclonales también se producen inmunizando un animal no humano que comprende alguno, o todos, del locus de inmunoglobulina humana con un antígeno de interés. En una modalidad, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón modificada genéticamente que comprende fragmentos grandes de los loci de inmunoglobulina humana y es deficiente de producción de anticuerpo de ratón. Ver, por ejemplo, Green et al. (1994) Nature Genet. 7:13-21 y Patentes de Estados Unidos Nos. 5,916,771; 5,939,598; 5,985,615; 5,998,209; 6,075,181; 6,091,001; 6,114,598 y 6,130,364. Ver también Publicaciones PCT Nos. WO 91/10741; WO 94/02602; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 98/16654; WO 98/24893; WO 98/50433; WO 99/45031; WO 99/53049; WO 0009560; y WO 00/037504. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano tipo adulto de anticuerpos completamente humanos,

y genera anticuerpos monoclonales humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpo humano a través de la introducción de megabase dimensionada, configuración de fragmentos YAC de línea germinal de los loci de cadena pesada humana y loci de cadena ligera κ (kappa). Ver Mendez et al. (1997) Nature Genet. 15:146-156; Green and Jakobovits (1998) J. Exp. Med. 188:483-495.

Los métodos *in vitro* también se pueden usar para producir los anticuerpos progenitores, en donde la biblioteca de anticuerpo se selecciona para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de enlace deseada. Los métodos para tal selección de bibliotecas de anticuerpo recombinante son bien conocidos en el arte e incluyen los métodos descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,223,409; Publicaciones PCT Nos. WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; y WO 97/29131; Fuchs 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. (1990) Nature 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) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nucl. Acid Res. 19:4l33-4137; y Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982; y Publicación de Estados Unidos No. 20030186374.

Los anticuerpos progenitores de la presente invención también se pueden generar usando varios métodos de expresión en fagos conocidos en el arte. En los métodos de expresión en fagos, los dominios de anticuerpo

funcionales se expresan en la superficie de las partículas de fago que porta las secuencias de polinucleótido que las codifica. En particular, tales fagos se pueden utilizar para expresar dominios de enlace de antígeno expresados de un reportero o biblioteca de anticuerpo combinatorial (por ejemplo, humano o murino). El fago que expresa un dominio de enlace de antígeno que enlaza el antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con antígeno, por ejemplo, usando antígeno etiquetado o antígeno unido o capturado a una perla o superficie sólida. Los fagos usados en estos métodos son fagos típicamente filamentosos que incluyen dominios de enlace de fd y M13 expresados de fagos con Fab, Fv o dominios de anticuerpo de Fv estabilizados con disulfuro recombinantemete fusionados ya sea a la proteía de gen VIII o gen III de fago. Los ejemplos de métodos de expresión en fago que se pueden usar para producir los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos descritos en Brinkman et al. (1995) J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al. (1995) J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al. (1997) Gene 1879-18; Burton et al. (1994) Advances Immunol. 57:191-280; Publicaciones PCT Nos. WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; y WO 95/20401; y Patentes de Estados Unidos Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743; y 5,969,108.

Después de la selección de fagos, las regiones codificantes de anticuerpo de los fagos se pueden aislar y usar para generar anticuerpos completos incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de enlace de antígeno deseado, incluyendo células de mamífero, células de insectos, células

de plantas, levadura, y bacterias, por ejemplo, como se describe a detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y $F(ab')_2$ también se pueden emplear usando métodos conocidos en el arte tales como aquellos descritos en la Publicación PCT No. WO 92/22324; Mullinax et al., (1992) BioTechniques 12(6):864-869; y Sawai et al. (1995) AJRI 34:26-34; y Better et al. (1988) Science 240:1041-1043. Los ejemplos de técnicas las cuales se pueden usar para producir Fvs de cadena única y anticuerpos incluyen aquellos descritos en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4,946,778 y 5,258,498; Huston et al. (1991) Methods Enzymol. 203:46-88; Shu et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7995-7999; y Skerra et al. (1988) Science 240:1038-1040.

Alternativo a la selección de bibliotecas de anticuerpo recombinante por expresión en fagos, otras metodologías conocidas en el arte para la selección de bibliotecas combinatoriales grandes se pueden aplicar a la identificación de anticuerpos progenitores. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno en el cual la biblioteca de anticuerpo recombinante se expresa como fusiones de proteína de ARN, como se describe en la Publicación PCT No. WO 98/31700 de Szostak and Roberts, y en Roberts and Szostak (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297-12302. En este sistema, una fusión covalente se crea entre un mARN y el péptido o proteína que codifica por traducción *in vitro* de mARNs sintéticos que portan puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por consiguiente, un mARN específico se puede enriquecer de una mezcla compleja de mARNs (por ejemplo, una biblioteca combinatorial) basada en las propiedades de la proteína o péptido codificado, por ejemplo, anticuerpo, o porción del mismo,

tal como enlace del anticuerpo, o porción del mismo, al antígeno de especificidad dual. Las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos, o porciones de los mismos, recuperadas de la selección de tales bibliotecas se pueden expresar por medios recombinantes como se describe en la presente (por ejemplo, en células huéspedes de mamífero) y, además, se pueden someter a maduración de afinidad adicional ya sea por rondas adicionales de selección de fusiones péptido de mARN en las cuales las mutaciones se han introducido en las secuencias originalmente seleccionadas, o por otros métodos para maduración de afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se describe en la presente.

En otro procedimiento, los anticuerpos progenitores también se pueden generar usando métodos de expresión en levadura conocidos en el arte. En los métodos de expresión en levadura, los métodos genéticos se usan para atar dominios de anticuerpo a la pared de célula de levadura y expresarlos en la superficie de la levadura. En particular, tal levadura se puede utilizar para expresar dominios de enlace de antígeno expresados de un repertorio o biblioteca de anticuerpo combinatorial (por ejemplo, humano o murino). Los ejemplos de métodos de expresión en levadura que se pueden usar para producir los anticuerpos progenitores incluyen aquellos descritos en la Patente de Estados Unidos No. 6,699,658.

Los anticuerpos descritos en la presente se pueden modificar adicionalmente para generar anticuerpos progenitores humanizados e injertados a CDR. Los anticuerpos progenitores injertados a CDR comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano en donde una o más de las regiones CDR de V_H y/o V_L se reemplazan con secuencias de CDR

de anticuerpos murinos que enlazan el antígeno de interés. Una secuencia de estructura de cualquier anticuerpo humano puede servir como el modelo para injerto de CDR. Sin embargo, el remplazo de cadena recta sobre tal estructura con frecuencia conduce a alguna pérdida de afinidad al antígeno. Tanto más homólogo es un anticuerpo humano al anticuerpo murino original, cuanto menos probable es la posibilidad que la combinación de las CDRs murinas con el armazón humano introduzca distorsiones en las CDRs que podrían reducir la afinidad. Por lo tanto, en una modalidad, el armazón variable humano que se elige para remplazar el armazón variable murino aparte de las CDRs tiene al menos 65% de identidad de secuencia con el armazón de región variable de anticuerpo murina. En una modalidad, las regiones variables humanas y murinas aparte de las CDRs tienen al menos 70% de identidad de secuencia. En una modalidad particular, las regiones variables humanas y murinas aparte de las CDRs tienen al menos 75% de identidad de secuencia. En otra modalidad, las regiones variables humanas y murinas aparte de las CDRs tienen al menos 80% de identidad de secuencia. Los métodos para producir tales anticuerpos son conocidos en el arte (ver Patente EP No. EP 239,400; Publicación PCT No. WO 91/09967; Patentes de Estados Unidos Nos. 5,225,539; 5,530,101; y 5,585,089), restauración o reconstrucción (Patentes EP Nos. EP 592,106 y EP 519,596; Padlan (1991) Mol. Immunol. 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) Protein Engin. 7(6):805-814; Roguska et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973), y transposición de cadena (Patente de Estados Unidos No. 5,565,352); y anticuerpos anti-idiotípicos.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de anticuerpo de especie no humana que enlaza el antígeno deseado que tiene una o

más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de la especie no humana y regiones de armazón de una molécula de inmunoglobulina humana. Las secuencias de Ig humana 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.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.acjp/.about.yasuhito- /Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/virN_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/Web-pages/Pept/spottech.html;

www.jerini.de/fr roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983). Tales secuencias importadas se pueden usar para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar el enlace, afinidad, velocidad de asociación, velocidad de disociación, avidez, especificidad, vida media, o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en el arte.

Los residuos de armazón en las regiones de armazón humanas se pueden sustituir con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, por ejemplo, mejorar, el enlace de antígeno. Estas sustituciones de armazón se identifican por métodos bien conocidos en el arte, por ejemplo, por modelación de las interacciones de la CDR y residuos de armazón para identificar los residuos de armazón importantes para el enlace de antígeno y comparación de secuencia para identificar los residuos de armazón inusuales en posiciones particulares. (Ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 5,585,089; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en el arte. Están disponibles programas de computadora los cuales ilustran y exhiben estructuras conformaciones tridimensionales probables de

secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas exhibiciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para enlazar su antígeno. De esta manera, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar de las secuencias de consenso e importadas de modo que la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad incrementada para los antígenos objetivos, se logra. En general, los residuos CDR son directamente y más sustancialmente involucrados en el enlace de antígeno que influye. Los anticuerpos pueden ser humanizados usando una variedad de técnicas conocidas en el arte, tales como pero no limitadas a aquellas descritas en Jones et al. (1986) Nature 321:522; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534; Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901; Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol. 151:2623; Padlan (1991) Mol. Immunol. 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) Prot. Engin. 7(6):805-814; Roguska et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973; Publicación PCT No. WO 91/09967, Solicitudes Internacionales Nos. PCT/US98/16280; US96/18978; US91/09630; US91/05939; US94/01234; GB89/01334; GB91/01134; GB92/01755; Publicaciones PCT Nos. WO90/14443; WO90/14424; W090/14430; Patentes EU Nos. EP 229,246; EP 592,106; EP 519,596; EP 239,400; Patentes de Estados Unidos Nos. 5,565,332; 5,723,323; 5,976,862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192; 5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 6,204,023; 6,180,370; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089; 5,225,539; y 4,816,567.

B. Criterios para seleccionar anticuerpos monoclonales progenitores

Una modalidad de la invención pertenece a la selección de anticuerpos progenitores con al menos una o más propiedades deseadas en la molécula de DVD-Ig. En una modalidad, la propiedad deseada se selecciona de uno o más parámetros de anticuerpo. En otra modalidad, los parámetros de anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítope, estabilidad, solubilidad, eficiencia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y enlace de antígeno ortólogo.

B1. Afinidad a antígeno

La afinidad deseada de un mAb terapéutico puede depender de la naturaleza del antígeno, y el criterio de valoración terapéutico deseado. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales tienen mayores afinidades (Kd = 0.01 - 0.50 pM) cuando bloquean una interacción de receptor citocina-citocina ya que tal interacción son usualmente interacciones de alta afinidad (por ejemplo, rangos <pM - <nM). En tales casos, la afinidad de mAb para su objetivo debe ser igual a o mejor que la afinidad de la citocina (ligando) para su receptor. Por otra parte, el mAb con menor afinidad (rango > nM) podría ser terapéuticamente efectivo por ejemplo, en la depuración de proteínas potencialmente patogénicas circulantes por ejemplo, anticuerpos monoclonales que enlazan a, secuestrador, y especies

circulantes claras de A-β amiloide. En otros casos, la reducción de la afinidad de un mAb de alta afinidad existente por mutagénesis dirigida al sitio o usando un mAb con menor afinidad para su objetivo se podría usar para evitar efectos secundarios potenciales por ejemplo, un mAb de alta afinidad puede secuestrar/neutralizar todo su objetivo propuesto, suprimiendo/eliminando completamente las funciones de la proteína de objetivo. En este escenario, un mAb de baja afinidad puede secuestrar/neutralizar una fracción del objetivo que puede ser responsable de los síntomas de enfermedad (los niveles patológicos o sobre-producidos), permitiendo así que una fracción del objetivo continúe realizando sus funciones fisiológicas normales. Por lo tanto, puede ser posible reducir la Kd para ajustar la dosis y/o reducir los efectos secundarios. La afinidad del mAb parental puede jugar un papel en dirigir apropiadamente las moléculas de superficie celular para lograr el resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, si un objetivo se expresa en células de cáncer con alta densidad y en células normales con baja densidad, un mAb de menor afinidad enlazará un número mayor de objetivos en células de tumor que las células normales, resultando en la eliminación de células de tumor vía ADCC o CDC, y por lo tanto puede tener efectos terapéuticamente deseables. Por consiguiente, la selección de un mAb con afinidad deseada puede ser relevante para objetivos tanto solubles como de superficie.

La señalización a través de un receptor en interacción con su ligando puede depender de la afinidad de la interacción de receptor-ligando. De manera similar, es concebible que la afinidad de un mAb para un receptor de superficie podría determinar la naturaleza de la señalización intracelular y si el mAb puede suministrar una señal de agonista o antagonista. La naturaleza basada en afinidad

de señalización basada en mAb puede tener un impacto de su perfil de efecto secundario. Por lo tanto, la afinidad deseada y funciones deseadas de anticuerpos monoclonales terapéuticos necesitan ser determinadas cuidadosamente por experimentación in vitro e in vivo.

La Kd deseada de una proteína de enlace (por ejemplo, un anticuerpo) se puede determinar experimentalmente dependiendo del resultado terapéutico deseado. En una modalidad, se seleccionan anticuerpos progenitores con afinidad (Kd) para un antígeno particular igual a, o mejor que, la afinidad deseada de la DVD-Ig para el mismo antígeno. Los anticuerpos progenitores para una molécula de DVD-Ig dada pueden ser el mismo anticuerpo o anticuerpos diferentes. La cinética y afinidad de enlace de antígeno se valoran por Biacore u otra técnica similar. En una modalidad, cada anticuerpo progenitor tiene una constante de disociación (Kd) para su antígeno seleccionado del grupo que consiste de: a lo sumo aproximadamente 10^{-7} M; a lo sumo aproximadamente 10^{-8} M; a lo sumo aproximadamente 10^{-9} M; a lo sumo aproximadamente 10^{-10} M; a lo sumo aproximadamente 10^{-11} M; a lo sumo aproximadamente 10^{-12} M; y a lo sumo 10^{-13} M. El primer anticuerpo progenitor del cual VD1 se obtiene y segundo anticuerpo progenitor del cual VD2 se obtiene pueden tener afinidad (KD) similar o diferente para el antígeno respectivo. Cada anticuerpo progenitor tiene una constante de velocidad de asociación (Kon) para el antígeno seleccionado del grupo que consiste de: al menos aproximadamente $10^2M^{-1}S^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3M^{-1}S^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4M^{-1}S^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5M^{-1}S^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6M^{-1}S^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón superficial. El primer anticuerpo progenitor del

cual VD1 se obtiene y el segundo anticuerpo progenitor del cual VD2 se obtiene pueden tener constante de velocidad de asociación (Kon) similar o diferente para el antígeno respectivo. En una modalidad, cada anticuerpo progenitor tiene una constante de disociación (Koff) para el antígeno seleccionado del grupo que consiste de: a lo sumo aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; a lo sumo aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; a lo sumo aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; y a lo sumo aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón superficial. El primer anticuerpo progenitor del cual VD1 se obtiene y el segundo anticuerpo progenitor del cual VD2 se obtiene pueden tener constantes de velocidad de disociación (Koff) similares o diferentes para el antígeno respectivo.

B2. Potencia

La afinidad/potencia deseada de anticuerpos monoclonales parentales dependerá del resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, para interacciones de receptor-ligando (R-L) la afinidad (Kd) es igual a o mejor que la kd de R-L (rango pM). Para depuración simple de una proteína circulante patológica, la kd podría estar en el rango de nM bajo por ejemplo, la depuración de varias especies de péptido A-β circulante. Además, la kd también dependerá de si el objetivo expresa múltiples copias del mismo epítope por ejemplo, un epítope conformación dirigido a mAb en olígomeros de A-β.

Donde VD1 y VD2 enlazan el mismo antígeno, pero distintos epítopes, la DVD-Ig contendrá 4 sitios de enlace para el mismo antígeno, incrementando así la avidez y por lo cual la kd evidente de la DVD-Ig. En una modalidad, se eligen anticuerpos progenitores con igual o menor kd que aquella

deseada en la DVD-Ig. Las consideraciones de afinidad de un mAb parental también pueden depender de si la DVD-Ig contiene cuatro o más sitios de enlace de antígeno idénticos (es decir, una DVD-Ig de un mAb único). En este caso, la kd evidente sería mayor que el mAb debido a la avidez. Tales DVD-Igs se pueden emplear para la reticulación de receptor de superficie, incrementar la potencia de neutralización, mejorar la depuración de proteínas patológicas, etc.

En una modalidad, se seleccionan anticuerpos progenitores con potencia de neutralización para antígeno específico igual a o mejor que el potencial de neutralización deseado de la DVD-Ig para el mismo antígeno. La potencia de neutralización se puede evaluar por un bioensayo dependiente de objetivo donde las células de tipo apropiado producen una señal medible (es decir, proliferación o producción de citocina) en respuesta a la estimulación de objetivo, y la neutralización de objetivo por el mAb puede reducir la señal en una manera dependiente de la dosis.

B3. Funciones Biológicas

Los anticuerpos monoclonales pueden realizar potencialmente diversas funciones. Algunas de estas funciones se listan en la Tabla 1. Estas funciones se pueden valorar tanto por ensayos in vitro (por ejemplo, ensayos bioquímicos y basados en células) como modelos animales in vivo.

Tabla 1: <u>Algunas Aplicaciones Potenciales de Anticuerpos Terapéuticos</u>

Objetivo (Clase)	Mecanismo de Acción (objetivo)
Soluble (citocinas, otras)	Neutralización de actividad (por ejemplo, una citocina) Mejoramiento de depuración (por ejemplo, oligómeros Aβ) Incremento de vida media (por ejemplo, GLP1)
Superficie Celular (Receptores, otros)	Agonista (por ejemplo, GLP1 R; EPO R; etc.) Antagonista (por ejemplo, integrinas; etc.) Citotóxico (CD 20; etc.)
Depósitos de proteína	Mejoramiento de depuración/degradación (por ejemplo, placas de Aβ, depósitos amiloides)

Los mAbs con distintas funciones descritas en los ejemplos en la presente en la Tabla 1 se pueden seleccionar para lograr los resultados terapéuticos deseados. Dos o más anticuerpos monoclonales progenitores seleccionados luego se pueden usar en formato DVD-Ig para lograr dos distintas funciones en una molécula de DVD-Ig única. Por ejemplo, una DVD-Ig se puede generar seleccionando un mAb progenitor que neutraliza la función de una citocina específica, y seleccionando un mAb progenitor que mejora la depuración de una proteína patológica. De manera similar, se pueden seleccionar dos anticuerpos monoclonales progenitores que reconocen dos diferentes receptores de superficie celular, un mAb con una función agonista en un receptor y el otro mAb con una función antagonista en un receptor diferente. Estos dos anticuerpos monoclonales seleccionados cada uno con una función distinta se pueden usar para construir una molécula de DVD-Ig única que poseerá las dos distintas funciones (agonista y antagonista) de los anticuerpos monoclonales seleccionados en una molécula única. De manera similar, dos anticuerpos monoclonales antagonistas para los receptores de superficie celular cada uno bloqueando el enlace de los ligandos de receptor respectivos (por ejemplo, EGF e IGF) se pueden usar en un formato de

DVD-Ig. A la inversa, un mAb anti-receptor antagonista (por ejemplo, anti-EGFR) y un mAb mediador anti-soluble neutralizante (por ejemplo, anti-IGF1/2) se puede seleccionar para producir una DVD-Ig.

B4. Reconocimiento de Epítope

Diferentes regiones de proteínas pueden realizar diferentes funciones. Por ejemplo, las regiones específicas de una citocina interactúan con el receptor de citocina para causar la activación del receptor mientras otras regiones de la proteína se pueden requerir para estabilizar la citocina. En este caso, se puede seleccionar un mAb que enlaza específicamente a las regiones que interactúan con el receptor) en la citocina y bloquean la interacción de receptor de citocina. En algunos casos, por ejemplo ciertos receptores de quimiocina que enlazan múltiples ligandos, se puede seleccionar un mAb que enlaza el epítope (región en el receptor de quimiocina) que interactúa con solamente un ligando. En otros casos, los anticuerpos monoclonales pueden enlazar epítopes en un objetivo que no son directamente responsables de las funciones fisiológicas de la proteína, pero el enlace de un mAb a estas regiones ya sea podría interferir con las funciones fisiológicas (obstrucción estérica) o alterar la conformación de la proteína de modo que la proteína no puede funcionar (mAb a receptores con múltiples ligandos los cuales alteran la conformación de receptor de modo que ninguno de los ligandos puede enlazar). Los anticuerpos monoclonales anti-citocina que no bloquean el enlace de la citocina a su receptor, pero bloquean la transducción de señal también se han identificado (por ejemplo, 125-2H, un mAb anti-IL-18).

Los ejemplos de epítopes y funciones de mAb incluyen, pero no se limitan a, interacción de Ligando-Receptor de bloqueo (R-L) (mAb neutralizante

que enlaza el sitio de interacción R); obstrucción estérica que resulta en ningún enlace R o disminuido. Un Ab puede enlazar el objetivo en un sitio diferente del sitio de enlace de receptor, pero aún interfiere con el enlace de receptor y funciones del objetivo induciendo el cambio conformacional y eliminando la función (por ejemplo, Xolair), enlace a R pero bloqueando la señalización (125-2H).

En una modalidad, el mAb parental necesita dirigir el epítope apropiado para máxima eficacia. Tal epítope se debe conservar en la DVD-Ig. El epítope de enlace de un mAb se puede determinar por varios procedimientos, incluyendo co-cristalografía, proteólisis limitada de complejo de mAb-antígeno más mapeo de péptido espectrométrico de masas (Legros et al. (2000) Protein Sci. 9:1002-10), bibliotecas de péptido expresado en fagos (O'Connor et al. (2005) J. Immunol. Methods 299:21-35), así como también mutagénesis (Wu 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 una baja potencia en una base en masa como una consecuencia de un peso molecular típicamente grande). Para acomodar el cumplimiento del paciente y para dirigir adecuadamente las terapias de enfermedad crónica y tratamiento de paciente ambulatorio, es deseable la administración subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.) de mAbs terapéuticos. Por ejemplo, el volumen deseable máximo para la administración s.c. es ~1.0 mL, y por lo tanto, las concentraciones de > 100 mg/mL son deseables para limitar el número de inyecciones por dosis. En una modalidad,

el anticuerpo terapéutico se administra en una dosis. El desarrollo de tales formulaciones se restringe, sin embargo, por interacciones proteína-proteína (por ejemplo, agregación, la cual potencialmente incrementa los riesgos de inmunogenicidad) y por limitaciones durante el procesamiento y suministro (por ejemplo, viscosidad). En consecuencia, las cantidades grandes requeridas para la eficacia clínica y las restricciones de desarrollo asociadas limitan la explotación completa de la potencia de formulación de anticuerpo y administración s.c. en regímenes de dosis alta. Es evidente que las propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas de una molécula de proteína y la solución de proteína son de mayor 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 presente esencialmente retiene su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica en almacenamiento. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada por un período de tiempo seleccionado. En una modalidad, el anticuerpo en la formulación es estable a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) o a 40°C por al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2-8°C por al menos 1 año por al menos 2 años. Además, en una modalidad, la formulación es estable después del congelamiento (a, por ejemplo, -70°C) y descongelación de la formulación, después referido como “ciclo de congelación/descongelación”. 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.

Es deseable una DVD-Ig que es estable in vitro a varias temperaturas por un período de tiempo extendido. Esto se puede lograr por selección rápida de mAbs parentales que son estables in vitro a temperatura elevada, por ejemplo, a 40°C por 2-4 semanas, y luego valorar la estabilidad. Durante el almacenamiento a 2-8°C, la proteína revela estabilidad por al menos 12 meses, por ejemplo, al menos 24 meses. La estabilidad (% de molécula intacta monomérica) se puede valorar usando varias técnicas tal como cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de exclusión de tamaño, SDS-PAGE, así como también prueba de bioactividad. Para una lista más comprensiva de técnicas analíticas que se pueden emplear para analizar las modificaciones covalentes y conformacionales ver Jones (1993) Analytical methods for the assessment of protein fonnulations and delivery systems. En: Cleland, J. L.; Langer, R., editors. Formulation and delivery of peptides and proteins, 1st edition, Washington, ACS, pg. 22-45; y Pearlman and Nguyen (1990) Analysis of protein drugs. En: Lee, V. H., editor. Peptide and protein drug delivery, 1st edition, New York, Marcel Dekker, Inc., pg. 247-301.

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

Además de bajos niveles de agregado, el anticuerpo, en una

modalidad, debe ser químicamente estable. La estabilidad química se puede determinar por cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico o aniónico), cromatografía de interacción hidrofóbica, u otros métodos tales como enfoque isoeléctrico o electroforesis capilar. Por ejemplo, la estabilidad química del anticuerpo puede ser tal que después del almacenamiento de al menos 12 meses a 2-8°C el pico que representa el anticuerpo no modificado en una cromatografía de intercambio catiónico puede incrementar no más de 20%, en una modalidad, no más de 10%, o, en otra modalidad, no más de 5% en comparación con la solución de anticuerpo previo a la prueba de almacenamiento.

En una modalidad, los anticuerpos progenitores exhiben integridad estructural; correcta formación de enlace de disulfuro, y pliegue correcto: La inestabilidad química debido a cambios en la estructura secundaria o terciaria de un anticuerpo puede impactar la actividad de anticuerpo. Por ejemplo, la estabilidad como se indica por la actividad del anticuerpo puede ser tal que después del almacenamiento de al menos 12 meses a 2-8°C la actividad del anticuerpo puede disminuir no más de 50%, en una modalidad no más de 30%, o aún no más de 10%, o en una modalidad no más de 5% o 1% en comparación con la solución de anticuerpo previo a la prueba de almacenamiento. Los ensayos de enlace de antígeno adecuados se pueden emplear para determinar la actividad de anticuerpo.

B5.2. Solubilidad

La “solubilidad” de un mAb se correlaciona con la producción de IgG monomérica correctamente plegada. La solubilidad de la IgG, por lo tanto, se

puede evaluar por HPLC. Por ejemplo, la IgG (monomérica) soluble producirá un pico único en el cromatograma de HPLC, mientras que la insoluble (por ejemplo, multimérica y agregada) producirá una pluralidad de picos. Una persona experta en el arte, por lo tanto será capaz de detectar un incremento o disminución en la solubilidad de una IgG usando técnicas de HPLC rutinarias. Para una lista más comprensiva de las técnicas analíticas que se pueden emplear para analizar la solubilidad (ver Jones (1993) Dep. Chem. Biochem. Eng., Univ. Coll. London, London, UK. Editores: Shamlou, P. Ayazi. Process. Solid-Liq. Suspensions, 93-117. Publicista: Butterworth-Heinemann, Oxford, UK y Pearlman and Nguyen (1990) Advances Parenteral Sci. 4:247-301). La solubilidad de un mAb terapéutico es crítica para la formulación a alta concentración frecuentemente requerida para la dosificación adecuada. Como se resume en la presente, las solubilidades de > 100 mg/mL se pueden requerir para acomodar la eficiente dosificación de anticuerpo. Por ejemplo, la solubilidad de anticuerpo no puede ser menor que aproximadamente 5 mg/mL en fase de investigación temprana, en una modalidad no menor que aproximadamente 25 mg/mL en etapas de ciencia de proceso avanzadas, o en una modalidad no menor que aproximadamente 100 mg/mL, o en una modalidad no menor que aproximadamente 150 mg/mL. Es obvio para una persona experta en el arte que las propiedades intrínsecas de una molécula de proteína son propiedades fisicoquímicas importantes de la solución de proteína, por ejemplo, estabilidad, solubilidad, viscosidad. Sin embargo, una persona experta en el arte apreciará que existe una amplia variedad de excipientes que se pueden usar como aditivos para impactar benéficamente las características de la formulación de proteína final. Estos excipientes pueden incluir: (i) solventes

líquidos, cosolventes (por ejemplo, alcoholes tal como etanol); (ii) agentes amortiguadores (por ejemplo, amortiguadores defosfato, acetato, citrato, aminoácido); (iii) azúcares o alcoholes de azúcar (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, 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 de azúcar); y (vi) otros (por ejemplo, conservadores, agentes quelantes, antioxidantes, sustancias quelantes (por ejemplo, EDTA), polímeros biodegradables, moléculas portadoras (por ejemplo, RSA, PEGs).

La viscosidad es un parámetro de alta importancia con respecto a la manufactura de anticuerpo y procesamiento de anticuerpo (por ejemplo, diafiltración/ultrafiltración), procesos de acabado lleno (aspectos de bombeo, aspectos de filtración) y aspectos de suministro (suministro por inyección, suministro de dispositivo sofisticado). Las bajas viscosidades hacen posible que la solución líquida del anticuerpo tenga una mayor concentración. Esto hace posible que la misma dosis se pueda administrar en volúmenes menores. Los pequeños volúmenes de inyección son inherentes a la ventaja de menor dolor en sensaciones de inyección, y las soluciones no necesariamente tienen que ser isotónicas para reducir el dolor en la inyección en el paciente. La viscosidad de la solución de anticuerpo puede ser tal que a velocidades de cizallamiento de 100 (l/s) de solución de anticuerpo la viscosidad está por debajo de 200 mPa s, en una modalidad por debajo de 125 mPa s, en otra modalidad por debajo de 70 mPa s, y en todavía otra modalidad por debajo de 25 mPa s o aún por debajo de 10 mPa s.

B 5.3. Eficiencia de Producción

La generación de una DVD-Ig que se expresa eficientemente en células de mamífero, tales como células de ovarios de hámster chino (CHO), en una modalidad requerirá dos anticuerpos monoclonales parentales los cuales son por sí mismos expresados eficientemente en células de mamífero. El rendimiento de producción de una línea de mamífero estable (es decir, CHO) debe estar arriba de aproximadamente 0.5 g/L, en una modalidad arriba de aproximadamente 1 g/L, y en otra modalidad en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 g/L o más (Kipriyanov and Little (1999) Mol. Biotechnol. 12:173-201; Carroll and Al-Rubeai (2004) Expert Opin. Biol Ther. 4:1821-9).

La producción de anticuerpos y proteínas de fusión de Ig en células de mamífero es influenciada por varios factores. La modificación genética del vector de expresión vía incorporación de promotores, mejoradores y marcadores de selección fuertes puede maximizar la transcripción del gen de interés de una copia de vector integrada. La identificación de sitios de integración de vector que son permisivos para altos niveles de transcripción de gen puede aumentar la expresión de proteína de un vector (Wurm et al. (2004) Nature Biotech. 22(11):1393-1398). Además, los niveles de producción son afectados por la relación de cadenas pesada y ligera de anticuerpo y varias etapas en el proceso de secreción y montaje de proteína (Jiang et al. (2006) Biotechnol. Progr. 22(1):313-8).

B6. Immunogenicidad

La administración de un mAb terapéutico puede resultar en cierta

incidencia de una respuesta inmune (es decir, la formación de anticuerpos endógenos dirigidos contra el mAb terapéutico). Los elementos potenciales que pueden inducir la inmunogenicidad se deben analizar durante la selección de los anticuerpos monoclonales parentales, y las etapas para reducir tal riesgo se pueden tomar para optimizar los anticuerpos monoclonales parentales previo a la construcción de DVD-Ig. Se ha encontrado que los anticuerpos derivados de ratón son altamente inmunogénicos en pacientes. La generación de anticuerpos quiméricos comprendidos de regiones constantes humanas y variables de ratón presenta una siguiente etapa lógica para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos terapéuticos (Morrison and Schlom (1990) Import. Adv. Oncol. 3-18). Alternativamente, la inmunogenicidad se puede reducir transfiriendo las secuencias de CDR murinas en un armazón de anticuerpo humano (reconformación/inserción de CDR/humanización), como se describe para un anticuerpo terapéutico por Riechmann et al. (1988) Nature 332:32327. Otro método es referido como "reconstrucción" o "restauración", iniciando con los dominios ligero y pesado variables de roedor, solamente los aminoácidos de armazón de superficie accesible son alterados a unos humanos, mientras que la CDR y aminoácidos enterrados permanecen del anticuerpo de roedor parental (Roguska et al. (1996) Protein Engineer. 9:895-904). En otro tipo de humanización, en lugar de injertar las CDRs completas, una técnica injerta solamente las "regiones determinantes de especificidad" (SDRs), definidas como el subconjunto de residuos de CDR que se involucran en el enlace del anticuerpo a su objetivo (Kashmiri et al. (2005) Methods 36(1):25-34). Esto necesita identificación de las SDRs ya sea a través del análisis de estructuras tridimensionales disponibles de complejos de anticuerpo-objetivo o

análisis mutacional de los residuos de CDR de anticuerpo para determinar cuáles interactúan con el objetivo. Alternativamente, los anticuerpos completamente humanos pueden tener inmunogenicidad reducida en comparación con anticuerpos murinos, quiméricos o humanizados.

Otro procedimiento para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos terapéuticos es la eliminación de ciertas secuencias específicas que se predice que son inmunogénicas. En un procedimiento, después de una primera generación la biológica se ha probado en humanos y se encontró que es inaceptablemente imunogénica, los epítopes de células B se pueden mapear y luego alterar para evitar la detección inmune. Otro procedimiento usa métodos para predecir y remover los epítopes de células T potenciales. Los métodos computacionales se han desarrollado para explorar e identificar las secuencias de péptido de terapéuticos biológicos con el potencial para enlazar las proteínas de MHC (Desmet et al. (2005) Proteins 58:53-69). Alternativamente un método basado en células dendríticas humanas se puede usar para identificar epítopes de células T CD4+ en alergenos de proteína potenciales (Stickler et al. (2000) J. Immunother. 23: 654-60; Morrison and Schlom (1990) Important Adv. Oncol. 3-18; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Roguska et al. (1996) Protein Engineer. 9:895-904; Kashmiri et al. (2005) Methods (San Diego Calif.) 36(1):25-34; Desmet-Johan et al. 2005) Proteins 58:53-69; Stickler et al. (2000) J. Immunother. 23:654-60).

B7. Eficacia In Vivo

Para generar una molécula de DVD-Ig con eficacia in vivo deseada, es importante generar y seleccionar mAbs con eficacia in vivo deseada de manera

similar cuando se da en combinación. Sin embargo, en algunos casos la DVD-Ig puede exhibir eficacia in vivo que no se puede lograr con la combinación de dos mAbs separados. Por ejemplo, una DVD-Ig puede poner dos objetivos en proximidad cercana conduciendo a una actividad que no se puede lograr con la combinación de dos mAbs separados. Las funciones biológicas deseables adicionales se describen en la presente en la sección B3. Los anticuerpos progenitores con características deseables en la molécula de DVD-Ig se pueden seleccionar con base en factores tales como t ½ farmacocinética; distribución de tejido; objetivos de superficie celular versus solubles; y concentración de objetivo-soluble/densidad-superficie.

B8. Distribución de Tejido In Vivo

Para generar una molécula de DVD-Ig con distribución de tejido in vivo deseada, en una modalidad se deben seleccionar mAbs progenitores con perfil de distribución de tejido in vivo deseada similar. Alternativamente, con base en el mecanismo de la estrategia de objetivo específica dual, puede otras veces no ser requerido seleccionar mAbs progenitores con la distribución de tejido in vivo deseada de manera similar cuando se da en combinación. Por ejemplo, en el caso de una DVD-Ig en la cual un componente de enlace dirige la DVD-Ig a un sitio específico poniendo el segundo componente de enlace en el mismo sitio objetivo. Por ejemplo, una especificidad de enlace de una DVD-Ig podría dirigir el páncreas (células islote) y la otra especificidad podría poner la GLP1 al páncreas para inducir la insulina.

B9. Isotipo

Para generar una molécula de DVD-Ig con propiedades deseadas incluyendo, pero no limitado a, isotipo, funciones efectoras y la vida media circulante, en una modalidad se seleccionan mAbs progenitores con funciones efectoras de Fc apropiadas dependiendo de la utilidad terapéutica y el criterio de valoración terapéutico deseado. Hay cinco isotipos o clases de cadena pesada principales algunos de los cuales tienen diversos sub-tipos y estos determinan las funciones efectoras de una molécula de anticuerpo. Estas funciones efectoras residen en la región de bisagra, dominios CH2 y CH3 de la molécula de anticuerpo. Sin embargo, los residuos en otras partes de una molécula de anticuerpo pueden tener efectos en las funciones efectoras también. Las funciones efectoras de Fc de región bisagra incluyen: (i) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, (ii) enlace de complemento (C1q), citotoxicidad dependiente de complemento y activación (CDC), (iii) fagocitosis/depuración de los complejos de antígeno-anticuerpo, y (iv) liberación de citocina en algunos casos. Estas funciones efectoras de Fc de una molécula de anticuerpo son mediadas a través de la interacción de la región Fc con un conjunto de receptores de superficie celular de clase específica. Los anticuerpos del isotipo de IgG1 son más activos mientras que IgG2 e IgG4 tienen mínimas o ningunas funciones efectoras. Las funciones efectoras de los anticuerpos de IgG son mediadas a través de interacciones con tres tipos de receptor de Fc celular estructuralmente homólogos (y sub-tipos) (FcgRI, FcgRII y FcgRIII). Estas funciones efectoras de una IgG1 se pueden eliminar mutando los residuos aminoácidos específicos en la región bisagra inferior (por ejemplo, L234A, L235A) que son requeridos para el enlace de FcgR and C1q. Los residuos aminoácido en la región Fc, en particular los dominios CH2-CH3,

también determinan la vida media circulante de la molécula de anticuerpo. Esta función de Fc es mediada a través del enlace de la región Fc al receptor de Fc neonatal (FcRn) el cual es responsable para la recirculación de moléculas de anticuerpo de los lisosomas ácidos de nuevo a la circulación general.

Si un mAb debe tener un isotipo activo o inactivo dependerá del criterio de valoración terapéutico deseado para un anticuerpo. Algunos ejemplos de uso de isotipos y resultado terapéutico deseado se listan a continuación:

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

Las funciones efectoras de Fc de un mAb parental se pueden determinar por varios métodos in vitro bien conocidos en el arte.

Como se discute, la selección de isotipo, y las funciones efectoras dependerán del criterio de valoración terapéutico deseado. En casos donde la simple neutralización de un objetivo circulante se desea, por ejemplo interacciones de ligando-receptor de bloqueo, las funciones efectoras no se pueden requerir. En tales casos, los isotipos o mutaciones en la región Fc de un anticuerpo que eliminan las funciones efectoras son deseables. En otros casos, donde la eliminación de células objetivo es el criterio de valoración terapéutico, por ejemplo eliminación de células de tumor, isotipos o mutaciones o desfucosilación en la región Fc que mejoran las funciones efectoras son deseables (Presta (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656; Satoh et al. (2006) Expert Opin. Biol. Ther. 6:1161-1173). De manera similar, dependiendo de la utilidad terapéutica, la vida media circulante de una molécula de anticuerpo se puede reducir/prolongar por modulación de las interacciones de anticuerpo-FcRn introduciendo mutaciones específicas en la región Fc (Dall' Acqua et al. (2006) J. Biol. Chem. 281:23514-23524; Petkova et al. (2006) Internat. Immunol. 18:1759-1769; Vaccaro et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 18709-18714).

La información publicada en los diversos residuos que influyen en las diferentes funciones efectoras de un mAb terapéutico normal puede necesitar ser confirmada para DVD-Ig. Puede ser posible que en una región Fc (diferente) adicional de formato de DVD-Ig los residuos, diferentes de aquellos identificados para la modulación de funciones efectoras de anticuerpo monoclonal, pueden ser importantes.

En general, la decisión en cuanto a cuáles funciones efectoras de Fc (isotipo) serán críticas en el formato de DVD-Ig final dependerá de la indicación de

enfermedad, objetivo terapéutico, criterio de valoración terapéutico deseado y consideraciones de seguridad. A continuación se listan las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera apropiadas ejemplares incluyendo, pero no limitado a:

- IgG1 - alotipo: Glmz
- mutante de IgG1 - A234, A235
- IgG2 - alotipo: G2m(n-)
- Kappa - Km3
- Lambda

Receptor de Fc y Estudios de C1q: La posibilidad de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) no deseadas por acomplejamiento de anticuerpo a cualquier objetivo sobre-expresado en membranas celulares se puede derogar por las mutaciones de región bisagra (por ejemplo, L234A, L235A). Estos aminoácidos sustituidos, presentes en la región bisagra de IgG1 de mAb, se espera que resulten en enlace disminuido de mAb a receptores de Fc humanos (pero no FcRn), ya que se piensa que el enlace de FcgR ocurre dentro de los sitios de superposición en la región bisagra de IgG1. Esta característica de mAb puede conducir a un perfil de seguridad mejorado sobre anticuerpos que contienen una IgG tipo silvestre. El enlace de mAb a receptores de Fc humanos se puede determinar por experimentos de citometría de flujo usando líneas celulares (por ejemplo, THP-1, K562) y una línea celular de CHO modificada genéticamente que expresa FcgRIIb (u otras FcgRs). En comparación con los anticuerpos monoclonales de control de IgG1, el mAb muestra enlace reducido a FcgRI y

FcgRIIa mientras que el enlace a FcgRIIb no es afectado. El enlace y activación de C1q por complejos de antígeno/IgG inmune activa la cascada de complemento clásica con respuestas inflamatorias y/o inmunoregulatorias consecuentes. El sitio de enlace de C1q en IgGs se ha localizado a residuos dentro de la región bisagra de IgG. El enlace de C1q a concentraciones incrementadas de mAb se evaluó por ELISA de C1q. Los resultados demuestran que el mAb es incapaz de enlazar a C1q, como se espera en comparación con el enlace de una IgG1 de control tipo silvestre. En general, la mutación de región bisagra L234A, L235A abole el enlace de mAb a FcgRI, FcgRIIa and C1q pero no impacta la interacción de mAb con FcgRIIb. Estos datos sugieren que in vivo, el mAb con Fc mutante interactuará normalmente con FcgRIIb inhibidor pero probablemente no interactuará con receptores de FcgRIIa y FcgRI activadores o C1q.

Enlace de FcRn Humano: El receptor neonatal (FcRn) es responsable del transporte de IgG a través de la placenta y control de la vida media catabólica de las moléculas de IgG. Puede ser deseable incrementar la vida media terminal de un anticuerpo para mejorar la eficacia, reducir la dosis o frecuencia de administración, o mejorar la localización al objetivo. Alternativamente, puede ser ventajoso hacer lo contrario es decir, disminuir la vida media terminal de un anticuerpo para reducir la exposición de cuerpo completo o mejorar las relaciones de enlace de objetivo a no objetivo. La adaptación de la interacción entre IgG y su receptor salvaje, FcRn, ofrece una manera de incrementar o disminuir la vida media terminal de IgG. Las proteínas en la circulación, incluyendo IgG, se recuperan en la fase de fluido a través de micropinocitosis por ciertas células, tales como aquellas del endotelio vascular. IgG

puede enlazar FcRn en endosomas bajo condiciones ligeramente ácidas (pH 6.0-6.5) y puede recircular a la superficie celular, donde se libera bajo condiciones casi neutras (pH 7.0-7.4). El mapeo del sitio de enlace de región Fc en FcRn80, 16, 17 mostró que dos residuos hisitina que se conservan a través de especies, His310 y His435, son responsables de la dependencia de pH de esta interacción. Usando tecnología de expresión en fagos, se identificó una mutación de región Fc de ratón que incrementa el enlace a FcRn y extiende la vida media de IgG de ratón (ver Victor et al. (1997) Nature Biotechnol. 15(7):637-640). Las mutaciones de región Fc que incrementan la afinidad de enlace de IgG humana para FcRn a pH 6.0, pero no a pH 7.4, también se han identificado (ver Dall'Acqua et al. (2002) J. Immunol. 169(9):5171-80). Además, en un caso, un incremento de enlace dependiente de pH similar (hasta 27 veces) también se observó para FcRn de rhesus, y esto resultó en un incremento de dos veces en la vida media en suero en monos rhesus en comparación con la IgG progenitora (ver Hinton et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216). Estos hallazgos indican que es factible extender la vida media en plasma de terapéuticos de anticuerpo adaptando la interacción de la región Fc con FcRn. A la inversa, las mutaciones de región Fc que atenúan la interacción con FcRn pueden reducir la vida media de anticuerpo.

B.10 Farmacocinética (PK)

Para generar una molécula de DVD-Ig con perfil farmacocinético deseado, en una modalidad se seleccionan mAbs progenitores con el perfil farmacocinético deseado de manera similar. Una consideración es que la respuesta inmunogénica a anticuerpos monoclonales (es decir, HAHA, respuesta

de anticuerpo anti-humano humano; HACA, respuesta de anticuerpo anti-quimérico humano) adiconalmente complica la farmacocinética de estos agentes terapéuticos. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales con mínima o nada inmunogenicidad se usan para construir moléculas de DVD-Ig de modo que las DVD-Ig resultantes también tendrán mínima o nada inmunogenicidad. Algunos de los factores que determinan la PK de un mAb incluyen, pero no se limitan a, propiedades intrínsecas del mAb (secuencia de aminoácido VH); inmunogenicidad; funciones de Fc y enlace de FcRn.

El perfil PK de anticuerpos monoclonales parentales seleccionados se puede determinar fácilmente en roedores ya que el perfil PK en roedores se correlaciona con (o predice estrechamente) el perfil PK de anticuerpos monoclonales en mono cynomolgus y humanos. El perfil PK se determina como se describe en la sección de Ejemplos 1.2.2.3.A.

Después de que se seleccionan los anticuerpos monoclonales parentales con características de PK deseadas (y otras propiedades funcionales deseadas como se discute en la presente), la DVD-Ig se construye. Cuando las moléculas de DVD-Ig contienen dos dominios de enlace de antígeno de dos anticuerpos monoclonales parentales, las propiedades PK de la DVD-Ig se evalúan también. Por lo tanto, mientras se determinan las propiedades PK de la DVD-Ig, se pueden emplear ensayos PK que determinan el perfil PK con base en la funcionalidad de ambos dominios de enlace de antígeno derivados de los 2 anticuerpos monoclonales progenitores. El perfil PK de una DVD-Ig se puede determinar como se describe en el Ejemplo 1.2.2.3.A. Los factores adicionales que pueden impactar en el perfil PK de DVD-Ig incluyen la orientación de dominio de

enlace de antígeno (CDR); tamaño de enlazante; e interacciones de Fc/FcRn. Las características PK de anticuerpos progenitores se pueden evaluar valorando los siguientes parámetros: absorción, distribución, metabolismo y excreción.

Absorción: En la actualidad, la administración de anticuerpos monoclonales terapéuticos es vía rutas parenterales (por ejemplo, intravenosa [IV], subcutánea [SC], o intramuscular [IM]). La absorción de un mAb en la circulación sistémica después de la administración ya sea SC o IM desde el espacio intersticial principalmente es a través de la trayectoria linfática. La degradación saturable, presistémica, proteolítica puede resultar en biodisponibilidad absoluta variable después de la administración extravascular. Usualmente, los incrementos en la biodisponibilidad absoluta con dosis incrementadas de anticuerpos monoclonales se pueden observar debido a la capacidad proteolítica saturada a dosis mayores. El proceso de absorción para un mAb usualmente es bastante lento ya que el fluido linfático se drena lentamente en el sistema vascular, y la duración de la absorción puede ocurrir durante horas a varios días. La biodisponibilidad absoluta de anticuerpos monoclonales después de la administración SC generalmente varía de 50% a 100%. En el caso de una estructura mediada por transporte en la barrera hemato-encefálica dirigida por el constructo de DVD-Ig, los tiempos de circulación en plasma se pueden reducir debido al transporte trans-celular mejorado en la barrera hemato-encefálica (BBB) en el compartimiento de SNC, donde la DVD-Ig se libera para habilitar la interacción vía su segundo sitio de reconocimiento de antígeno.

Distribución: Después de la administración IV, los anticuerpos monoclonales usualmente siguen un perfil de concentración-tiempo en suero (o

plasma) bifásico, comenzando con una rápida fase de distribución, seguida por una fase de eliminación lenta. En general, un modelo farmacocinético biexponencial describe mejor esta clase de perfil farmacocinético. El volumen de distribución en el compartimiento central (Vc) para un mAb usualmente es igual a o ligeramente mayor que el volumen de plasma (2-3 litros). Un patrón bifásico distinto en la concentración en suero (plasma) versus perfil de tiempo no puede ser evidente con otras rutas de administración parenterales, tal como IM o SC, debido a que la fase de distribución de la curva de concentración en cuero (plasma)-tiempo se enmascara por la porción de absorción larga. Muchos factores, incluyendo propiedades fisicoquímicas, absorción mediada por receptor orientada a objetivo y de sitio específico, capacidad de enlace de tejido, y 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 vía el riñón. Principalmente se inactivan por el metabolismo (por ejemplo, catabolismo). Para anticuerpos monoclonales terapéuticos basados en IgG, las vidas medias típicamente varían de horas a 1-2 días a alrededor de 20 días. La eliminación de un mAb se puede efectuar por muchos factores, incluyendo, pero no limitados a, afinidad para el receptor de FcRn, inmunogenicidad del mAb, el grado de glicosilación del mAb, la susceptibilidad para el mAb a proteólisis, y eliminación mediada por receptor.

B.11 Patrón de Reactividad Cruzada de Tejido en Especies Humana y Tox:

El patrón de tinción idéntico sugiere que la toxicidad humana potencial se puede evaluar 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 dos criterios. (1) tinción de tejido apropiada para la expresión conocida del objetivo de anticuerpo; y (2) patrón de tinción similar entre tejidos de especies humana y tox del mismo órgano.

Criterio 1: Las inmunizaciones y/o selecciones de anticuerpo típicamente emplean antígenos recombinantes o sintetizados (proteínas, carbohidratos u otras moléculas). El enlace a la contraparte natural y selección inversa contra antígenos no relacionados son frecuentemente parte del embudo de selección para anticuerpos terapéuticos. Sin embargo, la selección contra una multitud de antígenos con frecuencia es no práctica. Por lo tanto, los estudios de reactividad cruzada de tejido con tejidos humanos de todos los órganos principales sirven para descartar el enlace no deseado del anticuerpo a cualquiera de los antígenos no relacionados.

Criterio 2: Los estudios de reactividad cruzada de tejido comparativos con tejidos de especies humanas y tox (mono cynomolgus, perro, posiblemente roedores y otros, los mismos 36 o 37 tejidos están siendo analizados como en el estudio humano) ayudan a validar la selección de una especie tox. En los estudios de reactividad cruzada de tejido típicos en secciones de tejido congeladas, los anticuerpos terapéuticos pueden demostrar el enlace esperado al antígeno conocido y/o a un grado menor el enlace a tejidos basados ya sea en interacciones de bajo nivel (enlace no específico, enlace de bajo nivel a antígenos similares,

interacciones basadas en carga de bajo nivel, etc.). En cualquier caso, la especie animal de toxicología más relevante es una con el grado más alto de coincidencia de enlace a tejido humano y animal.

Los estudios de reactividad cruzada de tejido siguen las directrices regulatorias apropiadas incluyendo la directriz de EC CPMP III/5271/94 "Production and quality control of mAbs" y la 1997 US FDA/CBER "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use". Las criosecciones (5 µm) de tejidos humanos obtenidas en la autopsia o biopsia se fijaron y secaron en cristal objetivo. La tinción con peroxidasa de secciones de tejidos se realizó, usando el sistema de avidina-biotina. La Guía de la FDA *"Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use".*

Los estudios de reactividad cruzada de tejido con frecuencia se hacen en dos etapas, con la primera etapa incluyendo criosecciones de 32 tejidos (típicamente: Glándula suprarrenal, 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, Ovarios, Timo, Colon, Páncreas, Tiroides, Endotelio, Paratiroides, Uretra, Ojos, Pituitaria, Útero, Trompas de falopio y Placenta) de un donante humano. En la segunda fase un estudio de reactividad cruzada completo se realiza con hasta 38 tejidos (incluyendo glándula suprarrenal, sangre, vasos sanguíneos, médula ósea, cerebelo, cerebro, cerviz, esófago, ojos, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, nódulo linfático, glándula mamaria de mamas, ovarios, oviducto, páncreas, paratiroides, nervios periféricos, pituitaria, placenta,

próstata, glándula salivar, piel, intestino delgado, médula espinal, bazo, estómago, músculo estriado, testículos, timo, tiroides, amígdala, uretra, vejiga urinaria, y útero) de 3 adultos no relacionados. Los estudios se hacen típicamente en mínimamente dos niveles de dosis.

El anticuerpo terapéutico (es decir, artículo de prueba) y anticuerpo de control igualado a isotipo se pueden biotinilar para detección de complejo de avidina-biotina (ABC); otros métodos de detección pueden incluir detección de anticuerpo terciaria para un artículo de prueba etiquetado con FITC (u otra manera), o preacomplejamiento con una IgG anti-humana etiquetada para un artículo de prueba no etiquetado.

Brevemente, las criosecciones (aproximadamente de 5 µm) de tejidos humanos obtenidas en autopsia o biopsia se fijaron y secaron en cristal objetivo. La tinción con peroxidasa de secciones de tejido se realizó, usando el sistema de avidina-biotina. Primero (en caso de un sistema de detección de preacomplejamiento), el artículo de prueba se incuba con la IgG anti-humana biotinilada secundaria y se desarrolla en complejo inmune. El complejo inmune en las concentraciones finales de 2 y 10 µg/ml, del artículo de prueba se agrega en secciones de tejido en cristal objetivo y luego las secciones de tejido se hacen reaccionar por 30 minutos con un kit de avidina-biotina-peroxidasa. Subsecuentemente, DAB (3,3'-diaminobencidina), un sustrato para la reacción de peroxidasa, se aplica por 4 minutos para tinción de tejido. Se usan perlas de antígeno-sefarosa como secciones de tejido de control positivo.

Cualquier tinción específica se juzga que es ya sea una reactividad esperada (por ejemplo, consistente con expresión de antígeno) o no esperada con

base en la expresión conocida del antígeno objetivo en cuestión. Cualquier tinción juzgada específica se clasifica para intensidad y frecuencia. Los estudios de bloqueo o competición en suero o antígeno pueden ayudar adicionalmente a determinar si la tinción observada es específica o no específica.

Si se encuentra que dos anticuerpos seleccionados cumplen los criterios de selección – tinción de tejido apropiada, tinción igualada entre tejido específico de animal de toxicología y humano – se pueden seleccionar para la generación de DVD-Ig.

El estudio de reactividad cruzada de tejido tiene que repetirse con el constructo de DVD-Ig final, pero mientras estos estudios siguen el mismo protocolo como se resume en la presente, son más complejos de evaluar debido a que cualquier enlace puede llegar de cualquiera de los dos anticuerpos progenitores, y cualquier enlace no explicado necesita ser confirmado con estudios de competición de antígeno complejos.

Es fácilmente evidente que la realización complexa de estudios de reactividad cruzada de tejido con molécula multiespecífica como una DVD-Ig es grandemente simplificada si los dos anticuerpos parentales se seleccionan para (1) falta de hallazgos de reactividad cruzada de tejido inesperados y (2) para similitud apropiada de hallazgos de reactividad cruzada de tejido entre los tejidos de especie animal de toxicología y humana correspondientes.

B.12 Especificidad y Selectividad:

Para generar una molécula de DVD-Ig con especificidad y selectividad deseada, se necesita generar y seleccionar mAbs progenitores con el

perfil de especificidad y selectividad deseado de manera similar.

Los estudios de enlace para especificidad y selectividad con una DVD-Ig pueden ser complejos debido a los cuatro o más sitios de enlace, dos de cada uno para cada antígeno. Brevemente, los estudios de enlace que usan ELISA, BIAcore, KinExA u otros estudios de interacción con DVD-Ig necesitan monitorear el enlace de uno, dos o más antígenos a la molécula de DVD-Ig. Mientras que la tecnología BIAcore puede resolver el enlace independiente secuencial de múltiples antígenos, métodos más tradicionales que incluyen ELISA o técnicas más modernas como KinExA no pueden. Por lo tanto, la caracterización cuidadosa de cada anticuerpo progenitor es crítica. Después que cada anticuerpo individual se ha caracterizado para especificidad, la confirmación de retención de especificidad de los sitios de enlace individuales en la molécula de DVD-Ig es grandemente simplificada.

Es fácilmente evidente que la realización compleja para determinar la especificidad de una DVD-Ig es grandemente simplificada si los dos anticuerpos parentales se seleccionan para especificidad previo a ser combinados en una DVD-Ig.

Los estudios de interacción de antígeno-anticuerpo pueden tomar muchas formas, incluyendo muchos estudios de interacción de proteína-proteína clásicos, incluyendo ELISA (ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas), espectrometría de masas, reticulación química, SEC con dispersión de luz, diálisis en equilibrio, permeación de gel, ultrafiltración, cromatografía en gel, SEC analítica de zona grande, 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 de superficie (incluyendo BIAcore). Las referencias relevantes incluyen “Current Protocols in Protein Science”, Coligan et al. (eds.) Volume 3, chapters 19 and 20, publicado por John Wiley & Sons Inc., y las referencias incluidas en la presente y "Current Protocols in Immunology", Coligan et al. (eds.) publicado por John Wiley & Sons Inc y referencias relevantes incluidas en la presente.

Liberación en Citocina en Sangre Completa: La interacción de mAb con células sanguíneas humanas se puede investigar por un ensayo de liberación de citocina (Wing (1995) Therapeut. Immunol. 2(4):183-190; "Current Protocols in Pharmacology", et al. (eds.) publicado por John Wiley & Sons Inc; Madhusudan (2004) Clin. Canc. Res.10(19):6528-6534; Cox (2006) J. Methods 38(4):274-282; Choi (2001) Eur. J. Immunol. 31(1):94-106). Brevemente, varias concentraciones de mAb se incuban con sangre completa humana por 24 horas. La concentración analizada debe cubrir un amplio intervalo que incluye concentraciones finales que imitan los niveles de sangre típicos en pacientes (incluyendo pero no limitado a 100 ng/ml – 100 µg/ml). Después de la incubación, los sobrenadantes y lisados celulares se analizaron para la presencia de IL-1Rα, TNF-α, IL-1b, IL-6 e IL-8. Los perfiles de concentración de citocina generados para mAb se compararon con los perfiles producidos por un control de IgG humana negativo y un control de LPS o PHA positivo. El perfil de citocina exhibido por mAb tanto de sobrenadantes celulares como lisados celulares fue comparable con la IgG humana de control. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal no interactúa con las células sanguíneas humanas para liberar espontáneamente citocinas inflamatorias.

Los estudios de liberación de citocina para una DVD-Ig son complejos debido a los cuatro o más sitios de enlace, dos de cada uno para cada antígeno. Brevemente, los estudios de liberación de citocina como se describe en la presente miden el efecto de la molécula de DVD-Ig completa en sangre completa u otros sistemas celulares, pero pueden resolver cuál porción de la molécula causa la liberación de citocina. Una vez que la liberación de citocina se ha detectado, la pureza de la preparación de DVD-Ig tiene que ser averiguada, debido a que algunos componentes celulares de co-purificación pueden causar liberación de citocina por si solos. Si la pureza no es el tejido, la fragmentación de DVD-Ig (incluyendo, pero no limitado a, remoción de porción Fc, separación de sitios de enlace, etc.), las mutagénesis de sitio de enlace u otros métodos pueden necesitar ser empleados para deconvolucionar cualquiera de las observaciones. Es fácilmente evidente que esta realización compleja es grandemente simplificada si los dos anticuerpos parentales se seleccionan para la falta de liberación de citocina previo a ser combinados en una DVD-Ig.

B.13 Reactividad Cruzada a Otras Especies para Estudios Toxicológicos:

En una modalidad, los anticuerpos individuales que se seleccionan tienen suficiente reactividad cruzada a especies tox apropiadas, por ejemplo, mono cynomolgus. Los anticuerpos parentales necesitan enlazar objetivos de especies ortólogas (es decir, mono cynomolgus) y producir respuesta apropiada (modulación, neutralización, activación). En una modalidad, la reactividad cruzada (afinidad/potencia) a objetivos de especie ortóloga debe estar dentro de 10 veces el objetivo humano. En la práctica, los anticuerpos parentales son evaluados para

múltiples especies, incluyendo ratón, rata, perro, mono (y otros primates no humanos), así como también especies de modelo de enfermedad (es decir, oveja para modelo de asma). La reactividad cruzada aceptable a especies tox de los anticuerpos monoclonales parentales permite estudios de toxicología futuros de DVD-Ig-Ig en la misma especie. Por esta razón, los dos anticuerpos monoclonales parentales deben tener reactividad cruzada aceptable para una especie tox común, por lo tanto permitiendo estudios de toxicología de DVD-Ig en la misma especie.

Los mAbs progenitores se pueden seleccionar de varios mAbs que enlazan objetivos específicos y son bien conocidos en el arte. Estos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo anti-TNF (Patente de Estados Unidos No. 6,258,562), anticuerpo anti-IL-12 y/o anti-IL-12p40 (Patente de Estados Unidos No. 6,914,128); anticuerpo anti-IL-18 (Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 20050147610), anti-C5, anti-CBL, anti-CD147, anti-gp120, anti-VLA-4, anti-CD11a, anti-CD18, anti-VEGF, anti-CD40L, anti-CD-40 (por ejemplo, ver Publicación PCT No. 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-CD1I/18, anti-CD14, anti-ICAM-3, anti-RON, anti CD-19, anti-CD80 (por ejemplo, ver Publicación PCT No. WO2003039486, anti-CD4, anti-CD3, anti-CD23, anti-beta2-integrina, anti-alfa4beta7, anti-CD52, anti-HLA DR, anti-CD22 (por ejemplo, ver Patente de Estados Unidos No. 5,789,554), anti-CD20, anti-MIF, anti-CD64 (FcR), anti-TCR alfa beta, anti-CD2, anti-Hep B, anti-CA 125, anti-EpCAM, anti-gp120, anti-CMV, anti-gpIIbIIIa, anti-IgE, anti-CD25, anti-CD33, anti-HLA, anti-IGF1,2, anti IGFR, anti-VNRintegrina, anti-IL-1alfa, anti-IL-1beta, receptor de anti-IL-1, receptor de anti-IL-

2, anti-IL-4, receptor de anti-IL-4, anti-IL5, receptor de anti-IL-5, anti-IL-6, anti-IL-6R, RANKL, NGF, DKK, alfaVbeta3, IL-17A, anti-IL-8, anti-IL-9, anti-IL-13, receptor de anti-IL-13, anti-IL-17, y anti-IL-23; IL-23p19; (ver Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731-6 y http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/antibodies.html)

Los mAbs progenitores también se pueden seleccionar de varios anticuerpos terapéuticos aprobados para uso, en ensayos clínicos, o en desarrollo para uso clínico. Tales anticuerpos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, rituximab (Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche) (ver por ejemplo Patente de Estados Unidos No. 5,736,l37), un anticuerpo anti-CD20 quimérico aprobado para tratar linfoma no de Hodgkin; HuMax-CD20, un anti-CD20 actualmente siendo desarrollado por Genmab, un anticuerpo anti-CD20 descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5,500,362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel), y PRO70769 (Solicitud PCT No. PCT/US2003/040426), trastuzumab (Herceptin®, Genentech) (ver por ejemplo Patente de Estados Unidos No. 5,677,171), un anticuerpo anti-Her2/neu humanizado aprobado para tratar cáncer de mama; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg®), actualmente siendo desarrollado por Genentech; un anticuerpo anti-Her2 descrito en la Patente de Estados Unidos No. 4,753,894; cetuximab (Erbitux®, Imclone) (Patente de Estados Unidos No. 4,943,533; Publicación PCT No. WO 96/40210), un anticuerpo anti-EGFR quimérico en ensayos clínicos para una variedad de cánceres; ABX-EGF (Patente de Estados Unidos No. 6,235,883), actualmente siendo desarrollado por Abgenix-Immunex-Amgen; HuMax-EGFr (Patente de Estados Unidos No. 7,247,301), actualmente siendo

desarrollado por Genmab; 425, EMD55900, EMD62000, y EMD72000 (Merck KGaA) (Patente de Estados Unidos 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) (Publicación PCT No. WO 95/20045; Modjtahedi et al. (1993) J. Cell Biophys. 22(1-3):129-46; Modjtahedi et al. (1993) Br. J. Cancer 67(2):247-53; Modjtahedi et al. (1996) Br. J. Cancer 73(2):228-35; Modjtahedi et al. (2003) Int. J. Cancer 105(2):273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canada y Centro de Immunologia Molecular, Cuba (Patente de Estados Unidos No. 5,891,996; Patente de Estados Unidos No. 6,506, 883; Mateo et al. (1997) Immunotechnol. 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) (Publicación PCT No. WO 0162931); 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 ozogamicina (Mylotarg®), un anticuerpo anti-CD33 (proteína p67) desarrollado por Celltech/Wyeth, alefacept (Amevive®), una fusión de Fc anti- LFA-3 desarrollada por Biogen), abciximab (ReoPro®), desarrollado por Centocor/Lilly, basiliximab (Simulect®), desarrollado por Novartis, palivizumab (Synagis®), desarrollado por Medimmune, infliximab (Remicade®), un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Centocor, adalimumab

(Humira®), un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Abbott, Humicade®, un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Celltech, golimumab (CNTO-148), un anticuerpo TNF completamente humano desarrollado por Centocor, etanercept (Enbrel®), una fusión de Fc de receptor de p75 TNF desarrollada por Immunex/Amgen, lenercept, una fusión de Fc de receptor de p55TNF previamente desarrollada por Roche, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD147 siendo desarrollado por Abgenix, ABX-IL8, un anticuerpo anti-IL8 siendo desarrollado por Abgenix, ABX-MA1, un anticuerpo anti-MUC18 siendo desarrollado por Abgenix, Pemtumomab (R1549, 90Y-muHMFG1), un anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, Therex (R1550), un anticuerpo anti-MUC1 siendo desarrollado por Antisoma, AngioMab (AS1405), siendo desarrollado por Antisoma, HuBC-1, siendo desarrollado por Antisoma, Thioplatin (AS1407) siendo desarrollado por Antisoma, Antegren® (natalizumab), un anticuerpo anti-alfa-4-beta-1 (VLA-4) y alfa-4-beta-7 siendo desarrollado por Biogen, mAb VLA-1, un anticuerpo anti-VLA-1 integrina siendo desarrollado por Biogen, mAb LTBR, un anticuerpo de receptor de anti-linfotoxina beta (LTBR) siendo desarrollado por Biogen, CAT-152, un anticuerpo anti-TGF-β2 siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology, ABT 874 (J695), un anticuerpo anti-IL-12p40 siendo desarrollado por Abbott, CAT-192, un anticuerpo anti-TGFβ1 siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxinal siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B® un anticuerpo anti-Blys siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology and Human Genome Sciences Inc., TRAIL-R1mAb, un anticuerpo anti-TRAIL-R1 siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology and Human Genome Sciences, Inc., Avastin®

bevacizumab, rhuMAb-VEGF), un anticuerpo anti-VEGF siendo desarrollado por Genentech, un anticuerpo de la familia de receptor anti-HER siendo desarrollado por Genentech, Factor de Anti-Tejido (ATF), un anticuerpo de factor anti-tejido siendo desarrollado por Genentech, Xolair® (Omalizumab), un anticuerpo anti-IgE siendo desarrollado por Genentech, Raptiva® (Efalizumab), un anticuerpo anti-CD11a siendo desarrollado por Genentech y Xoma, Anticuerpo MLN-02 (antes LDP-02), siendo desarrollado por Genentech y Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, un anticuerpo anti-CD4 siendo desarrollado por Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 siendo desarrollado por Genmab y Amgen, HuMax-Inflam, siendo desarrollado por Genmab y Medarex, HuMax-Cáncer, un anticuerpo anti-Heparanasa I siendo desarrollado por Genmab y Medarex y Oxford GcoSciences, HuMax-Linfoma, siendo desarrollado por Genmab y Amgen, HuMax-TAC, siendo desarrollado por Genmab, IDEC-13I, y anticuerpo anti-CD40L siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (Clenoliximab), un anticuerpo anti-CD4 siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, un anticuerpo anti-CD80 siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, un anti-CD23 siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos de factor de migración anti-macrófagos (MIF) siendo desarrollados por IDEC Pharmaceuticals, BEC2, un anticuerpo anti-idiotípico siendo desarrollado por Imclone, IMC-1C11, un anticuerpo anti-KDR siendo desarrollado por Imclone, DC101, un anticuerpo anti-flk-1 siendo desarrollado por Imclone, anticuerpos anti-VE caderina siendo desarrollados por Imclone, CEA-Cide® (labetuzumab), un anticuerpo de antígeno anti-carcinoembriónico (CEA) siendo desarrollado por Immunomedics, LymphoCide® (Epratuzumab), un anticuerpo anti-CD22 siendo desarrollado por

Immunomedics, AFP-Cide, siendo desarrollado por Immunomedics, MyelomaCide, siendo desarrollado por Immunomedics, LkoCide, siendo desarrollado por Immunomedics, ProstaCide, siendo desarrollado por Immunomedics, MDX-010, un anticuerpo anti-CTLA4 siendo desarrollado por Medarex, MDX-060, un anticuerpo anti-CD30 siendo desarrollado por Medarex, MDX-070 siendo desarrollado por Medarex, MDX-018 siendo desarrollado por Medarex, Osidem® (IDM-1), un anticuerpo anti-Her2 siendo desarrollado por Medarex e Immuno-Designed Molecules, HuMax®-CD4, un anticuerpo anti-CD4 siendo desarrollado por Medarex y Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 siendo desarrollado por Medarex y Genmab, CNTO 148, un anticuerpo anti-TNFα siendo desarrollado por Medarex y Centocor/J&J, CNTO 1275, un anticuerpo anti-citocina siendo desarrollado por Centocor/J&J, MOR101 y MOR102, anticuerpos de molécula-1 de adhesión anti-intercelular (ICAM-1) (CD54) siendo desarrollados por MorphoSys, MOR201, un anticuerpo de receptor de factor 3 de crecimiento anti-fibroblasto (FGFR-3) siendo desarrollado por MorphoSys, Nuvion® (visilizumab), un anticuerpo anti-CD3 siendo desarrollado por Protein Design Labs, HuZAF®, un anticuerpo de interferón anti-gamma siendo desarrollado por Protein Design Labs, Anti-α 5β1 Integrina siendo desarrollada por Protein Design Labs, anti-IL-12, siendo desarrollado por Protein Design Labs, ING-1, un anticuerpo anti-Ep-CAM siendo desarrollado por Xoma, Xolair® (Omalizumab) un anticuerpo anti-IgE humanizado desarrollado por Genentech y Novartis, y MLN01, un anticuerpo anti-Beta2 integrina siendo desarrollado por Xoma. En otra modalidad, los terapéuticos incluyen KRN330 (Kirin); anticuerpo huA33 (A33, Ludwig Institute for Cancer Research); CNTO 95 (alfa V integrinas, Centocor); MEDI-522 (alfa Vβ3 integrina, Medimmune);

volociximab (alfa Vβ1 integrina, Biogen/PDL); mAb humano 216 (epítope glicosilado de células B, NCI); BiTE MT103 (CD19 x CD3 biespecíficos, Medimmune); 4G7xH22 (Células B BiespecíficasxFcgammaR1, Medarex/Merck KGa); rM28 (CD28 x MAPG biespecíficos, Patente EP No. EP1444268); MDX447 (EMD 82633) (CD64 x EGFR biespecíficos, Medarex); Catumaxomab (removab) (EpCAM x anti-CD3 biespecíficos, Trion/Fres); Ertumaxomab (HER2/CD3 biespecífico, 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 de CD137, Brystol Myers Squibb); MDX-1342 (CD19, Medarex); Siplizumab (MEDI-507) (CD2, Medimmune); Ofatumumab (Humax-CD20) (CD20, Genmab); Rituximab (Rituxan) (CD20, Genentech); veltuzumab (hA20) (CD20, Immunomedics); Epratuzumab (CD22, Amgen); lumiliximab (IDEC 152) (CD23, Biogen); muromonab-CD3 (CD3, Ortho); HuM291 (receptor Fc de CD3, PDL Biopharma); HeFi-1, CD30, NCI); MDX-060 (CD30, Medarex); MDX-1401 (CD30, Medarex); SGN-30 (CD30, Seattle Genentics); SGN-33 (Lintuzumab) (CD33, Seattle Genentics); Zanolimumab (HuMax-CD4) (CD4, Genmab); HCD122 (CD40, Novartis); SGN-40 (CD40, Seattle Genentics); Campathlh (Alemtuzumab) (CD52, Genzyme); MDX-1411 (CD70, Medarex); hLL1 (EPB-1) (CD74.38, Immunomedics); Galiximab (IDEC-144) (CD80, Biogen); MT293 (TRC093/D93) (colágeno escindido, Tracon); HuLuc63 (CS1, PDL Pharma); ipilimumab (MDX-010) (CTLA4, Brystol Myers Squibb); Tremelimumab (Ticilimumab, CP-675,2) (CTLA4, Pfizer); HGS-ETR1 (Mapatumumab) (agonista de 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 de 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 (MT20l) (Epcam, Merck); edrecolomab (Panorex, 17-1A) (Epcam, Glaxo/Centocor); MORAb-003 (receptor a de folato, Morphotech); KW-2871 (ganglιósido GD3, Kyowa); MORAb-009 (GP-9, Morphotech); CDX-1307 (MDX-1307) (hCGb, Celldex); Trastuzumab (Herceptina) (HER2, Celldex); Pertuzumab (rhuMAb 2C4) (HER2 (Dl), Genentech); apolizumab (cadena beta de HLA-DR, PDL Pharma); AMG-479 (IGF-1R, Amgen); anti-IGF-1R R1507 (IGF1-R, Roche); CP 751871 (IGF1-R, Pfizer); IMC-A12 (IGF1-R, Imclone); BIIB022 (IGF-1R, Biogen); Mik-beta-1 (IL-2Rb (CD122), Hoffman LaRoche); CNTO 328 (IL6, Centocor); Anti-KIR (1-7F9) (Receptor tipo lg de célula asesina (KIR), Novo); Hu3S193 (Lewis (y), Wyeth, Ludwig Institute of Cancer Research); hCBE-11 (LTBR, Biogen); HuHMFG1 (MUC1, Antisoma/NCI); RAV12 (epítope de carbohidrato N-enlazado, 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, Comell Research Foundation); muJ59l (PSMA, Comell Research Foundation); GC1008 (inhibidor de TGFb (pan) (lgG4), Genzyme); Infliximab (Remicade) (TNFa, Centocor); A27.15 (receptor de transferrina, Salk Institute, INSERN WO 2005/111082); E2.3 (recceptor de transferrina, Salk Institute); Bevacizumab (Avastin) (VEGF, Genentech); HuMV833 (VEGF, Tsukuba Research Lab)

Publicación PCT No. WO/2000/034337, University of Texas); IMC-18F1 (VEGFR1, Imclone); IMC-1121 (VEGFR2, Imclone).

B. Construcción de moléculas de DVD

La molécula de inmunoglobulina de dominio variable (DVD-Ig) se diseña de modo que dos diferentes dominios variables de cadena ligera (VL) de los dos diferentes anticuerpos monoclonales progenitores se enlazan en tándem directamente o vía un enlazante corto por técnicas de ADN recombinante, seguido por el dominio constante de cadena ligera y, opcionalmente, una región Fc. De manera similar, la cadena pesada comprende dos diferentes dominios variables de cadena pesada (VH) enlazados en tándem, seguido por el dominio constante CH1 y región Fc (Figura 1A).

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

En una modalidad, los primero y segundo dominios variables se enlazan directamente entre sí usando técnicas de ADN recombinantes. En otra modalidad, los dominios variables se enlazan vía una secuencia enlazante. En una modalidad, dos dominios variables se enlazan. Tres o más dominios variables también se pueden enlazar directamente o vía una secuencia enlazante. Los

dominios variables pueden enlazar el mismo antígeno o pueden enlazar diferentes antígenos. Las moléculas de DVD de la invención pueden incluir un dominio variable de inmunoglobulina y un dominio variable no de inmunoglobulina tal como el dominio de enlace de ligando de un receptor, dominio activo de una enzima. Las moléculas de DVD también pueden comprender 2 o más dominios no de Ig.

La secuencia enlazante puede ser una secuencia de aminoácido o polipéptido único. En una modalidad, las secuencias enlazantes se seleccionan del grupo que consiste de AKTTPKLEEGEFSEAR (SEC ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEC ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEC ID NO: 4); SAKTTP (SEC ID NO: 5); RADAAP (SEC ID NO: 6); RADAAPTVS (SEC ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEC ID NO: 8); RADAAAA$(G_4S)_4$ (SEC ID NO: 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEC ID NO: 10); ADAAP (SEC ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEC ID NO: 12); TVAAP (SEC ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEC ID NO: 14); QPKAAP (SEC ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEC ID NO: 16); AKTTPP (SEC ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEC ID NO: 18); AKTTAP (SEC ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEC ID NO: 20); ASTKGP (SEC ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEC ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID NO: 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEC ID NO: 26), TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEC ID NO: 27); y ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEC ID NO: 28). La elección de secuencias enlazantes se basa en el análisis de estructura de cristal de diversas moléculas de Fab. Existe un enlace flexible natural entre el dominio

variable y el dominio constante de CH1/CL en la estructura molecular de anticuerpo o Fab. Este enlace natural comprende aproximadamente 10-12 residuos aminoácido, contribuido por 4-6 residuos del C-término de dominio V y 4-6 residuos del N-término de dominio CL/CH1. Las DVD Ig de la invención se generaron usando 5-6 residuos aminoácidos N-terminales, o 11-12 residuos aminoácido, de CL o CH1 como enlazante en la cadena ligera y cadena pesada de DVD-Ig, respectivamente. Los residuos N-terminales de dominios Cl o CH1, particularmente los primeros 5-6 residuos aminoácido, adoptan una conformación de bucle sin estructuras secundarias fuertes, por lo tanto actúan como enlazantes flexibles entre los dos dominios variables. Los residuos N-terminales de dominios CL o CH1 son extensión natural de los dominios variables, ya que son parte de las secuencias de Ig, por lo tanto minimizan a un gran grado cualquier inmunogenicidad que surge potencialmente de los enlazantes y uniones.

Otras secuencias enlazantes pueden incluir cualquier secuencia de cualquier longitud de dominio CL/CH1 pero no todos los residuos de dominio CL/CH1; por ejemplo los primeros 5-12 residuos aminoácido de los dominios CL/CH1; los enlazantes de cadena ligera pueden ser de Cκ o Cλ; y los enlazantes de cadena pesada se pueden derivar de CH1 de cualquiera de los isotipos, incluyendo Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cα1, Cα2, Cδ, Cε y Cμ. Las secuencias enlazantes también se pueden derivar de otras proteínas tales como proteínas tipo Ig (por ejemplo, TCR, FcR, KIR); secuencias basadas en G/S (por ejemplo, SEC ID NO: 29 con repeticiones de G4S); secuencias derivadas de región bisagra; y otras secuencias naturales de otras proteínas.

En una modalidad, un dominio constante se enlaza a los dos

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

En otra modalidad, dos polipéptidos de DVD de cadena pesada y dos polipéptidos de DVD de cadena ligera se combinan para formar una molécula de DVD-Ig. La Tabla 2 lista secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de anticuerpos ejemplares para objetivos útiles para tratar enfermedad, por ejemplo, para tratar cáncer. En una modalidad, la invención proporciona una DVD que comprende al menos dos de las regiones de VH y/o VL listadas en la Tabla 2, en cualquier orientación.

Tabla 2: Lista de Secuencias de Aminoácidos de regiones de VH y VL de Anticuerpos para Generar DVD-Igs

SEC ID NO	ID Único	Región de Proteína	Secuencia 12345678901234567890123456789012345678901234567890
30	H26.13VH	VH IL-β (aa. 1)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGGVTKGYFDVWGQGTPVTVSS
31	H26.13VL	VL IL-β (aa. 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTKLQITR

SEC ID NO	ID Único	Región de Proteína	Secuencia 12345678901234567890123456789012345678901234567890
32	E26.35VH	VH IL-β (sec. 2)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCARGGVYKGYFDVWGQGTPVTVSS
33	E26.35VL	VL IL-β (sec 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTKLQITR
34	1B12.1VH	VH IL-β (sec 3)	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRLTISKDNSKSQVSL KLSSVTAADTAVYYCAKQRTLWGYDLYGMDYWGQGTLVTV SS
35	1B12.1VL	VL IL-β (sec 3)	DTQVTQSPSSLSASVGDRVTITCITSTDIDVDMNWYQQKP GKPPKLLISQGNTLRPGVPSRFSSSGSGTDFTFTISSLQP EDFATYYCLQSDNLPLTFGQGTKLEIKR
36	1B12.3VH	VH IL-β (sec 4)	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRLTISKDNSKSQVSL KLSSVTAADTAVYYCAKQRTLWGYDLYGMDYWGQGTLVTV SS
37	1B12.3VL	VL IL-β (sec 4)	DTVVTQSPAFLSVTPGEKVTITCITSTDIDVDMNWYQQKP DQPPKLLISQGNTLRPGVPSRFSSSGSGTDFTFTISSLEA EDAATYYCLQSDNLPLTFGQGTKLEIKR
38	1B12.6VH	VH IL-β (sec 5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLSDYGVSWIRQA PGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRLTISKDNSKSTVYL QMNSLRAEDTAVYYCAKQRTLWGYDLYGMDYWGQGTLVTV SS
39	1B12.6VL	VL IL-β (sec 5)	ETTVTQSPSSLSASVGDRVTITCITSTDIDVDMNWYQQKP GKPPKLLISQGNTLRPGVPSRFSSSGSGTDFTFTISSLQP EDFATYYCLQSDNLPLTFGQGTKLEIKR
40	3D12 10/15VH	VH IL-α (sec 3)	EVQLVQSGAEVKKPGVSVKVSCKASGYTFTTYGMHWVRQA PGQGLEWMGWINTYTGESTYADDFQGRVTFTLDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMNYWGQGTTVTV SS
41	3D12 10/15VL	VL IL-α (sec 3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNMLNWYQQKP GKTPKLLIYYTSRLYPGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYFCQQGKTLPYAFGQGTKLEIKR
42	3D12.16VH	VH IL-α (sec. 2)	EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQA PGQDLERMAWINTYTGESTYADDFKGRFTFTLDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMDYWGQGTTVTV SS
43	3D12.16VL	VL IL-α (sec. 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNCLNWYQQKP GKTPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYFCQQGKTLPYAFGQGTKLEIKR
44	3D12.8VH	VH IL-α (sec. 1)	EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQA PGQDLERMAWINTYTGESTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAY LQISSLKAEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMDYWGQGTTVTV SS
45	3D12.8VL	VL IL-α (sec. 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNCLNWYQQKP GKTPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYFCQQGKTLPYAFGQGTKLEIKR
46	3D12r16VH	VH IL-α (sec 4)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFKYYGMNWVRQA PGQGLERMGWINTYTGQSTYADDFKGRVTFTLDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARDIYYYGSDFAMDYWGQGTTVTV SS
47	3D12r16VL	VL IL-α (sec 4)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNMLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRLKPGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYFCQQGKTAPYTFGQGTKLEIKR

La descripción detallada de moléculas de DVD-Ig específicas que enlazan objetivos específicos, y métodos para producir las mismas, se proporciona en la sección de Ejemplos a continuación.

C. Producción de proteínas de DVD

Las proteínas de enlace de la presente invención se pueden producir por cualquier número de técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, la expresión de células huéspedes en donde los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada de DVD y ligera de DVD son transfectados en una célula huésped por técnicas estándares. Las diversas formas del término “transfección” se proponen para abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación por fosfato de calcio, transfección de DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar las proteínas de DVD de la invención en células huéspedes ya sea procariotas o eucariotas, las proteínas de DVD se expresan en células eucariotas, por ejemplo, células huéspedes de mamífero, debido a que tales células eucariotas (y en particular células de mamífero) son más probables que las células procariotas para que se asemejen y secreten una proteína de DVD apropiadamente plegada e inmunológicamente activa.

Las células huéspedes de mamífero ejemplares para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen Ovarios de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador

seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS, células SP2 y PER.C6. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican proteínas de DVD se introducen en células huéspedes de mamífero, las proteínas de DVD se producen cultivando las células huéspedes por un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de las proteínas de DVD en las células huéspedes o secreción de las proteínas de DVD en el medio de cultivo en el cual las células huéspedes crecen. Las proteínas de DVD se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteína estándares.

En un sistema ejemplar para la expresión recombinante de proteínas de DVD de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada de DVD como la cadena ligera de DVD se introduce en las células dhfr-CHO por transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera de DVD son cada uno operativamente enlazados a elementos regulatorios de mejorador de CMV/promotor de AdMLP para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen de DHFR, el cual permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando amplificación/selección de metotrexato. Las células huéspedes de transformante seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera de DVD y la proteína de DVD intacta se recupera del medio de cultivo. Las técnicas de biología molecular estándares se usan para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huéspedes, seleccionar transformantes, cultivar las células huéspedes y recuperar la proteína de DVD del

medio de cultivo. Aún adicionalmente, la invención proporciona un método para sintetizar una proteína de DVD de la invención cultivando una célula huésped de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que una proteína de DVD de la invención se sintetiza. El método puede comprender adicionalmente aislar la proteína de DVD del medio de cultivo.

Una característica importante de la DVD-Ig es que se puede producir y purificar en una manera similar como un anticuerpo convencional. La producción de DVD-Ig resulta en un producto principal único homogéneo con actividad específica dual deseada, sin alguna modificación de secuencia de la región constante o modificaciones químicas de cualquier clase. Otros métodos previamente descritos para generar proteínas de enlace de longitud completa "bi-específicas", "multi-específicas", y "multivalentes multi-específicas" no conducen a un producto primario único sino en su lugar conducen a la producción intracelular o secretada de una mezcla de proteínas de enlace de longitud completa, multivalentes, multi-específicas, mono-específicas, inactivas, ensambladas, y proteínas de enlace de longitud completa multivalentes con combinación de diferentes sitios de enlace. Como un ejemplo, con base en el diseño descrito por la Publicación PCT WO2001/077342, hay 16 posibles combinaciones de cadenas pesada y ligera. En consecuencia, solamente 6.25% de proteína es probable que esté en la forma activa deseada, y no como un producto principal único o producto primario único en comparación con las otras 15 posibles combinaciones. La separación de las formas completamente activas deseadas de la proteína de las formas inactivas y parcialmente activas de la proteína usando técnicas de cromatografía estándares, típicamente usadas en la manufactura a gran escala,

todavía será demostrada.

Sorprendentemente el diseño de las “proteínas de enlace de longitud completa multivalentes específicas duales” de la presente invención conduce a una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual que se asemejan principalmente a las “proteínas de enlace de longitud completa multivalentes específicas duales” deseadas.

Al menos 50%, al menos 75% y al menos 90% de las moléculas de inmunoglobulina de dominio variable dual ensambladas y expresadas son la proteína tetravalente específica dual deseada. Este aspecto de la invención particularmente mejora la utilidad comercial de la invención. Por lo tanto, la presente invención incluye un método para expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una célula única que conduce a un producto primario único de una “proteína de enlace de longitud completa tetravalente específica dual”.

La presente invención proporciona métodos para expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una célula única que conduce a un “producto primario” de una “proteína de enlace de longitud completa tratavalente específica dual”, donde el “producto primario” es más de 50% de toda la proteína ensamblada, que comprende una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual.

La presente invención proporciona métodos para expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una célula única que conduce a un “producto primario” único de una

"proteína de enlace de longitud completa tetravalente específica dual" donde el "producto primario" es más de 75% de toda la proteína ensamblada, que comprende una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual.

La presente invención proporciona métodos para expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una célula única que conduce a un "producto primario" único de una "proteína de enlace de longitud completa tetravalente específica dual", donde el "producto primario" es más de 90% de toda la proteína ensamblada, que comprende una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual.

II. Proteínas de Enlace de DVD Derivadas

Una modalidad proporciona una proteína de enlace etiquetada en donde la proteína de enlace de la invención se deriva o enlaza a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de enlace etiquetada de la invención se puede derivar enlazando funcionalmente una proteína de enlace de la invención (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tal como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación de la proteína de enlace con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o una marca de polihistidina).

Los agentes detectables útiles con los cuales una proteína de enlace

de la invención se puede derivar incluyen compuestos fluorescentes. Los agentes detectables fluorescentes ejemplares incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1- naftalensulfonilo, picoeritrina y similares. Una proteína de enlace también se puede derivar con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando una proteína de enlace se deriva con una enzima detectable, se detecta agregando reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producción de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producción de reacción coloreados, el cual es detectable. Una proteína de enlace también se puede derivar con biotina, y detectar a través de la medición indirecta de enlace de avidina o estreptavidina.

Otra modalidad de la invención proporciona una proteína de enlace cristalizada y formulaciones y composiciones que comprenden tales cristales. En una modalidad, la proteína de enlace cristalizada tiene una vida media mayor in vivo que la contraparte soluble de la proteína de enlace. En otra modalidad, la proteína de enlace retiene la actividad biológica después de la cristalización.

La proteína de enlace cristalizada de la invención se puede producir de acuerdo con los métodos conocidos en el arte y como se describe en la Publicación PCT No. WO 02072636.

Otra modalidad de la invención proporciona una proteína de enlace glicosilada en donde el anticuerpo o porción de enlace de antígeno del mismo comprende uno o más residuos carbohidrato. La producción de proteína *in vivo* naciente puede sufrir procesamiento adicional, los residuos de azúcar (glicosilo) se

pueden agregar enzimáticamente, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que portan cadenas laterales de oligosacárido covalentemente enlazadas son conocidas como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más residuos carbohidrato en el dominio de Fc, así como también el dominio variable. Los residuos carbohidrato en el dominio de Fc tienen un efecto importante en la función efectora del dominio de Fc, con mínimo efecto en el enlace de antígeno o vida media del anticuerpo (Jefferis (2005) Biotechnol. Prog. 21:11-16). En contraste, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto en la actividad de enlace de antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo en la afinidad de enlace de anticuerpo, probablemente debido a la obstrucción estérica (Co et al. (1993) Mol. Immunol. 30:1361-1367), o resulta en afinidad incrementada para el antígeno (Wallick et al. (1988) Exp. Med. 168:1099-1109; Wright et al. (1991) EMBO J. 10:2717-2723).

Un aspecto de la presente invención se dirige a la generación de mutantes de sitio de glicosilación en los cuales el sitio de glicosilación O- y N-enlazado de la proteína de enlace se ha mutado. Un experto en el arte puede generar tales mutantes usando tecnologías bien conocidas estándares. Los mutantes de sitio de glicosilación que retienen la actividad biológica pero tienen actividad de enlace incrementada o disminuida son otro objeto de la presente invención.

En aún otra modalidad, la glicosilación del anticuerpo o porción de enlace de antígeno de la invención se modifica. Por ejemplo, un anticuerpo aglicosilado se puede producir (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La

glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para incrementar la afinidad del anticuerpo para antígeno. Tales modificaciones de carbohidrato se pueden realizar, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácido que resultan en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de región variable para eliminar la afinidad del anticuerpo para antígeno. Tal procedimiento se describe con detalle adicional en la Publicación PCT No. WO2003016466 y Patentes de Estados Unidos Nos. 5,714,350 y 6,350,861.

Adicionalmente o alternativamente, se puede producir una proteína de enlace modificada de la invención que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tienen cantidades reducidas de residuos fucosilo (ver Kanda et al. (2007) J. Biotechnol. 130(3):300-310) o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNAc de bisección incrementadas. Tales patrones de glicosilación alterada se ha demostrado que incrementan la capacidad de ADCC de anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidrato se pueden realizar, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con maquinaría de glicosilación alterada. Las células con maquinaría de glicosilación alterada se han descrito en el arte y se pueden usar como células huéspedes en las cuales se expresan anticuerpos recombinantes de la invención para producir un anticuerpo con glicosilación alterada. Ver, por ejemplo, Shields et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, así como también, Patente Europea No. EP 1,176,195; y Publicaciones PCT Nos WO 03/035835 y WO 99/5434280.

La glicosilación de proteína depende de la secuencia de aminoácido

de la proteína de interés, así como también la célula huésped en la cual la proteína se expresa. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas), y tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótido) disponibles. Debido a tales factores, el patrón de glicosilación de proteína, y composición de residuos glicosilo, puede diferir dependiendo del sistema huésped en el cual se expresa la proteína particular. Los residuos glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no se limitan a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. En una modalidad, la proteína de enlace glicosilada comprende residuos glicosilo de modo que el patrón de glicosilación es humano.

Se conoce por aquellos expertos en el arte que la glicosilación de proteína diferente puede resultar en características de proteína diferentes. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo huésped, tal como levadura, y glicosilada utilizando la trayectoria endógena de levadura se puede reducir en comparación con aquella de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Tales glicoproteínas también pueden ser inmunogénicas en humanos y muestran vida media reducida *in vivo* después de la administración. Los receptores específicos en humanos y otros animales pueden reconocer residuos glicosilo y promover la rápida depuración de la proteína de la corriente sanguínea. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento de la proteína, solubilidad, susceptibilidad a proteasas, tráfico, transporte, compartimentalización, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad, o alergenicidad. Por consiguiente, un médico puede elegir una proteína terapéutica con una

composición y patrón de glicosilación específicos, por ejemplo patrón y composición de glicosilación idénticos, o al menos similares, con los producidos en células humanas o en las células de especie específica del animal objeto propuesto.

La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de aquellas de una célula huésped se puede lograr modificando genéticamente la célula huésped para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Usando técnicas conocidas en el arte, un médico puede generar anticuerpos o porciones de enlace de antígeno de los mismos, que exhiben glicosilación de proteína humana. Por ejemplo, cepas de levadura se han modificado genéticamente para expresar enzimas de glicosilación que no se presentan naturalmente de modo que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura exhiben glicosilación de proteína idéntica a aquella de células de animales, especialmente células humanas (Patentes de Estados Unidos Nos. 7,449,308 y 7,029,872 y Publicación PCT No. WO2005/100584).

Además de las proteínas de enlace, la presente invención también se dirige a anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) específicos para tales proteínas de enlace de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo, el cual reconoce determinantes únicos generalmente asociados con la región de enlace de antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id se puede preparar inmunizando un animal con la proteína de enlace o una región que contiene CDR de la misma. El animal inmunizado reconocerá, y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante y producirá un anticuerpo anti-Id. Es fácilmente evidente que puede ser más fácil generar anticuerpos anti-idiotípicos para dos o más

anticuerpos progenitores incorporados en una molécula de DVD-Ig; y confirmar estudios de enlace por métodos bien reconocidos en el arte (por ejemplo, BIAcore, ELISA) para verificar que los anticuerpos anti-idiotípicos específicos para el idiotipo de cada anticuerpo progenitor también reconocen el idiotipo (por ejemplo, sitio de enlace de antígeno) en el contexto de la DVD-Ig. Los anticuerpos anti-idiotípicos específicos para cada uno de los dos o más sitios de enlace de antígeno de una DVD-Ig proporcionan reactivos ideales para medir las concentraciones de DVD-Ig de una DVD-Ig humana en suero de paciente; los ensayos de concentración de DVD-Ig se pueden establecer usando un "formato de ELISA de ensayo de intercalación" con un anticuerpo para una primera región de enlace de antígeno revestida en la fase sólida (por ejemplo, microplaqueta de BIAcore, placa de ELISA, etc.), enjuagada con amortiguador de enlace, incubada con la muestra de suero, enjuagada de nuevo y finalmente incubada con otro anticuerpo anti-idiotípico para el otro sitio de enlace de antígeno, por si sola etiquetada con una enzima para la cuantificación de la reacción de enlace. En una modalidad, para una DVD-Ig con más de dos diferentes sitios de enlace, los anticuerpos anti-iditípicos a los dos sitios de enlace más externos (más distal y proximal de la región constante) no solamente ayudarán en la determinación de la concentración de DVD-Ig en suero humano sino también documentarán la integridad de la molécula *in vivo*. Cada anticuerpo anti-Id también se puede usar como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en todavía otro animal, produciendo un anticuerpo anti-anti-Id así llamado.

Además, se apreciará por un experto en el arte que una proteína de interés se puede expresar usando una biblioteca de células huéspedes

genéticamente modificadas para expresar varias enzimas de glicosilación, de modo que las células huéspedes miembro de la biblioteca producen la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Un médico luego puede seleccionar y aislar la proteína de interés con nuevos patrones de glicosilación particulares. En una modalidad, la proteína que tiene un nuevo patrón de glicosilación particularmente seleccionado exhibe propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

III. Uso de DVD-Ig

Dada su actividad para enlazar dos o más antígenos, las proteínas de enlace de la invención se pueden usar para detectar los antígenos (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejido. La DVD-Ig se etiqueta directamente o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o picoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y

los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, o ^{153}Sm.

En una modalidad, las proteínas de enlace de la invención neutralizan la actividad de los antígenos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, tales DVD-Igs se pueden usar para inhibir la actividad de antígeno, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene los antígenos, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen los antígenos con los cuales una proteína de enlace de la invención reacciona cruzado. En otra modalidad, la invención proporciona un método para reducir la actividad de antígeno en un sujeto que sufre de una enfermedad o trastorno en el cual la actividad de antígeno es perjudicial. Una proteína de enlace de la invención se puede administrar a un sujeto humano para propósitos terapéuticos.

El término “un trastorno en el cual la actividad de antígeno es perjudicial” incluye enfermedades y otros trastornos en los cuales la presencia del antígeno en un sujeto que sufre del trastorno se ha mostrado que es o se sospecha que es ya sea responsable de la patofisiología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Por consiguiente, un trastorno en el cual la actividad de antígeno es perjudicial es un trastorno en el cual la reducción de actividad de antígeno se espera que alivie los síntomas y/o progresión del trastorno. Tales trastornos se pueden evidenciar, por ejemplo, por un incremento en la concentración del antígeno en un fluido biológico de un sujeto que sufre del trastorno (por ejemplo, un incremento en la concentración de antígeno en suero, plasma, fluido sinovial, etc. del sujeto). Los ejemplos no limitantes de trastornos que se pueden tratar con las proteínas de enlace de la

invención incluyen aquellos trastornos discutidos a continuación y en la sección que pertenece a composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

Las DVD-Ig de la invención pueden enlazar un antígeno o múltiples antígenos. Tales antígenos incluyen, pero no se limitan a, los objetivos listados en las siguientes bases de datos, las bases de datos se incorporan en la presente para referencia. Estas bases de datos objetivos incluyen aquellos listados:

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

Citocinas y receptores de citocina (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);

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

Receptores de quimiocina y GPCRs (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);

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

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

Proteína cinasas (http://spd.cbi.pku.edu.cn/), y

Marcadores de CD humanos (http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_ locked.pdf) y (Zola (2005) Blood 106:3123-6).

Las DVD-Ig son útiles como agentes terapéuticos para bloquear

simultáneamente dos diferentes objetivos para mejorar la eficacia/seguridad y/o incrementar la cobertura del paciente. Tales objetivos pueden incluir objetivos solubles (por ejemplo, TNF) y objetivos de receptor de superficie celular (por ejemplo, VEGFR y EGFR). También se pueden usar para inducir la citotoxicidad redirigida entre células de tumor y células T (por ejemplo, Her2 y CD3) para terapia de cáncer, o entre células autorreactivas y células efectoras para enfermedad autoinmune o trasplante, o entre cualquier célula objetivo y célula efectora para eliminar las células causantes de la enfermedad en cualquier enfermedad dada.

Además, la DVD-Ig se puede usar para activar el agrupamiento de receptor y activación cuando se diseña para dirigir dos diferentes epítopes en el mismo receptor. Esto puede tener beneficio en la producción de terapéuticos anti-GPCR agonistas o antagonistas. En este caso, la DVD-Ig se puede usar para dirigir dos diferentes epítopes (incluyendo epítopes tanto en las regiones de bucle como el dominio extracelular) en una célula para agrupamiento/señalización (dos moléculas de superficie celular) o señalización (en una molécula). De manera similar, una molécula de DVD-Ig se puede diseñar para activar la ligación de CTLA-4, y una señal negativa activando dos diferentes epítopes (o 2 copias del mismo epítope) de dominio extracelular de CTLA-4, conduciendo a la bajo regulación de la respuesta inmune. CTLA-4 es un objetivo clínicamente validado para el tratamiento terapéutico de un número de trastornos inmunológicos. Las interacciones de CTLA-4/B7 regulan negativamente la activación de células T atenuando la progresión de ciclo celular, producción de IL-2, y proliferación de células T después de la activación, y el acoplamiento de CTLA-4 (CD152) puede bajo-regular la activación de células T y promover la inducción de tolerancia

inmune. Sin embargo, la estrategia para atenuar la activación de células T por acoplamiento de anticuerpo agonista de CTLA-4 ha sido no exitosa puesto que la activación de CTLA-4 requiere ligación. La interacción molecular de CTLA-4/B7 es un arreglo de “cremallera sesgada” como se demuestra por análisis estructural cristalino (Stamper (2001) Nature 410:608). Sin embargo, ninguno de los reactivos de enlace de CTLA-4 actualmente disponibles tienen propiedades de ligación, incluyendo mAbs anti-CTLA-4. Existen diversos intentos para dirigir este tema. En un caso, se generó un anticuerpo de cadena única unido a un miembro celular, y significativamente inhibió el rechazo alogénico en ratones (Hwang (2002) J. Immunol. 169:633). En un caso separado, se generó un anticuerpo de cadena única enlazado a la superficie de APC artificial para CTLA-4 y demostró que atenúa las respuestas de células T (Griffin (2000) J. Immunol. 164:4433). En ambos casos, la ligación de CTLA-4 se logró por anticuerpos unidos al miembro estrechamente localizado en sistemas artificiales. Mientras que estos experimentos proporcionan prueba de concepto para bajo-regulación inmune activando la señalización negativa de CTLA-4, los reactivos usados en estos reportes no son adecuados para uso terapéutico. Con este fin, la ligación de CTLA-4 se puede lograr usando una molécula de DVD-Ig, la cual dirige dos diferentes epítopes (o 2 copias del mismo epítope) de dominio extracelular de CTLA-4. La justificación es que la distancia que abarca dos sitios de enlace de una Igg, aproximadamente 150-170Å, es demasiado grande para la ligación activa de CTLA-4 (30-50Å entre 2 homodímeros de CTLA-4). Sin embargo, la distancia entre los dos sitios de enlace en DVD-Ig (un brazo) es mucho más corta, también en el intervalo de 30-50Å, permitiendo la ligación apropiada de CTLA-4.

De manera similar, la DVD-Ig puede activar dos diferentes miembros de un complejo de receptor de superficie celular (por ejemplo, CR1 y una proteína/patógeno soluble para impulsar la depuración rápida de la proteína/patógeno soluble objetivo.

Adicionalmente, las DVD-Igs de la invención se pueden emplear para el suministro específico de tejido (objetivo de un marcador de tejido y un mediador de enfermedad para PK local mejorada, por consiguiente mayor eficacia y/o menor toxicidad), incluyendo suministro intracelular (objetivo de un receptor de internalización y una molécula intracelular), y suministro al interior del cerebro (por ejemplo, dirección de receptor de transferrina y un mediador de enfermedad del SNC para cruzar la barrera hemato-encefálica). La DVD-Ig también puede servir como una proteína portadora para suministrar un antígeno a una ubicación específica vía enlace a un epítope no neutralizante de este antígeno y también para incrementar la vida media del antígeno. Además, la DVD-Ig se puede diseñar ya sea para ser enlazada físicamente a dispositivos médicos implantados en pacientes o dirigida a estos dispositivos médicos (ver Burke et al. (2006) Adv. Drug Deliv. Rev. 58(3):37-446; Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices (ver Hildebrand et al. (2006) Surface Coatings Technol. 200(22-23):6318-6324; Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis (ver Wu et al. (2006) Biomaterials 27(11):2450-2467); Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices (ver Marques et al. Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine (2005), pp. 377-397). Brevemente, la dirección de tipos apropiados de células al sitio de implante médico puede promover la curación y restauración de la

función de tejido normal. Alternativamente, también se proporciona la inhibición de mediadores (incluyendo pero no limitado a citocinas), liberadores en implante de dispositivo por una DVD acoplada a o dirigida a un dispositivo. Por ejemplo, las endoprótesis vasculares se han usado por años en cardiología intervencional para despejar arterias bloqueadas y para mejorar el flujo de sangre al músculo cardiaco. Sin embargo, se ha conocido que las endoprótesis vasculares metálicas descubiertas tradicionales causan restenosis (re-estrechamiento de la arteria en un área tratada) en algunos pacientes y pueden conducir a coágulos sanguíneos. Recientemente, se ha descrito una endoprótesis vascular revestida con anticuerpo anti-CD34 la cual reduce la restenosis y previene que ocurran coágulos sanguíneos capturando las células progenitoras endoteliales (EPC) que circulan en toda la sangre. Las células endoteliales son células que forran los vasos sanguíneos, permitiendo que la sangre fluya suavemente. Las EPCs se adhieren a la superficie dura de la endoprótesis vascular formando una capa lisa que no solamente promueve la curación sino previene la restenosis y coágulos sanguíneos, complicaciones previamente asociadas con el uso de endoprótesis vasculares (Aoji et al. (2005) J. Am. Coll. Cardiol. 45(10): 1574-9). Además de mejorar los resultados para pacientes que requieren endoprótesis vasculares, también hay implicaciones para pacientes que requieren cirugía de desvío cardiovascular. Por ejemplo, un conducto vascular prostético (arteria artificial) revestido con anticuerpos anti-EPC eliminaría la necesidad de usar arterias de piernas o brazos de pacientes para injertos de cirugía de desvío. Esto reduciría las veces de anestesia y cirugía, lo cual a su vez reduciría las muertes por cirugía coronaria. Las DVD-Ig se diseñan de tal manera que enlazan un marcador de

superficie celular (tal como CD34) así como también una proteína (o un epítope de cualquier clase, incluyendo pero no limitado a proteínas, lípidos y polisacáridos) que se ha revestido en el dispositivo implantado para facilitar el reclutamiento celular. Tales procedimientos también se pueden aplicar a otros implantes médicos en general. Alternativamente, las DVD-Igs se pueden revestir en dispositivos médicos y en la implantación y liberación de todas las DVDs del dispositivo (o cualquier otra necesidad la cual puede requerir DVD-Ig fresca adicional, incluyendo envejecimiento y desnaturalización de la DVD-Ig ya cargada), el dispositivo se podría recargar por administración sistémica de DVD-Ig fresca al paciente, donde la DVD-Ig se diseña para enlazar un objetivo de interés (una citocina, un marcador de superficie celular (tal como CD34) etc.) con un conjunto de sitios de enlace y un objetivo revestido en el dispositivo (incluyendo una proteína, un epítope de cualquier clase, incluyendo pero no limitado a lípidos, polisacáridos y polímeros) con el otro. Esta tecnología tiene la ventaja de extender la utilidad de implantes revestidos.

A. Uso de DVD-Igs en varias enfermedades

Las moléculas de DVD-Ig de la invención también son útiles como moléculas terapéuticas para tratar varias enfermedades. Tales moléculas de DVD pueden enlazar uno o más objetivos involucrados en una enfermedad específica. Los ejemplos de tales objetivos en varias enfermedades se describen a continuación.

1. Respuesta Autoinmune e Inflamatoria Humana

Muchas proteínas se han implicado en las respuestas autoinmunes e inflamatorias generales, incluyendo C5, CCL1 (I-309), CCL11 (eotaxina), CCL13 (mcp-4), CCL15 (MIP-Id), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL2 (mcp-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/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, ILI3, IL17C, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL22, IL5, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, SCYE1 (citocina activadora de monocitos endoteliales), SPP1, TNF, TNFSF5, IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RAI, 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, GF11, 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, IL29, IL20, KITLG, LEP, LTA, LTB, LTB4R, LTB4R2, LTBR, MIF, NPPB, PDGFB, TBX21, TDGF1, TGFA, TGFB1, TGFB1I1, TGFB2, TGFB3, TGFBI, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TH1L, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF11A, TNFRSF21, TNFSF4, TNFSF5, TNFSF6, TNFSF11, VEGF, ZFPM2, y RNF110 (ZNF144). En un aspecto, se proporcionan DVD-Igs que enlazan uno o más de los objetivos listados en la presente.

Se contemplan DVD-Igs que enlazan los siguientes pares de objetivos para tratar enfermedad inflamatoria: IL-1alfa (sec. 3) e IL-1beta (sec. 1); IL-1alfa (sec. 2) e IL-1beta (sec. 1); IL-1alfa (sec. 1) e IL-1beta (sec. 1); IL-1alfa (sec. 3) e IL-1beta (sec. 2); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 2); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 3); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 4); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 5) (ver Ejemplos 2.1 a 2.8).

2. Asma

El asma alérgico se caracteriza por la presencia de eosinofilia, metaplasia de células calciforme, alteraciones de células epiteliales, hiperreactividad de vías respiratorias (AHR), y expresión de citocina Th2 y Th1, así como también niveles de IgE en suero elevados. Ahora se acepta ampliamente que la inflamación de las vías respiratorias es el factor clave que fundamenta la

patogénesis del asma, involucrando una interacción compleja de células inflamatorias tales como células T, células B, eosinófilos, mastocitos y macrófagos, y de sus mediadores secretados incluyendo citocinas y quimiocinas. Los corticoesteroides son el tratamiento anti-inflamatorio más importante para el asma hoy en día, sin embargo su mecanismo de acción es no específico y existen preocupaciones de seguridad, especialmente en la población de pacientes juveniles. El desarrollo de terapias más específicas y dirigidas por lo tanto se garantiza. Hay evidencia incrementada que IL-13 en ratones imita muchas de las características del asma, incluyendo AHR, hipersecreción de moco y fibrosis de vías respiratorias, independientemente de inflamación eosinófila (Finotto et al. (2005) Int. Immunol. 17(8):993-1007; Padilla et al. (2005) J. Immunol. 174(12):8097-8105).

IL-13 se ha implicado que tiene un papel fundamental en la causa de respuestas patológicas asociadas con el asma. El desarrollo de terapia con mAb anti-IL-13 para reducir los efectos de IL-13 en el pulmón es un nuevo procedimiento emocionante que ofrece promesa considerable como un nuevo tratamiento para el asma. Sin embargo, otros mediadores de las trayectorias inmunológicas diferenciales también se involucran en la patogénesis de asma, y el bloqueo de estos mediadores, además de IL-13, pueden ofrecer beneficio terapéutico adicional. Tales pares de objetivo incluyen, pero no se limitan a, IL-13 y citocina pro-inflamatoria, tal como factor-α de necrosis de tumor (TNF-α). TNF-α puede amplificar la respuesta inflamatoria en asma y se puede enlazar a la severidad de la enfermedad (McDonnell et al. (2001) Progr. Respir. Res. 31 (New Drugs for Asthma, Allergy and COPD):247-250.). Esto sugiere que el bloqueo tanto

de IL-13 como TNF-α puede tener efectos benéficos, particularmente en la enfermedad severa de vías respiratorias. En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención enlaza los objetivos IL-13 y TNF-α y se usa para tratar el asma.

Los modelos animales tal como modelo de ratón de asma inducido por OVA, donde se pueden valorar tanto la inflamación como AHR, se conocen en el arte y se pueden usar para determinar la capacidad de varias moléculas de DVD-Ig para tratar el asma. Los modelos animales para estudiar el asma se describen en Coffman et al. (2005) J. Exp. Med. 201(12):1875-1879; Lloyd et al. (2001) Adv. Immunol. 77:263-295; Boyce et al. (2005) J. Exp. Med. 201(12):1869-1873; y Snibson et al. (2005) J. Brit. SocoAllergy Clin. Immunol. 35(2):146-52. Además de las valoraciones de seguridad rutinarias de estos pares de objetivo, las pruebas específicas para el grado de inmunosupresión se pueden garantizar y ayudan en la selección de mejores pares de objetivo (ver Luster et al. (2004) Toxicol. 92(1-3):229-43; Descotes et al. (1992) Dev. Biol. Standardiz. 77:99-102; Hart et al. (2001) J. Allergy and Clin. Immunol. 108(2):250-257).

Con base en la justificación descrita en la presente y uso del mismo modelo de evaluación para eficacia y seguridad se pueden determinar otros pares de objetivos que las moléculas de DVD-Ig pueden enlazar y ser útiles para tratar el asma. En una modalidad, tales objetivos incluyen, pero no se limitan a, IL-13 e IL-1beta, puesto que IL-1beta también está implicada en la respuesta inflamatoria en asma; IL-13 y citocinas y quimiocinas que están involucradas en la inflamación, tales como IL-13 e IL-9; IL-13 e IL-4; IL-13 e IL-5; IL-13 e IL-25; IL-13 y TARC; IL-13 y MDC; IL-13 y MIF; IL-13 y TGF-β; IL-13 y agonista de LHR; IL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; e IL-13 y ADAM8. La presente invención también

proporciona DVD-Igs que enlazan uno o más objetivos involucrados en asma seleccionados del grupo que consiste de CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFNA1, IFNB1, IFNG, histamina y receptores de histamina, IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, KITLG, PDGFB, IL2RA, IL4R, IL5RA, IL8RA, IL8RB, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNF, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, y quitinasa.

3. Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (RA), una enfermedad sistémica, se caracteriza por una reacción inflamatoria crónica en el sinovio de articulaciones y se asocia con la degeneración de cartílago y erosión del hueso yuxta-articular. Muchas citocinas pro-inflamatorias incluyendo TNF, quimiocinas, y factores de crecimiento se expresan en articulaciones enfermas. La administración sistémica de anticuerpo anti-TNF o proteína de fusión sTNFR a modelos de ratón de RA se mostró que es anti-inflamatoria y protectora de las articulaciones. Las investigaciones clínicas en las cuales la actividad de TNF en pacientes con RA se bloqueó con infliximab administrado intravenosamente (Harriman et al. (1999) Ann. Rheum. Dis. 58 Suppl 1:161-4), un mAb anti-TNF quimérico, han proporcionado evidente que el TNF regula la producción de IL-6, IL-8, MCP-1, y VEGF, reclutamiento de células

inmunes e inflamatorias en articulaciones, angiogénesis, y reducción de niveles sanguíneos de metaloproteinasas de matriz 1 y 3. Un entendimiento mejor de la trayectoria inflamatoria en artritis reumatoide ha conducido a la identificación de otros objetivos terapéuticos involucrados en artritis reumatoide. Los tratamientos prometedores tales como antagonistas de interleucina-6 (anticuerpo de receptor de IL-6 MRA, desarrollado por Chugai, Roche (ver Nishimoto et al. (2004) Arthritis Rheum. 50(6):1761-1769), CTLA4Ig (abatacept, Genovese et al. (2005) N. Engl. J. Med. 353:1114-23.), y terapia con células anti-B (rituximab, Okamoto (2004) N. Engl. J. Med. 351:1909) ya se han probado en ensayos controlados aleatorizados durante el último años. Otras citocinas se han identificado y se ha mostrado que son de beneficio en modelos animales, incluyendo interleucina 15 (anticuerpo terapéutico HuMax-IL_15, AMG 714 ver Baslund et al. (2005) Arthrit. Rheum. 52(9):2686-2692), interleucina-17, e interleucina-18, y los ensayos clínicos de estos agentes actualmente están en curso. La terapia de anticuerpo específico dual, combinando anti-TNF y otro mediador, tiene mayor potencial en el mejoramiento de la eficacia clínica y/o cobertura del paciente. Por ejemplo, el bloqueo tanto de TNF como VEGF puede erradicar potencialmente la inflamación y angiogénesis, las cuales están involucradas en la patofisiología de RA. También se contempla el bloqueo de otros pares de objetivos involucrados en RA incluyendo, pero no limitado a, TNF e IL-18; TNF e IL-12; TNF e IL-23; TNF e IL-1beta; TNF y MIF; TNF e IL-17; y TNF e IL-15 con DVD-Igs específicas. Además de las valoraciones de seguridad rutinarias de estos pares de objetivos, las pruebas específicas para el grado de inmunosupresión se pueden garantizar y ayudan en la selección de mejores pares de objetivo (ver Luster et al. (2004) Toxicol. 92(1-

3):229-43; Descotes et al. (1992) Dev. Biol. Standard. 77:99-102; Hart et al. (2001) J. Allergy Clin. Immunol. 108(2):250-257). Si una molécula de DVD-Ig será útil para el tratamiento de artritis reumatoide se puede valorar usando modelos de RA en animales preclínicos tal como el modelo de ratón de artritis inducida por colágeno. Otros modelos útiles también son bien conocidos en el arte (ver Brand (2005) Comp. Med. 55(2):114-22). Con base en la reactividad cruzada de los anticuerpos parentales para ortólogos humanos y de ratón (por ejemplo, reactividad para TNF humano y de ratón, IL-15 humana y de ratón, etc.), los estudios de validación en el modelo de CIA de ratón se pueden conducir con moléculas de DVD-Ig derivadas de "anticuerpo sustituto igualado"; brevemente, una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos específicos de objetivo de ratón se puede igualar al grado posible con las características de los anticuerpos humanizados o humanos parentales usados para la construcción de DVD-Ig humana (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar, etc.).

4. SLE

El sello distintivo inmunopatogénico de SLE es la activación de células B policlonales, la cual conduce a hiperglobulinemia, producción de autoanticuerpo y formación de complejo inmune. La anormalidad fundamental parece ser la falla de las células T para suprimir los clones de células B prohibidos debido a la desregulación generalizada de células T. Además, la interacción de células T y B se facilita por varias citocinas tal como IL-1 así como también moléculas co-estimulantes tales como CD40 y CD40L, B7 y CD28 y CTLA-4, las cuales inician la segunda señal. Estas interacciones conjuntamente con la

depuración fagocítica no deteriorada de complejos inmunes y material apoptótico, perpetúan la respuesta inmune con lesión de tejido resultante. Los siguientes objetivos se pueden involucrar en SLE y potencialmente se pueden usar para un procedimiento de DVD-Ig para intervención terapéutica: terapias dirigidas a 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 co-estimulantes: CTLA4 o B7.1/B7.2; inhibición de supervivencia de células B: B1yS, BAFF; Inactivación de complemento: C5; Modulación de citocina: el principio clave es que la respuesta biológica neta en cualquier tejido es el resultado de un equilibrio entre los niveles locales de citocinas proinflamatorias o anti-inflamatorias (ver Sfikakis et al. (2005) Curr. Opin. Rheumatol. 17:550-7). SLE se considera ques una enfermedad impulsada por Th-2 con elevaciones documentadas de IL-4, IL-6, IL-10 en suero. Las DVD-Ig que enlazan uno o más objetivos seleccionados del grupo que consiste de IL-4, IL-6, IL-10, IFN-α, y TNF-α también se contemplan.

La combinación de objetivos discutidos en la presente mejorará la eficacia terapéutica para SLE que se puede probar en un número de modelos preclínicos de lupus (ver Peng (2004) Methods Mol. Med. 102:227-72). Con base en la reactividad cruzada de los anticuerpos parentales para ortólogos humanos y

de ratón (por ejemplo, reactividad para CD20 humano y de ratón, Interferón alfa humano y de ratón, etc.), los estudios de validación en un modelo de lupus de ratón se pueden conducir con moléculas de DVD-Ig derivadas de “anticuerpo sustituto igualado”; brevemente, una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos específicos de objetivo de ratón se puede igualar al grado posible con las características de los anticuerpos humanos o humanizados parentales usados para la construcción de DVD-Ig humana (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar, etc.).

5. Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad tipo autoinmune humana compleja con una etiología predominantemente desconocida. La destrucción inmunológica de la proteína básica mielina (MBP) en todo el sistema nervioso es la patología principal de la esclerosis múltiple. La MS es una enfermedad de patologías complejas, la cual involucra la infiltración por células T CD4+ y CD8+ y de respuesta dentro del sistema nervioso central. La expresión en el SNC de cicotinas, especies reactivas de nitrógeno y moléculas coestimulantes también se ha descrito en MS. De mayor consideración son los mecanismos inmunológicos que contribuyen al desarrollo de autoinmunidad. En particular, la expresión de antígeno, citocina e interacciones de citocina, y células T regulatorias, las cuales ayudan a equilibrar/modular otras células T tales como células Th1 y Th2, son áreas importantes para la identificación terapéutica de objetivo.

La IL-12 es una citocina proinflamatoria que se produce por APC y promueve la diferenciación de células efectoras Th1. La IL-12 se produce en las

lesiones desarrolladas de pacientes con MS así como también en animales afectados por EAE. Previamente se mostró que la interferencia en las trayectorias de IL-12 efectivamente previene EAE en roedores, y que la neutralización in vivo de IL-12p40 usando un mAb anti-IL-12 tiene efectos benéficos en el modelo de EAE inducido por mielina en monos tití comunes.

TWEAK es un miembro de la familia de TNF, constitutivamente expresado en el sistema nervioso central (SNC), con efectos proinflamatorios, proliferativos o apoptóticos dependiendo de tipos de células. Su receptor, Fn14, se expresa en el SNC por células endoteliales, astrocitos reactivos y neuronas. La expresión de mARN de Fn14 y TWEAK incrementa en la médula espinal durante la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE). El tratamiento con anticuerpo anti-TWEAK en EAE inducida por glicoproteína de mielina oligodendrocito (MOG) en ratones C57BL/6 resultó en una reducción de la severidad de la enfermedad e infiltración de leucocitos cuando los ratones se trataron después de la fase de cebado.

Un aspecto de la invención pertenece a moléculas de DVD-Ig que enlazan uno o más, por ejemplo dos, objetivos seleccionados del grupo que consiste de IL-12, TWEAK, IL-23, CXCL13, CD40, CD40L, IL-18, VEGF, VLA-4, TNF, CD45RB, CD200, IFNgamma, GM-CSF, FGF, C5, CD52, y CCR2. Una modalidad incluye una DVD-IG anti-IL-12/TWEAK específica dual como un agente terapéutico benéfico para el tratamiento de MS.

Diversos modelos animales para valorar la utilidad de las moléculas de DVD para tratar MS se conocen en el arte (ver 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. Con base en la reactividad cruzada de los anticuerpos parentales para ortólogos de especie humana y animal (por ejemplo, reactividad para IL-12 humana y de ratón, TWEAK humano y de ratón, etc.), los estudios de validación en el modelo de EAE de ratón se pueden conducir con moléculas de DVD-Ig derivadas de "anticuerpo sustituto igualado"; brevemente, una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos específicos de objetivo de ratón se pueden igualar al grado posible con las características de los anticuerpos humanizados o humanos parentales usados para la construcción de DVD-Ig humana (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar, etc.). El mismo concepto se aplica a modelos animales en otras especies no de roedores, donde una DVD-Ig derivada de "anticuerpo sustituto igualado" sería seleccionada para la farmacología anticipada y posiblemente estudios de seguridad. Además de las valoraciones de seguridad rutinarias de estos pares de objetivo, las pruebas específicas para el grado de inmunosupresión se pueden garantizar y ayudar en la selección de los mejores pares de objetivo (ver Luster et al. (1994) Toxicol. 92(1-3):229-43; Descotes et al. (1992) Devel. Biol. Standardiz. 77:99-102; Jones (2000) IDrugs 3(4):442-6).

6. Sepsis

La patofisiología de la sepsis se inicia por los componentes de membrana externa tanto de organismos gram-negativo (lipopolisacárido [LPS], lípido A, endotoxina) como organismos gram-positivo (ácido lipoteicoico,

peptidoglicano). Estos componentes de membrana externa son capaces de enlazar el receptor de CD14 en la superficie de monocitos. En virtud de los receptores tipo toll recientemente descritos, una señal luego se transmite a la célula, conduciendo a la producción eventual de factor-alfa de necrosis de tumor de citocinas proinflamatorias (TNF-alfa) e interleucina-1 (IL-1). Las respuestas inflamatorias e inmunes contundentes son características esenciales de choque séptico y juegan una parte central en la patogénesis de daño de tejido, insuficiencia de órganos múltiples, y muerte inducida por sepsis. Las citocinas, especialmente factor de necrosis de tumor (TNF) e interleucina (IL-1), se ha mostrado que son mediadores críticos de choque séptico. Estas citocinas tienen un efecto tóxico directo en tejidos; también activan la fosfolipasa A2. Estos y otros efectos conducen a concentraciones incrementadas de factor activador de plaquetas, promoción de actividad de óxido nítrico sintasa, promoción de infiltración de tejido por neutrófilos, y promoción de actividad de neutrófilo.

El tratamiento de sepsis y choque séptico sigue siendo un dilema clínico, y los ensayos prospectivos recientes con modificadores de respuesta biológica (es decir, anti-TNF y anti-MIF) ayudan en la inversión de los períodos acompañantes de supresión inmune. Los estudios en animales experimentales y pacientes críticamente enfermos han demostrado que la apoptosis incrementada de órganos linfoides y algunos tejidos parenquimales contribuyen a esta supresión inmune, anergia, y disfunción de sistema de órganos. Durante los síndromes de sepsis, la apoptosis de linfocito se puede activar por la ausencia de IL-2 o por la liberación de glucocorticoides, granzimas, o las citocinas ‘muertas’ así llamadas: el factor alfa de necrosis de tumor o apoptosis de ligando Fas procede vía la auto-

activación de caspasas citosólicas y/o mitocondriales, las cuales se pueden influenciar por los miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2. En animales experimentales, el tratamiento con inhibidores de apoptosis no solo puede prevenir la apoptosis de células linfoides; también puede mejorar el resultado. Aunque los ensayos clínicos con agentes anti-apoptóticos permanecen distantes debido en gran parte a las dificultades técnicas asociadas con su administración y objetivo de tejido, la inhibición de apoptosis por linfocito representa un objetivo terapéutico atractivo para el paciente séptico. Igualmente, un agente específico dual que dirige tanto el mediador inflamatorio como un mediador apoptótico, pudo haber añadido beneficio. Un aspecto de la invención pertenece a DVD-Igs que enlazan uno o más objetivos involucrados en sepsis, en una modalidad dos objetivos, seleccionados del grupo que consiste TNF, IL-1, MIF, IL-6, IL-8, IL-18, IL-12, IL-23, FasL, LPS, receptores tipo Toll, TLR-4, factor de tejido, MIP-2, ADORA2A, CASP1, CASP4, IL-10, IL-1B, NFKB1, PROC, TNFRSF1A, CSF3, CCR3, IL1RN, MIF, NFKB1, PTAFR, TLR2, TLR4, GPR44, HMOX1, midcina, IRAK1, NFKB2, SERPINA1, SERPINE1, y TREM1. La eficacia de tales DVD-Igs para sepsis se puede evaluar en modelos animales preclínicos conocidos en el arte (ver Buras et al. (2005) Nat. Rev. Drug Discov. 4(10):854-65 y Calandra et al. (2000) Nat. Med. 6(2): 164-70).

7. Trastornos neurológicos

7.1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son ya sea crónicas en este caso son usualmente dependientes de la edad o agudas (por ejemplo, apoplejía,

lesión cerebral traumática, lesión de médula espinal, etc.). Se caracterizan por la pérdida progresiva de funciones neuronales (muerte celular neuronal, desmielinización), pérdida de movilidad y pérdida de memoria. El reconocimiento emergente de los mecanismos que fundamentan las enfermedades neurodegenerativas crónicas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) muestra una etiología completa y una variedad de factores se ha reconocido que contribuyen a su desarrollo y progresión por ejemplo, edad, estado glicémico, producción mieloide y multimerización, acumulación de productos finales de gligación avanzada (AGE) que enlazan su receptor RAGE (receptor para AGE), estrés oxidativo de cerebro incrementado, flujo sanguíneo cerebral disminuido, neuroinflamación que incluye liberación de quimiocinas y citocinas inflamatorias, disfunción neuronal y activación microgial. Por consiguiente, estas enfermedades neurodegenerativas crónicas representan una interacción compleja entre múltiples tipos celulares y mediadores. Las estrategias de tratamiento para tales enfermedades se limitan y mayormente constituyen ya sea procesos inflamatorios de bloque con agentes anti-inflamatorios no específicos (por ejemplo, corticoesteroides, inhibidores COX) o agentes para prevenir la pérdida de neuronas y/o funciones sinápticas. Estos tratamientos no detienen la progresión de la enfermedad. Estudios recientes sugieren que terapias más dirigidas tales como anticuerpos a péptido A-b soluble (incluyendo las formas oligoméricas de A-b) no solo pueden ayudar a detener la progresión de la enfermedad sino pueden ayudar a mantener la memoria también. Estas observaciones preliminares sugieren que las terapias específicas que dirigen más de un mediador de enfermedad (por ejemplo, A-b y una citocina pro-inflamatoria tal como TNF) pueden proporcionar

aún mejor eficacia terapéutica para enfermedades neurodegenerativas crónicas que se observan con la dirección de un mecanismo de enfermedad único (por ejemplo, A-b soluble solo). Diversos modelos animales para valorar la utilidad de las moléculas de DVD-Ig para tratar MS son conocidos en el arte (ver 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. Con base en la reactividad cruzada de los anticuerpos parentales para ortólogos de especie humana y animal (por ejemplo, reactividad para IL-12 humana y de ratón, TWEAK humano y de ratón, etc.), los estudios de validación en el modelo de EAE de ratón se pueden conducir con moléculas de DVD-Ig derivadas de “anticuerpo sustituto igualado”. Brevemente, una DVD-Ig basada en dos (o más) anticuerpos específicos de objetivo de ratón se puede igualar al grado posible con las características de los anticuerpos humanizados o humanos parentales 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 de roedor, donde una DVD-Ig derivada de “anticuerpo sustituto igualado” sería seleccionada para los estudios anticipados de farmacología y posiblemente seguridad. Además de las valoraciones de seguridad rutinarias de estos pares de objetivo, las pruebas específicas para el grado de inmunosupresión se pueden garantizar y ayudar en la selección de los mejores pares de objetivo (ver 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 enlazar uno o más objetivos involucrados en enfermedades neurodegenerativas crónicas tal como Alzheimer. Tales objetivos incluyen, pero no se limitan a, cualquier superficie mediadora, soluble o celular, implicada en la patogénesis de AD, por ejemplo, AGE (S100 A, amfoterina), citocinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IL-1), quimiocinas (por ejemplo, MCP1), moléculas que inhiben la regeneración de nervios (por ejemplo, Nogo, RGM A), moléculas que mejoran el crecimiento de neurita (neurotrofinas) y moléculas que pueden mediar el transporte a la barrera hemato-encefálica (por ejemplo, receptor de transferrina, receptor de insulina o RAGE). La eficacia de las moléculas de DVD-Ig se puede validar en modelos animales pre-clínicos tal como los ratones transgénicos que sobre-expresan la proteína precursora de amiloide o RAGE o desarrollan síntomas tipo enfermedad de Alzheimer. Además, las moléculas de DVD-Ig se pueden construir y probar para eficacia en los modelos animales y la mejor DVD-Ig terapéutica se puede seleccionar para la prueba en pacientes humanos. Las moléculas de DVD-Ig también se pueden emplear para el tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas tal como enfermedad de Parkinson. La alfa-sinucleína está involucrada en la patología de Parkinson. Una DVD-Ig capaz de dirigir la alfa-sinucleína y mediadores inflamatorios tales como TNF, IL-1, MCP-1 pueden probar la terapia efectiva para enfermedad de Parkinson y se contemplan en la invención.

7.2 Regeneración Neuronal y Lesión de Médula Espinal

A pesar de un incremento en el reconocimiento de los mecanismos patológicos, la lesión de médula espinal (SCI) aún es una afección devastadora y

representa una indicación médica caracterizada por una alta necesidad médica. La mayoría de las lesiones de médula espinal son lesiones por contusión o compresión y la lesión primaria usualmente es seguida por mecanismos de lesión secundarios (mediadores inflamatorios por ejemplo, citocinas y quimiocinas) que empeoran la lesión inicial y resultan en alargamiento significativo del área de lesión, algunas veces más de 10 veces. Estos mecanismos primarios y secundarios en SCI son muy similares con aquellos en la lesión cerebral causada por otro medio por ejemplo, apoplejía. No hay tratamiento satisfactorio y la inyección de bolo de alta dosis de metilprednisolona (MP) es la única terapia usada dentro de una ventana de tiempo estrecha de 8 h post-lesión. Este tratamiento, sin embargo, solamente se propone para prevenir la lesión secundaria sin causar alguna recuperación funcional significativa. Es fuertemente criticado por la falta de eficacia inequívoca y efectos adversos severos, como inmunosupresión con infecciones subsecuentes y alteraciones musculares histopatológicas severas. Ningún otro fármaco, moléculas pequeñas o biológicas, que estimula el potencial regenerativo endógeno se aprueba, pero los candidatos de fármaco y principios de tratamiento prometedores han mostrado eficacia en modelos animales de SCI en años recientes. A un mayor grado la falta de recuperación funcional en SCI humana se causa por factores que inhiben el crecimiento de neurita, en sitios de la lesión, en tejido con cicatriz, en mielina así como también en células asociadas a la lesión. Tales factores son las proteínas asociadas a mielina NogoA, OMgp y MAG, RGM A, los CSPG (Proteoglicanos de Sulfato de Condroitina) asociados a la cicatriz y factores inhibidores en astrocitos reactivos (algunas semaforinas y efrinas). Sin embargo, en el sitio de lesión no solamente se encuentran moléculas

inhibidoras de crecimiento sino también factores estimulantes de crecimiento de nurita como neurotrofinas, laminina, L1 y otros. Este ensamble de moléculas promotoras de crecimiento e inhiboras de crecimiento de neurita puede explicar que los factores únicos de bloqueo, como NogoA o RGM A, resultan en recuperación funcional significativa en modelos de SCI de roedor, debido a que una reducción de las influencias inhibidoras podría desplazar el equilibrio de inhibición de crecimiento a promoción de crecimiento. Sin embargo, las recuperaciones observadas con el bloqueo de una molécula inhibidora de crecimiento de neurita única no fueron completas. Para lograr recuperaciones más rápidas y más pronunciadas ya sea bloqueando dos moléculas inhibidoras de crecimiento de neurita, por ejemplo, Nogo y RGM A, o bloqueando una molécula inhibidora de crecimiento de neurita y mejorando las funciones de una molécula de mejoramiento de crecimiento de neurita, por ejemplo, Nogo y neurotrofinas, o bloqueando una molécula inhibidora de crecimiento de neurita, por ejemplo, Nogo y una molécula pro-inflamatoria, por ejemplo, TNF, pueden ser deseables (ver McGee et al. (2003) Trends Neurosci. 26:193; Domeniconi et al. (2005) J. Neurol. Sci. 233:43; Makwana1 et al. (2005) FEBS J. 272:2628; Dickson (2002) Science 298:1959; Teng, et al. (2005) J. Neurosci. Res. 79:273; Kamezis et al. (2004) Nature Neurosci. 7:736; Xu et al. (2004) J. Neurochem. 91:1018).

En un aspecto, se proporcionan DVD-Igs que enlazan pares de objetivo 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; aggrecan, midcina, neurocan, versican, fosfacan, Te38 y TNF-α; anticuerpos específicos de globulómero AB combinados con anticuerpos que promueven el surgimiento de dendrita y axón. La

patología de dendrita es un signo muy temprano de AD y se conoce que NOGO A restringe el crecimiento de dendrita. Se puede combinar tal tipo de ab con cualquier Ab candidato de SCI (proteínas de mielina). Otros objetivos de DVD-Ig pueden incluir cualquier combinación de NgR-p75, NgR-Troy, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR-Lingo, Lingo-Troy, Lingo-p75, MAG u Omgp. Adicionalmente, los objetivos también pueden incluir cualquier superficie mediadora, soluble o celular, implicada en la inhibición de neurita, por ejemplo, Nogo, Ompg, MAG, RGM A, semaforinas, efrinas, A-b soluble, citocinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IL-1), quimiocinas (por ejemplo, MIP 1a), moléculas que inhiben la regeneración de nervios. La eficacia de anti-nogo/anti-RGM A o moléculas de DVD-Ig similares se puede validar en modelos animales pre-clínicos de lesión de médula espinal. Además, estas moléculas de DVD-Ig se pueden construir y probar para eficacia en los modelos animales y la mejor DVD-Ig terapéutica se puede seleccionar para la prueba en pacientes humanos. Además, se pueden construir moléculas de DVD-Ig que dirigen dos distintos sitios de enlace de ligando en un receptor único, por ejemplo, receptor de Nogo el cual enlaza tres ligandos Nogo, Ompg, y MAG y RAGE que enlaza A-b y S100 A. Además, los inhibidores de crecimiento de neurita, por ejemplo, nogo y receptor de nogo, también juegan un papel en la prevención de regeneración de nervios en enfermedades inmunológicas como esclerosis múltiple. La inhibición de la interacción de nogo-receptor de nogo se ha mostrado que mejora la recuperación en modelos animales de esclerosis múltiple. Por lo tanto, las moléculas de DVD-Ig que pueden bloquear la función de un mediador inmune, por ejemplo, una citocina como IL-12 y una molécula inhibidora de crecimiento de neurita, por ejemplo, nogo o RGM pueden ofrecer eficacia más

rápida y mayor que el boqueo de una molécula sola inhibidora de crecimiento de neurita o inmune.

En general, los anticuerpos no cruzan la barrera hemato-encefálica (BB) en una manera eficiente y relevante. Sin embargo, en ciertas enfermedades neurológicas, por ejemplo, apoplejía, lesión cerebral traumática, esclerosis múltiple, etc., la BBB puede ser comprometida y permite la penetración incrementada de DVD-Igs y anticuerpos en el cerebro. En otras afecciones neurológicas, donde la fuga de BBB no ocurre, se puede emplear la dirección de sistemas de transporte endógenos, incluyendo transportadores mediados por portador tales como portadores de glucosa y aminoácido y receptores/estructuras celulares mediadas por transcitosis mediada por receptor en el endotelio vascular de la BBB, habilitando así el transporte de trans-BBB de la DVD-Ig. Las estructuras en la BBB hacen posible que tal transporte incluya, pero no se limite al, receptor de insulina, receptor de transferrina, LRP y RAGE. Además, las estrategias hacen posible el uso de DVD-Igs también como lanzaderos para transportar fármacos potenciales en el SNC incluyendo fármacos de bajo peso molecular, nanopartículas y ácidos nucleicos (Coloma et al. (2000) Pharm Res. 17(3):266-74; Boado et al. (2007) Bioconjug. Chem. 18(2):447-55).

8. Trastornos Oncológicos

La terapia de anticuerpo monoclonal ha emergido como una modalidad terapéutica importante para cáncer (von Mehren et al. (2003) Annu. Rev. Med. 54:343-69). Los anticuerpos pueden ejercer efectos antitumor induciendo apoptosis, citotoxicidad redirigida, interfiriendo con interacciones

ligando-receptor, o previniendo la expresión de proteínas que son críticas para el fenotipo neoplásico. Además, los anticuerpos pueden dirigir componentes del microambiente de tumor, perturbando las estructuras virales tal como la formación de vasculatura asociada con el tumor. Los anticuerpos también pueden dirigir receptores cuyos ligandos son factores de crecimiento, tales como el receptor de factor de crecimiento epidérmico. El anticuerpo inhibe así ligandos naturales que estimulan el crecimiento celular de enlace a células tumorales objetivo. Alternativamente, los anticuerpos pueden inducir una red anti-idiotipo, citotoxicidad mediada por complemento, o citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). El uso de anticuerpo dual específico que dirige dos mediadores de tumor separados probablemente proporcionará beneficio adicional comparado con una terapia monoespecífica.

En otra modalidad, una DVD-Ig de la invención enlaza VEGF y fosfatidilserina; VEGF y ErbB3; VEGF y PLGF; VEGF y ROB04; 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; IGFIR y PDGFR; IGFIR y VEGF; IGFIR y CD20; CD20 y CD74; CD20 y CD30; CD20 y DR4; CD20 y VEGFR2; CD20 y CD52; CD20 y CD4; HGF y cMET; HGF y NRP1; HGF y fosfatidilserina; ErbB3 e IGF1R; ErbB3 e IGF1,2; cMet y Her-2; c-Met y NRP1; c-Met e IGF1R; IGF1,2 y PDGFR; IGF1,2 y CD20; IGF1,2 y IGF1R; IGF2 y EGFR; IGF2 y HER2; IGF2 y CD20; IGF2 y VEGF; IGF2 y 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 ROB04; 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 VEGFRI; CD40 y DR5; CD40 y DR4; CD40 y APRIL; CD40 y BCMA; CD40 y RANKL; CD28 y MAPG; CD80 y CD40; CD80 y CD30; CD80 y CD33; CD80 y CD74; CD80 y CD2; CD80 y CD3; CD80 y 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 y 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, y EGFR y DLL4. Otras combinaciones objetivo incluyen uno o más miembros de la familia EGF/erb-2/erb-3. Otros objetivos (uno o más) involucrados en enfermedades oncológicas que DVD Igs pueden enlazar incluyen, pero no se limitan a aquellos seleccionadas del grupo que consiste de: CD52, CD20, CD19, CD3, CD4, CD8, BMP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, TNF, TNFSF10, BMP6, EGF, FGF1, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GRP, 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, NR1Dl, NR1H3, NR1I3, NR2F6, NR4A3, ESR1, ESR2, NROB1, NROB2, NR1D2, NR1H2, NR1H4, NR1I2, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR5A1, NR5A2, NR6Al, 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, FGF2l, 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, ROB02, CD44, ILK, ITGA1, APC, CD164, COL6Al, MTSS1, PAP, TGFB1Il, AGR2, AIG1, AKAP1, AKAP2, CANTl, CAV1, CDH12, CLDN3, CLN3, CYB5, CYC1, DAB2IP, DES, DNCLI, ELAC2, EN02, EN03, FASN, FLJI2584, FLJ25530, GAGEB1, GAGEC1, GGTl, GSTP1, HIP1, HUMCYT2A, IL29, K6HF, KAIl, KRT2A, MIEl, PARTl, PATE, PCA3, PIAS2, PIK3CG, PPID, PR1, PSCA, SLC2A2, SLC33Al, SLC43Al, STEAP, STEAP2, TPM1, TPM2, TRPC6, ANGPTl, 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, COLI8AI, EDG1, ENG, ITGAV, ITGB3, THBS1, THBS2, BAD, BAG1, BCL2, CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CDH1 (E-cadherina), CDKN1B (p27Kipl), CDKN2A (p16INK4a), COL6A1, CTNNB1 (b-catenina), CTSB (catepsina B), ERBB2 (Her-2), ESR1, ESR2, F3 (TF), FOSL1 (FRA-1), GATA3, GSN (Gelsolina), IGFBP2, IL2RA, IL6, IL6R, IL6ST (glicoproteína 130), ITGA6 (a6 integrina), JUN, KLK5, KRTI9, MAP2K7 (c-Jun), MKI67 (Ki-67), NGFB (NGF), NGFR, NMEI (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 (zinc-a-glicoproteína), BPAG1 (plectina), CDKN1A (p21 Wap 1/Cip 1), CLDN7 (claudina-7), CLU (clusterina), ERBB2 (Her-2), FGF1, FLRT1 (fibronectina), GABRP (GABAa), GNAS1, ID2, ITGA6 (a6 integrina), ITGB4 (b 4 integrina), KLF5 (GC Box BP), KRTI9 (queratina 19), KRTHB6 (queratina tipo II específica del cabello), MACMARCKS, MT3 (metalotionectina-III), MUC1 (mucina), PTGS2 (COX-2), RAC2 (p21Rac2), S100A2, SCGB1D2 (lipofilina B), SCGB2A1 (mammaglobin 2), SCGB2A2 (mammaglobin 1), SPRR1B (Spr1), THBS1, THBS2, THBS4, y TNFAIP2 (B94), RON, c-Met, CD64, DLL4, PLGF, CTLA4, fosfatidilserina, ROB04, CD80, CD22, CD40, CD23, CD28, CD80, CD55, CD38, CD70, CD74, CD30, CD138, CD56, CD33, CD2, CD137, DR4, DR5, RANKL, VEGFR2, PDGFR, VEGFR1,

MTSP1, MSP, EPHB2, EPHA1, EPHA2, EpCAM, PGE2, NKG2D, LPA, SIP, APRIL, BCMA, MAPG, FLT3, PDGFR alfa, PDGFR beta, ROR1, PSMA, PSCA, SCD1, y CD59.

IV. Composiciones farmacéuticas

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de enlace, de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas de enlace de la invención son para uso en, pero no se limitan a, diagnóstico, detección, o monitoreo de un trastorno, en la prevención (por ejemplo, inhibición o retardo del comienzo de una enfermedad, desorden, u otra condición), tratamiento, manejo, o mejora de un trastorno o uno o más síntomas de los mismos, y/o en investigaciones. En una modalidad específica, una composición comprende una o más proteínas de enlace de la invención. En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende una o más proteínas de enlace de la invención y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos diferentes de proteínas de enlace de la invención para tratar un trastorno. En una modalidad, los agentes profilácticos o terapéuticos son útiles para o han sido o actualmente están siendo usados en la prevención, tratamiento, manejo, o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo. De acuerdo con estas modalidades, la composición puede comprender además un portador, diluyente o excipiente.

Las proteínas de enlace de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende una proteína de enlace de la

invención y un portador farmacéuticamente aceptable. El término “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina amortiguada de fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como también combinaciones de los mismos. En algunas modalidades, los agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio, se incluyen en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservadores o amortiguadores, que mejoran la vida útil o efectividad del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Varios sistemas de suministro son conocidos y se pueden usar para administrar uno o más anticuerpos de la invención o la combinación de uno o más anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevenir, manejar, tratar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento e anticuerpo, endocitosis mediada por el receptor (véase, por ejemplo, Wu and Wu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, etc. Los métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal,

intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral, y administración mucosal (por ejemplo, vías intranasal y oral). Además, se puede emplear administración pulmonar, por ejemplo, por el uso de un inhalador o nebulizador, y una formulación con un agente de aerosol. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nos. 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y Publicación de PCT Nos. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/440l3; WO 98/3l346; y WO 99/66903. En una modalidad, una proteína de enlace de la invención, terapia combinada, o una composición de la invención es administrada usando tecnología de suministro de fármacos pulmonares Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass). En una modalidad específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención son administrados vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección de bolo, por absorción a través de capas epiteliales o mucocutáneas (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En una modalidad, el enlace específico de nanotubos de carbono acoplados al anticuerpo (CNTs) a células de tumor in vitro, seguido por su ablación altamente específica con luz casi infrarroja (NIR) se puede usar para dirigir las células de tumor. Por ejemplo, se pueden usar lípidos polares biotinilados para preparar dispersiones de CNT no citotóxicas, biocompatibles, estables que luego son unidas a una o dos DVD-Igs derivadas de neutralita avidina dirigidas contra

uno o más antígenos tumorales (por ejemplo, CD22) (Chakravarty et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:8697-8702.

En una modalidad específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención localmente al área con necesidad de tratamiento; esto se puede lograr por, por ejemplo, y no en forma limitativa, infusión local, por inyección, o por medio de un implante, el implante es de un material poroso o no poroso, incluyendo membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel®), o matrices de colágeno. En una modalidad, una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos de los agonistas de la invención es administrada localmente en el área afectada de un sujeto para prevenir, tratar, manejar, y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra modalidad, una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos de la invención se administra localmente al área afectada en combinación con una cantidad efectiva de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) diferentes de una proteína de enlace de la invención de un sujeto para prevenir, tratar, manejar, y/o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

En otra modalidad, el agente profiláctico o terapéutico se puede suministrar en un sistema de liberación sostenida o liberación controlada. En una modalidad, una bomba se puede usar para lograr la 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 modalidad, los materiales poliméricos se pueden usar para lograr la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véase, por

ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas (1983) J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; Levy et al. (1985) Science 228:190; During et al. (1989) Ann. Neurol. 25:351; Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71:105); Patentes de Estados Unidos Nos. 5,679,377; 5,916,597; 5,912,015; 5,989,463; 5,128,326; Publicación de PCT No. WO 99/15154 y WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limita a, poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etilen-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. En una modalidad, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable en almacenamiento, estéril, y biodegradable. En todavía otra modalidad, un sistema de liberación sostenida o controlada se puede colocar en proximidad del objetivo profiláctico o terapéutico, requiriendo así solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson (1984) en Medical Applications of Controlled Release, supra, 2:115-138).

Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión por Langer (1990) Science 249: 1527-1533). Cualquier técnica conocida por un experto en el arte puede ser usada para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 4,526,938, Publicación de PCT Nos. WO 91/05548

y WO 96/20698, Ning et al. (1996) Radiother. Oncol. 39:179-189, Song et al. (1995) PDA J. Pharm. Sci. Technol. 50:372-397; Cleek et al. (1997) Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

En una modalidad específica, donde la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico se puede administrar in vivo para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo para que se vuelva intracelular, por ejemplo, por el uso de un vector retroviral (véase Patente de Estados Unidos No. 4,980,286), o por inyección directa, o por el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o revestimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en enlace a un péptido similar a homeosecuencia que es sabido que entra al núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868). Alternativamente, un ácido nucleico se puede intorducir intracelularmente e incorporar dentro del ADN de la célula huésped para la expresión por recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención es formulada para ser compatible con su ruta propuesta de administración. Los ejemplos de ruta de administración incluyen, pero no se limitan a la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradémica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosa, y rectal. En una modalidad específica, la composición es formulada de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración

intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal, o tópica para seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para mitigar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la invención no se administran tópicamente, las composiciones se pueden formular en la forma de un ungüento, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, pulverización, aerosol, solución, emulsión, u otra forma bien conocida para un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). En una modalidad, para formas de dosificación tópica no pulverizable, se emplean formas viscosa a semisólida o sólida que comprenden un portador o uno o más excipientes compatibles con aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, bálsamos, y similares, que están, si se desea, esterilizados o mezclados con agentes auxiliares (por ejemplo, conservadores, estabilizadores, agentes de humectación, amortiguadores, o sales) para influir en diversas propiedades, tales como, por ejemplo, presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones en aerosol pulverizables en donde el ingre4diente activo, en una modalidad, en combinación con un portador sólido o líquido, es empaquetado en una mezcla con una sustancia volátil presurizada (por ejemplo, un propulsor gaseoso, tal como freón) o en una botella comprimible. Si se desea también se

pueden adicionar hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación. Los ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si el método de la invención comprende administración intranasal de una composición, la composición se puede formular en una forma en aerosol, pulverización, nebulización o en la forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para uso de acuerdo con la presente invención se pueden suministrar convenientemente en la forma de una presentación para pulverización a partir de empaques presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos (compuestos de, por ejemplo, gelatina) para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Si el método de la invención comprende administración oral, las composiciones se pueden formular oralmente en la forma de tabletas, cápsulas, saquitos, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones, y similares. Las tabletas o cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de enlace (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, o hidroxipropil metilcelulosa); rellenadores (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, o fosfato ácido de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, o sílice);

desintegrantes (por ejemplo, almidón de papa o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Las tabletas se pueden revestir por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, pero sin limitarse a, soluciones, jarabes o suspensiones, o los mismos pueden estar presentes como un producto seco para la constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes formadores de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionadas); y conservadores (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras, saborizantes, colorantes, y agentes edulcorantes como sea apropiado. Las preparaciones para la administración oral se pueden formular convenientemente por liberación lenta, liberación controlada, o liberación sostenida de un agente(s) profiláctico o terapéutico.

El método de la invención puede comprender la administración pulmonar, por ejemplo, por uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente de aerosol. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,9l3; 5,290,540; y 4,880,078; y Publicación de PCT Nos. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/3l346; y WO 99/66903. En una modalidad específica, una proteína de enlace de la invención, terapia de combinación, y/o composición de la

invención se administra usando tecnología de suministro de fármaco pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método de la invención puede comprender la administración de una composición formulada para administración parenteral por inyección (por ejemplo, por inyección de bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección se pueden presentar en una forma farmacéutica unitaria (por ejemplo, en ampollas o en contenedores de dosis múltiples) con un conservador adicionado. Las composiciones pueden tomar tales formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en la forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril) antes de su uso.

Los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente la administración de composiciones formuladas como preparaciones de almacén. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implante (por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) i resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles (por ejemplo, como una sal escasamente soluble).

Los métodos de la invención incluyen administración de composiciones formuladas como formas de sal o neutral. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como

aquellas derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes tales como aquellas derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Generalmente, los ingredientes de composiciones se suministran ya sea separadamente o mezclados conjuntamente en la forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un contenedor sellado herméticamente tal como una ampolla o saquito que indica la cantidad de agente activo. Donde el modo de administración es una infusión, la composición se puede administrar con una botella de infusión que contiene solución salina o agua de grado farmacéutico estéril. Donde el modo de administración es por inyección, una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina se puede proporcionar de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En particular, la invención también proporciona uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención que se empaquetan en un contenedor herméticamente sellado tal como una ampolla o saquito que indica la cantidad del agente. En una modalidad, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención se suministran como un concentrado libre de agua o polvo liofilizado esterilizado seco en un contenedor herméticamente sellado y puede ser reconstituido (por ejemplo, con agua o solución salina) hasta la concentración apropiada para la administración a un sujeto. En una modalidad, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención

se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un contenedor herméticamente sellado a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg, o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o composiciones farmacéuticas de la invención deberán almacenarse a entre 2°C y 8°C, en su contenedor original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención se deben administrar dentro de 1 semana, por ejemplo, dentro de 5 días, dentro de 72 horas, dentro de 48 horas, dentro de 24 horas, dentro de 12 horas, dentro de 6 horas, dentro de 5 horas, dentro de 3 horas, o dentro de 1 hora después de ser reconstituido. En una modalidad alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención se suministran en la forma líquida en un contenedor herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración del agente. En una modalidad, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un contenedor herméticamente sellado al menos 0.25 mg/ml, al menos 0.5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2.5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe ser almacenada a entre 2°C y 8°C, en su contenedor original.

Las proteínas de enlace de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral. En una modalidad, el anticuerpo o porciones de anticuerpo se prepararan como una solución inyectable que contiene 0.1-250 mg/ml de proteína de enlace. La solución inyectable se puede componer de una forma de dosificación liofilizada o líquida en

un cristal acromático o vial ámbar, ampolla o jeringa prellenada. El amortiguador puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10mM, a pH 5.0 a 7.0 (óptimamente pH 6.0). Otros amortiguadores adecuados incluyen pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. El cloruro de sodio se puede usar para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Los crioprotectores se pueden incluir para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 0-10% de sucrosa (óptimamente 0.5-1.0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Los agentes espesantes se pueden incluir para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 1-10% de manitol (óptimamente 2-4%). Los estabilizadores se pueden usar en formas de dosificación tanto líquida como liofilizada, principalmente 1-50 mM de L-Metionina (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes espesantes adecuados incluyen glicina y arginina, cualquiera de las cuales se pueden incluir a una concentración de 0-0.05%, y polisorbato-80 (óptimamente incluido a una concentración de 0.005-0.01%). La composición farmacéutica que comprende las proteínas de enlace de la invención preparadas como una solución inyectable para administración parenteral, además puede comprender un agente útil como un adyuvante, tal como aquel usado para incrementar la absorción, o dispersión de una proteína terapéutica (por ejemplo, anticuerpo). Un adyuvante particularmente útil es hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana seguido de administración parenteral, particularmente administración subcutánea. También permite mayores volúmenes al sitio del inyección (es decir, mayor que 1 ml) con menos dolor y

malestar, e incidencia mínima de reacciones en el sitio de inyección. (Véase Publicación de PCT No. W02004078140 y Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2006104968).

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma elegida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones típicas están en la forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a aquellas usadas para inmunización pasiva de humanos con otros anticuerpos. El modo de elección de administración es parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En una modalidad, el anticuerpo se administra por inyección o infusión intravenosa. En otra modalidad, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de manufactura y almacenamiento. Las composiciones se pueden formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada a alta concentración del fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (es decir, anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en la presente, como sea requerido, seguido por esterilización por filtrado. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto

activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básica y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados en la presente. En el caso de polvos liofilizados, estériles, para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado a vacío y secado por pulverización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada estéril del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede ser mantenida, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede provocar incluyendo, en la composición, un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las proteínas de enlace de la presente invención se pueden administrar por una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, en una modalidad, la vía/modo de administración es una inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como será apreciado por el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas modalidades, el compuesto activo se puede preparar con un portador que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como acetato de etilen vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la

preparación de tales formulaciones están patentados o generalmente son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

En ciertas modalidades, una proteína de enlace de la invención puede ser administrada oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también pueden ser incluido en una cápsula de gelatina de cubierta dura o suave, comprimida en tabletas, o incorporada directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos se pueden incorporar con excipientes y se usan en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, grageas, cápsulas, elíxires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto de la invención por otra administración parenteral, puede ser necesario revestir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación.

Los compuestos complementarios activos también se pueden incorporar en las composiciones. En ciertas modalidades, una proteína de enlace de la invención es coformulado con y/o coadministrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de trastornos con proteína de enlace de la invención. Por ejemplo, una proteína de enlace de la invención se puede coformular y/o coadministrar con uno o más anticuerpos adicionales que enlazan otros objetivos (por ejemplo, anticuerpos que enlazan otras citosinas o que enlazan moléculas de la superficie celular). Además, uno o más anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con dos o más de

los agentes terapéuticos precedentes. Tales terapias de combinación pueden utilizar de manera ventajosa dosis inferiores de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En ciertas modalidades, una proteína de enlace se enlaza a un vehículo que se extiende media vida conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio de Fc, polietilenglicol, y dextrano. Tales vehículos se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 6,660,843 y Publicación de PCT No. WO 99/25044.

En una modalidad específica, las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de enlace de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico de la invención se administran para tratar, prevenir, manejar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo por medio de terapia genética. La terapia genética se refiere a terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta modalidad de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o agente profiláctico o terapéutico de la invención que media un efecto profiláctico o terapéutico.

Cualquiera de los métodos para terapia de genes disponible en la técnica se puede usar de acuerdo con la presente invención. Para revisiones generales de los métodos de terapia de genes, véase Goldspiel et al. (1993) Clin. Pharm. 12:488-505; Wu and Wu (1991) Biother. 3:87-95; Tolstoshev (1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) Science 260:926-932; y Morgan and Anderson (1993) Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May (1993) TIBTECH 11(5):155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de

tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990). Una descripción detallada de varios métodos de terapia de genes se describe en US20090297514.

Las proteínas de enlace de la invención son útiles en el tratamiento de varias enfermedades en donde los objetivos que son reconocidos por las proteínas de enlace son perjudiciales. Tales enfermedades incluye, pero no se limitan a, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus insulinodependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis escleroderma, enfermedad de injerto versus huésped, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, Purpúrea de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasíticas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversal aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, malignidades, insuficiencia cardiaca, infarto al miocardio, enfermedad de Addison, esporádica, deficiencia

poliglandular tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos (aguda), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriática, artropatía colítica ulcerativa, sinovitis enteropática, clamidia, yersinia y artropatía asociada con salmonella, espondiloartropatía, arterioesclerosis/enfermedad ateromatosa, alergia atópica, enfermedad bulosa autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica positiva de Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, enfermedad de Royal Free/encefalitis miálgica, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, Síndrome de Enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida, Enfermedades Relacionadas con Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, insuficiencia de ovarios, insuficiencia de ovarios prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad de tejido conjuntivo asociada con enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad de tejido conjuntivo mezclada asociada con enfermedad pulmonar, esclerosis sistémica asociada con enfermedad pulmonar intersticial, artritis reumatoide asociada con enfermedad pulmonar intersticial, lupus eritematoso sistémico asociado con enfermedad pulmonar, dermatomiositis/polimiositis asociada con enfermedad pulmonar, Enfermedad de Sjörgren asociada con enfermedad pulmonar, espondilitis anquilosante asociada

con enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, hemosiderosis asociada con enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármaco, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrante linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial post-infecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo 1 (hepatitis lupoide o autoinmune clásica), hepatitis autoinmune tipo 2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM), hipoglicemia mediada autoinmune, resistencia a insulina tipo B con acanthosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con trasplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada con trasplante de órganos, osteoartrosis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2, luecopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de lyme, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad de espermas, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpatética, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad de tejido conjuntivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, Enfermedad de Still, esclerosis sistémica, Síndrome de Sjörgren, Arteritis/enfermedad de Takayasu, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad de tiroides autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitíligo, enfermedad hepática aguda, enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis alcohólicas, lesión hepática inducida por alcohol, coleosatatis, enfermedad

hepática idiosincrática, hepatitis inducida por fármaco, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por estreptococos de grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas tipo Th2 y tipo Th1, dolor agudo y crónico (formas diferentes de dolor), y cánceres tales como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovarios, próstata y rectal y malignidades hematopoyéticas (leucemia y linfoma), Abetalipoproteinemia, Acrocianosis, procesos infecciosos o parasíticos agudos y 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 por SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica por contacto, rinitis alérgica, rechazo de aloinjerto, deficiencia de antitripsina alfa-1, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de células del cuerno anterior, terapia anti-cd3, síndrome antifosfolípidos, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticas y periféricas, disección aórtica, hipertensión arterial, arterioesclerosis, fistula arteriovenosa, ataxia, fibrilación atrial (sostenida o paroxismal), aleteo atrial, bloque atrioventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto de huesos, rechazo de trasplante de médula ósea (BMT), bloque de ramificación de haces, linfoma de Burkitt, quemaduras, arritmias cardiacas, síndrome de aturdimiento cardiaco, tumores cardiacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación de desvío cardiopulmonar, rechazo de trasplante de cartílago, degeneraciones córticas cerebelares, trastornos cerebelares, taquicardia atrial caótica o multifocal, trastornos asociados con 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 arteria coronaria, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis en cultivo negativo, fibrosis quística, trastornos asociados con terapia de citocina, Demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre por dengue hemorrágico, dermatitis, afecciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad diabética aterioesclerótica, enfermedad de cuerpo de Lewy difuso, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos de los ganglios basales, síndrome de Down en edad media, trastornos del movimiento inducidos por fármacos inducidos por fármacos los cuales bloquean los receptores de dopamina del SNC, sensibilidad a fármacos, eczema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por virus de epstein-barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y cerebelares, linfohistiocitosis hematofagocítica familiar, rechazo de implante del timo fetal, Ataxia de Friedreich, trastornos arteriales periféricos funcionales, sepsis fúngica, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, sepsis gram negativa, sepsis gram positiva, granulomas debido a organismos intracelulares, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hallerrorden-Spatz, tiroiditis de hashimoto, fiebre del heno, rechazo de trasplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, púrpura trombocitopénica trombolítica/síndrome urémico hemolítico, hemorragia, hepatitis (A), arritmias de haz His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimiento hipercinático, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis por

hipersensibilidad, hipertensión, trastornos del movimiento hipocinético, evaluación del eje hipotalámico-pituitaria-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpo, Astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza a, exposición a radiación ionizante, neuritis iridociclitis/uveítis/óptica, lesión por isquemia-reperfusión, apoplejía isquémica, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo de trasplante de riñón, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo de trasplante de hígado, linfedema, malaria, Linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococemia, enfermedades metabólicas/idiopáticas, cefalea por migraña, mitocondrial, trastorno de sistemas múltiples, enfermedad de tejido conjuntivo mezclada, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, mycobacterium avium intracellulare, mycobacterium tuberculosis, síndrome mielodisplásico, infarto al miocardio, trastornos isquémicos miocárdicos, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofias musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma no de hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos arteriales oclusivos, terapia de okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos inversos de vasectomía/orquitis, organomegalia, osteoporosis, rechazo de trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad, rechazo de trasplante de paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad

pericardiaca, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía por pneumocystis carinii, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal, y síndrome de cambios de la piel), síndrome de post-perfusión, síndrome de post-bomba, síndrome de cardiotomía post-MI, preeclampsia, parálisis de supranúcleo progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación, Enfermedad y fenómeno de Raynaud, enfermedad de Raynoud, enfermedad de Refsum, taquicardia de QRS estrecha regula, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, Demencia senil de tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, apoplejía, anemia por células falciformes, rechazo de aloinjerto de piel, síndrome de cambios de la piel, rechazo de trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelares, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, Síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafilaxis sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumatoide juvenil sistémica, células T o FAB ALL, Telangiectasia, tromboangitis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, trauma/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades cardiacas valvulares, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, meningitis aséptica/encefalitis vital, síndrome hemafagocítico vital asociado, síndrome de Wemicke-Korsakoff, enfermedad de Wilson, rechazo de aloinjerto de cualquier órgano o tejido. (ver

Publicaciones PCT Nos. WO2002097048, WO9524918, y WO00/56772A1).

Las DVD-Igs de la invención también pueden tratar una o más de las siguientes enfermedades: Síndromes coronarios agudos, Polineuritis Idiopática Aguda, Polirradiculoneuropatía Desmielinizante Inflamatoria Aguda, Isquemia aguda, Enfermedad de Still de Adulto, Alopecia areata, Anafilaxis, Síndrome de Anticuerpo Anti-fosfolípido, anemia aplásica, arterioesclerosis, eczema atópica, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con infección estreptocócica, hearingloss autoinmune, Síndrome Linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, trombocitopenia autoinmune (AITP), Blefaritis, bronquiectasis, penfigoide bulloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolípido catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, Penfigoide cicatricial, síndrome clínicamente aislado (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno siquiátrico de comienzo infantil, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, diabetes mellitus, hernia de disco, prolapso de disco, anemia hemolítica inmune inducida por fármaco, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, Episcleritis, Eritema multiforme, eritema multiforme mayor, penfigoide gestacional, síndrome de Guillain-Barré (GBS), fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad de Parkinson idiopática, neumonía intersticial idiopática, Alergia mediada por IgE, anemia hemolítica inmune, miositis de cuerpo de inclusión, enfermedad inflamatoria ocular infecciosa, enfermedad desmielinizante inflamatoria, enfermedad cardiaca inflamatoria, Enfermedad renal inflamatoria, IPF/UIP, iritis, queratitis, queratojuntivitis sicca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, histiocitosis de células de

Langerhan, livedo reticularis, degeneración macular, malignidades, poliangeítis microscópica, morbus bechterev, trastornos de neuronas motoras, Penfigoide de membrana mucosa, insuficiencia de múltiples órganos, miastenia grave, síndrome mielodisplásico, miocarditis, trastorno de raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis no A no B, Neuritis óptica, osteólisis, cáncer de ovarios, JRA pauciarticular, enfermedad oclusiva de arteria periférica (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad de arteria periférica (PAD), Flebitis, poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), policondritis, polimialgia reumática, poliosis, JRA poliarticular, síndrome de deficiencia poliendocrina, polimiositis, polimialgia reumática (PMR), síndrome post-bomba, Parkinsonismo primario, cáncer de próstata y rectal y malignidades hematopoyéticas (leucemia y linfoma), prostatitis, aplasia de glóbulos rojos puros, Insuficiencia adrenal primaria, neuromielitis óptica recurrente, restenosis, enfermedad cardiaca reumática, safo (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostotis, y osteítis), escleroderma, amiloidosis secundaria, Choque pulmonar, escleritis, ciática, insuficiencia adrenal secundaria, enfermedad de tejido conjuntivo asociada con silicona, dermatosis de sneddon-wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrólisis epidérmica tóxica, mielitis transversal, TRAPS (receptor de factor de necrosis de tumor, Reacción alérgica tipo I, diabetes tipo II, urticaria, neumonía intersticial usual (UIP), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome de VKH), degeneración macular húmeda, y cicatrización de heridas.

Las proteínas de enlace de la invención se pueden usar para tratar humanos que sufren de enfermedades autoinmunes, en particular aquellas

asociadas con inflamación, incluyendo artritis reumatoide, espondilitis, alergia, diabetes autoinmune, uveítis autoinmune. En una modalidad, las proteínas de enlace de la invención o porciones de las mismas de enlace al antígeno, se usan para tratar artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de insulina y psoriasis.

En una modalidad, las enfermedades que se pueden tratar o diagnosticar con las composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, cánceres primarios y metastásicos, que incluyen 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 el cuello uterino, útero, y ovarios, así como coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestacional), tracto genital masculino (incluyendo próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de células germinales), glándulas endocrinas (incluyendo las glándulas tiroides, suprarrenal y pituitaria), y piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluidos los derivados de hueso y tejidos blandos, así como el sarcoma de Kaposi), tumores del cerebro, nervios, ojos y meninges (incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, schwannomas y meningiomas), tumores sólidos derivados de tumores malignos hematopoyéticos tales como leucemias, y linfomas (tanto linfomas de Hodgkin y no Hodgkin).

En una modalidad, los anticuerpos de la invención o porciones de los mismos de enlace al antígeno, se usan para tratar cáncer o en la prevención o inhibición de metástasis de los tumores descritos en la presente ya sea cuando se

usan solos o en combinación con radioterapia y/u otros agentes quimioterapéuticos.

En otra modalidad, una DVD-Ig de la invención enlaza un agente profiláctico o terapéutico y una proteína celular, proporcionando de este modo el suministro del fármaco localizado a un órgano objetivo específico, tejido o célula, o clase de tejidos o células. En una modalidad, la DVD-Ig se enlaza a un antígeno de superficie celular y un agente profiláctico o terapéutico. El agente profiláctico o agente terapéutico es útil para prevenir, manejar, tratar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, por ejemplo, partículas liposómicas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, células madre, endocitosis mediada por el receptor (véase, por ejemplo, Wu and Wu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432), péptido, ácido nucleico (por ejemplo, ARN o DND antisentido u otra terapia genética), ácido nucleico de péptido (PNA), nanopartícula, agente radioterapéutico, retroviral u otro vector, agente antibacteriano, antiviral, antiparasitario, o antifúngico, agentes antineoplásicos, agente quimioterapéutico, tal como agentes de alquilación de ADN, cisplatina, carboplatina, agentes anti-tubulina, paclitaxel, docetaxel, taxol, doxorrubicina, gemcitabina, gemzar, antraciclinas, adriamicina, inhibidores de topoisomerasa I, inhibidores de topoisomerasa II, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, irinotecán, inhibidores de la tirosina cinasa del receptor (por ejemplo, erlotinib, gefitinib), inhibidores de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), inhibidores de la cinasa, y siRNAs, fármacos antiinflamatorios supresores de citocina (CSAIDs).

En una modalidad, las DVD-Igs de la invención unen a metotrexato,

6-MP, azatioprina sulfasalazina, mesalazina, olsalazina cloroquinina/hidroxicloroquina, penicilamina, aurotiomalato, azatioprina, colchicina, corticosteroides, agonistas adrenorreceptores beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeteral), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromil, ketotifeno, ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citocinas proinflamatorias tales como inhibidores de la enzima que convierte TNF-α o IL-l (por ejemplo, IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de cinasa MAP), inhibidores de la enzima que convierte IL-1b, inhibidores de la enzima que convierte TNFá (TACE), inhibidores de la señalización de células T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima que convierte la angiotensina, receptores solubles de citocina y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores de TNF p55 o p75 solubles y los derivados p75TNFRIgG (EnbrelTM y p55TNFRIgG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), factores de crecimiento, citocinas, proteínas citotoxi (por ejemplo, TNF), citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-l0, IL-11, IL-13 y TGFβ), 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 de sodio de oro, aspirina, acetónido de triamcinolona, propoxifeno napsilato/apap, ácido fólico, nabumetona, diclofenaco, piroxicam, etodolac,

diclofenaco sódico, oxaprozina, oxicodona hcl, bitartrato de hidrocodona/apap, diclofenaco sódico/misoprostol, fentanilo, anakinra, recombinante humano, tramadol hcl, salsalato, sulindac, cianocobalamina/fa/piridoxina, acetaminofeno, alendronato de sodio, prednisolona, sulfato de morfina, clorhidrato de lidocaína, indometacina, glucosamina sulf/condroitina, amitriptilina hcl, sulfadiazina, oxicodona hcl/acetaminofeno, olopatadina hcl, misoprostol, naproxeno sódico, omeprazol, ciclofosfamida, rituximab, IL-l TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, anti-IL-18, anti-ILl5, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, Roflumilast, IC-485, CDC-801, y Mesopram.

En otra modalidad, la DVD-lg de la invención se une a fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs); fármacos antiinflamatorios supresores de citosina (CSAIDs); anticuerpos o derivados o conjugados de los mismos [por ejemplo, CDP-571/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNFa humanizado; Celltech/Bayer); cA2/infliximab (anticuerpo anti-TNFa quimérico; Centocor); 75 kdTNFR-lgG/etanercept (proteína de fusión de lgG del receptor de TNF de 75 kD; Immunex); 55 kdTNF-lgG (proteína de fusión de lgG – receptor de TNF 55 kD; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.l/SB 210396 (anticuerpo anti-CD4 primatizado que no se agotan; IDEC/SmithKline; DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteína de fusión IL-2; Seragen); Anti-Tac (anti-IL-2Ra humanizado; Protein Design Labs/Roche)]; IL-4 (citosina antiinflamatoria; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante, citosina antiinflamatoria; DNAX/Schering); IL-4; agonistas IL-10 y/o IL-4 (por ejemplo, anticuerpos agonistas); IL-1RA (antagonista del receptor IL-1; Synergen/Amgen); anakinra (Kineret®/Amgen); TNF-bp/s-TNF (proteína de enlace de TNF soluble); R973401 (inhibidor de fosfodiesterasa Tipo IV); MK-966 (Inhibidor de COX-2); Iloprost; metotrexato; talidomida y fármacos relacionados con talidomida (por ejemplo, Celgen); leflunomida (inhibidor de cirtocina y antiinflamatorio); ácido tranexámico

(inhibidor de activación de plasminógeno); T-614 (inhibidor de citocina); prostaglandina E1); Tenidap (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Naproxeno (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Meloxicam (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Ibuprofeno (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Piroxicam (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Diclofenaco (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Indometacina (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Sulfasalazina; Azatioprina); inhibidor de ICE (inhibidor de la enzima que convierte la enzima interleucina-1b); zap-70 y/o inhibidor de lck (inhibidor de tirosina cinasa zap-70 o lck); inhibidor de VEGF y/o inhibidor de VEGF-R (inhibidores del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares o receptor del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares; inhibidores de angiogénesis); fármacos antiinflamatorios corticosteroides (por ejemplo, SB203580); inhibidores de TNF- convertasa; anticuerpos anti-IL-12 o anti-IL-18 o derivados o conjugados de los mismos; inhibidores de interleucina-11; interleucina-13; interleucina-17; oro; penicilamina; cloroquina; clorambucilo; hidroxicloroquina; ciclosporina; ciclofosfamida; irradiación total linfoide; globulina anti-timocito o anticuerpos anti-CD4 o derivados o conjugados de los mismos; CD5-toxinas; colágeno y péptidos administrados oralmente; lobenzarit disódico; Agentes Reguladores de Citocina (CRAs) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); oligodesoxinucleótidos de fosforotioato antisentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 de complemento soluble (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; polisulfato de glicosaminoglicano; minociclina; anticuerpos anti-IL2R o derivados o conjugados de los mismos; lípidos botánicos y marinos (ácidos grasos de pescado y semilla 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-clorodesoxiadenosina); metotrexato; inhibidores bcl-2

(véase Bruncko et al. (2007) J. Med. Chem. 50(4):641-662); agentes moduladores inmunes y antivirales.

En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a uno de los siguientes agentes para el tratamiento de la artritis reumatoide, por ejemplo, inhibidor de moléculas pequeñas de KDR, inhibidor de moléculas pequeñas 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; acetónido de triamcinolona; napsilato de propoxifeno/apap; folato; nabumetona; diclofenaco; piroxicam; etodolaco; diclofenaco sódico; oxaprozina; clorhidrato de oxicodona; bitartrato de hidrocodona/apap; diclofenaco sódico/misoprostol; fentanilo; anakinra, recombinante humano; clorhidrato de tramadol; salsalato; sulindaco; cianocobalamina/fa/piridoxina; acetaminofeno; alendronato sódico; 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 sódico; omeprazol; micofenolato mofetil; ciclofosfamida; rituximab o derivados o conjugados de los mismos; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-Ig o derivados o conjugados de los mismos; IL-18 BP; IL-12/23; anti-IL 18 o derivados o conjugados de las mismas; anti-IL 15 o derivados o conjugados de la misma; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; Roflumilast; IC-485; CDC-801; y mesopram.

En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes

terapéuticos para padecimiento inflamatorio intestinal, por ejemplo, budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticoesteroides; ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipoxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxanos; antagonistas del receptor de IL-1; anti-IL-1b mAbs o derivados o conjugados del mismo; anti-IL-6 mAbs o derivados o conjugados del mismo; factores de crecimiento; inhibidores de elastasa; compuestos piridinilo-imidazol; anticuerpos para o antagonistas de otros factores de crecimiento o citocinas humanas, 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 modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69 como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticoesteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasas, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización mediante citocinas proinflamatorias tales como TNFa o IL-1 (por ejemplo, IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de MAP cinasa), inhibidores de la enzima de conversión de IL-1b, inhibidores de la enzima de conversión de TNFa, inhibidores de la señalización de las células T tales como inhibidores de cinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina, receptores de citocinas solubles y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-

6R) y citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFb) e inhibidores de bcl-2.

En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para padecimiento de Crohn, por ejemplo, antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, Adalimumab (Publicación PCT No. WO 97/29131; Humira), CA2 (Remicade), CDP 571, constructos de TNFR-Ig, inhibidores (p75TNFRIgG (Enbrel) y p55TNFRIgG (Lenercept)) o derivados o conjugados de los mismos e inhibidores de PDE4. En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a corticoesteroides, por ejemplo, budenosida y dexametasona. En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico y olsalazina, y agentes que interfieren con la síntesis o acción de las citocinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de la enzima de conversión de IL-1b e IL-1ra. En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a inhibidores de la señalización de las células T, por ejemplo, los inhibidores de tirosina cinasa 6-mercaptopurinas. En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a IL-11. En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a mesalamina, prednisona, azatioprina, mercaptopurina, infliximab o derivados o conjugados de los mismos, succinato sódico de metilprednisolona, 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/sucrosa, clorhidrato de ciprofloxacina, sulfato de hiosciamina, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de oxicodona/acetaminofeno, clorhidrato de prometazina, fosfato de sodio,

sulfametoxazol/trimetoprima, celecoxib, policarbofilo, napsilato de propoxifeno, hidrocortisona, multivitaminas, balsalazida disódica, fosfato de codeína/apap, clorhidrato de colesevelam, cianocobalamina, ácido fólico, levofloxacina, metilprednisolona, natalizumab o derivados o conjugados de los mismos e interferón-alfa, interferón-beta, e interferón-gamma.

En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para esclerosis múltiple, por ejemplo, corticoesteroides; 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 para o antagonistas de otros factores de crecimiento o citocinas humanas 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 modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a 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. En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticoesteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasas, agonistas de adensosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la

señalización mediante citocinas proinflamatorias tales como TNFα o IL-1 (por ejemplo, IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de MAP cinasa), inhibidores de la enzima de conversión de IL-1β, inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de las células T tales como inhibidores de cinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina, receptores de citocinas solubles y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-13 y TGFβ) e inhibidores de bcl-2.

En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para esclerosis múltiple, por ejemplo, interferón-b, por ejemplo, IFNb1a e IFNb1b; copaxone, corticoesteroides, inhibidores de caspasas, por ejemplo inhibidores de caspasa-1, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF, y anticuerpos para CD40 y CD80, y derivados o conjugados de los mismos.

En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza 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-inmunocina NNSO3, ABR-215062, AnergiX.MS, antagonistas del receptor de quimiocina, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulada en liposoma), THC.CBD (agonista cannabinoide) 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 modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para Angina, por ejemplo, nitroglicerina, mononitrato de isosorbida, succinato de metoprolol, atenolol, tartrato de metoprolol, besilato de amlodipino, clorhidrato de diltiazem, dinitrato de isosorbida, bisulfato de clopidogrel, nifedipina, atorvastatina cálcica, cloruro de potasio, furosemida, simvastatina, clorhidrato de verapamilo, digoxina, clorhidrato de propranolol, carvedilol, lisinopril, espironolactona, hidroclorotiazida, maleato de enalapril, nadolol, ramipril, enoxaparina sódica, heparina sódica, valsartan, clorhidrato de sotalol, fenofibrato, ezetimiba, bumetanida, losartan potásico, lisinopril/hidroclorotiazida, felodipina, captopril, fumarato de bisoprolol.

En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para Espondilitis Anquilosante, por ejemplo, ibuprofeno, diclofenaco y misoprostol, naproxeno, meloxicam, indometacina, diclofenaco, celecoxib, rofecoxib, Sulfasalazina, Metotrexato, azatioprina, minociclina, prednisona, etanercept, infliximab, y derivados o conjugados de los mismos

En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para Asma, por ejemplo, albuterol, salmeterol/fluticasona, montelukast sódico, propionato de fluticasona, budesonida, prednisona, xinafoato de salmeterol, clorhidrato de levalbuterol, sulfato de albuterol/ipratropio, fosfato sódico de prednisolona, acetónido de triamcinolona, dipropionato de beclometasona, bromuro de ipratropio, azitromicina, acetato de pirbuterol, prednisolona, teofilina anhidra, succinato sódico de metilprednisolona, claritromicina, zafirlukast, fumarato de formoterol, vacuna del virus de influenza, metilprednisolona, trihidrato de

amoxicilina, flunisolida, inyección contra la alergia, cromolina sódica, clorhidrato de fexofenadina, flunisolida/mentol, amoxicilina/clavulanato, levofloxacina, dispositivo de asistencia del inhalador, guaifenesina, fosfato sódico de dexametasona, clorhidrato de moxifloxacina, 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, clorhidrato de cetirizina/pseudoefed, fenilefrina/cod/prometazina, codeína/prometazina, cefprozil, dexametasona, guaifenesina/pseudoefedrina, clorfeniramina/hidrocodona, nedocromil sódico, sulfato de terbutalina, epinefrina, metilprednisolona, sulfato de metaproterenol.

En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para COPD, por ejemplo, sulfato de albuterol/ipratropio, bromuro de ipratropio, salmeterol/fluticasona, albuterol, xinafoato de salmeterol, propionato de fluticasona, prednisona, teofilina anhidra, succinato sódico de metilprednisolona, montelukast sódico, budesonida, fumarato de formoterol, acetónido de triamcinolona, levofloxacina, guaifenesina, azitromicina, dipropionato de beclometasona, clorhidrato de levalbuterol, 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 modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para HCV, por ejemplo, Interferón-alfa-2a, Interferón-alfa-2b,

Interferón-alfa con1, Interferón-alfa-n1, interferón-alfa-2a pegilado, interferón-alfa-2b pegilado, ribavirina, Peginterferón alfa-2b + ribavirina, Ácido Ursodesoxicólico, Ácido Glicirrícico, Timalfasina, Maxamina, VX-497 y cualquier compuesto que se utilice para tratar HCV a través de la intervención con los siguientes objetivos: polimerasa HCV, proteasa HCV, helicasa HCV, HCV IRES (sitio de entrada al ribosoma interno) .

En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para Fibrosis Pulmonar Idiopática, por ejemplo, prednisona, azatioprina, albuterol, colchicina, sulfato de albuterol, digoxina, interferón gamma, succinato sódico de metilprednisolona, lorazepam, furosemida, lisinopril, nitroglicerina, espironolactona, ciclofosfamida, bromuro de ipratropio, actinomicina d, alteplasa, propionato de fluticasona, levofloxacina, sulfato de metaproterenol, sulfato de morfina, clorhidrato de oxicodona, cloruro de potasio, acetónido de triamcinolona, tacrolimus anhidro, calcio, interferón-alfa, metotrexato, micofenolato mofetil, Interferón-gamma-1β.

En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para Infarto del 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 isosorbida, digoxina, furosemida, simvastatina, ramipril, tenecteplasa, maleato de enalapril, torsemida, retavasa, losartan potásico, clorhidrato de quinapril/carb mag, bumetanida, alteplasa, enalaprilato, clorhidrato de amiodarona, m-hidrato de clorhidrato de tirofiban, clorhidrato de diltiazem, captopril, irbesartan, valsartan, clorhidrato de propranolol, fosinopril sódico,

clorhidrato de lidocaína, eptifibatida, cefazolina sódica, sulfato de atropina, ácido aminocaproico, espironolactona, interferón, clorhidrato de sotalol, cloruro de potasio, docusato sódico, clorhidrato de dobutamina, alprazolam, pravastatina sódica, atorvastatina cálcica, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de meperidina, dinitrato de isosorbida, epinefrina, clorhidrato de dopamina, bivalirudina, rosuvastatina, ezetimiba/simvastatina, avasimiba, cariporida, células madre cardiacas, y factores de crecimiento.

En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para Psoriasis, por ejemplo, un inhibidor de moléculas pequeñas de KDR, inhibidor de moléculas pequeñas de Tie-2, calcipotrieno, propionato de clobetasol, acetónido de triamcinolona, propionato de halobetasol, tazaroteno, metotrexato, fluocinonida, dipropionato aumentado de betametasona, acetónido de fluocinolona, acitretina, champú de alquitrán, valerato de betametasona, furoato de mometasona, ketoconazol, pramoxina/fluocinolona, valerato de hidrocortisona, flurandrenólido, urea, betametasona, propionato de clobetasol/emol, propionato de fluticasona, azitromicina, hidrocortisona, fórmula humectante, ácido fólico, desonida, pimecrolimus, alquitrán de hulla, diacetato de diflorasona, folato de etanercept, ácido láctico, metoxsaleno, hc/bismuto subgal/znox/resor, acetato de metilprednisolona, prednisona, filtro solar, halcinonida, ácido salicílico, antralina, pivalato de clocortolona, extracto de hulla, alquitrán de hulla/ácido salicílico, alquitrán de hulla/ácido salicílico/azufre, desoximetasona, diazepam, emoliente, fluocinonida/emoliente, aceite mineral/aceite de ricino/lact na, aceite mineral/aceite de cacahuete, petróleo/misristato de isopropilo, psoraleno, ácido salicílico, jabón/tribromsalan, timerosal/ácido bórico, celecoxib, infliximab, ciclosporina,

alefacept, efalizumab, tacrolimus, pimecrolimus, PUVA, UVB, sulfasalazina.

En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para Artritis Psoriásica, por ejemplo, metotrexato, etanercept, rofecoxib, celecoxib, ácido fólico, sulfasalazina, naproxeno, leflunomida, acetato de metilprednisolona, indometacina, sulfato de hidroxicloroquina, prednisona, sulindaco, dipropionato aumentado de betametasona, infliximab, metotrexato, folato, acetónido de triamcinolona, diclofenaco, dimetilsulfóxido, piroxicam, diclofenaco sódico, ketoprofeno, meloxicam, metilprednisolona, nabumetona, tolmetina sódica, calcipotrieno, ciclosporina, diclofenaco sódico/misoprostol, fluocinonida, sulfato de glucosamina, tiomalato sódico de oro, bitartrato de hidrocodona/apap, ibuprofeno, risedronato sódico, sulfadiazina, tioguanina, valdecoxib, alefacept, efalizumab e inhibidores de bcl-2, o derivados o conjugados de los mismos.

En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para Restenosis, por ejemplo, sirolimus, paclitaxel, everolimus, tacrolimus, Zotarolimus, acetaminofeno.

En otra modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes terapéuticos para Ciática, por ejemplo, bitartrato de hidrocodona/apap, rofecoxib, clorhidrato de ciclobenzaprina, metilprednisolona, naproxeno, ibuprofeno, clorhidrato de oxicodona/acetaminofeno, celecoxib, valdecoxib, acetato de metilprednisolona, prednisona, fosfato de codeína/apap, clorhidrato de tramadol/acetaminofeno, metaxalona, meloxicam, metocarbamol, clorhidrato de lidocaína, diclofenaco sódico, gabapentina, dexametasona, carisoprodol, ketorolaco trometamina, indometacina, acetaminofeno, diazepam, nabumetona,

clorhidrato de oxicodona, clorhidrato de tizanidina, diclofenaco sódico/misoprostol, napsilato de propoxifeno/apap, asa/oxicod/ter de oxicodona, ibuprofeno/bit de hidrocodona, clorhidrato de tramadol, etodolaco, clorhidrato de propoxifeno, clorhidrato de amitriptilina, carisoprodol/fos de codeína/asa, sulfato de morfina, multivitaminas, naproxeno sódico, citrato de orfenadrina, temazepam.

En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a agentes para SLE (Lupus), por ejemplo, NSAIDS, por ejemplo, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, piroxicam, indometacina; inhibidores de COX2, por ejemplo, Celecoxib, rofecoxib, valdecoxib; antimaláricos, por ejemplo, hidroxicloroquina; Esteroides, por ejemplo, prednisona, prednisolona, budenosida, dexametasona; citotóxicos, por ejemplo, azatioprina, ciclofosfamida, micofenolato mofetil, metotrexato; inhibidores de PDE4 o inhibidor de la síntesis de purina, por ejemplo Cellcept. En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, olsalazina, Imuran y agentes que interfieren con la síntesis, producción o acción de las citocinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de caspasas como los inhibidores de la enzima de conversión de IL-1b e IL-1ra. En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a inhibidores de la señalización de las células T, por ejemplo, inhibidores de tirosina cinasa; o moléculas que tienen como objetivo las moléculas de activación de las células T, por ejemplo, CTLA-4-Ig o anticuerpos de la familia B7, o la familia PD-1. En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza a IL-11 o anticuerpos anti-citocina, por ejemplo, fonotolizumab (anticuerpo anti-IFNg), o anticuerpos anti-receptores, por ejemplo, anticuerpo anti-receptor de IL-6 y anticuerpos para las moléculas de la superficie de las células B. En una modalidad, la DVD-Ig de la invención se enlaza

a LJP 394 (abetimus), agentes que agotan o inactivan las células B, por ejemplo, anticuerpo anti-CD20, y BlyS, inhibidores de bcl-2 y TNF, debido a que se ha demostrado que la sobreexpresión de bcl-2 en ratones transgénicos causa un fenotipo similar al lupus (véase Marquina et al. (2004) J. Immunol. 172(11):7177-7185), por lo tanto, se espera que la inhibición tenga efectos terapéuticos.

Los anticuerpos de la invención, o las porciones de enlace al antígeno de los mismos, se pueden combinar con agentes que incluyen pero no se limitan a, agentes antineoplásicos, radioterapia, quimioterapia tal como agentes alquilantes de ADN, cisplatino, carboplatino, agentes anti-tubulina, paclitaxel, docetaxel, taxol, doxorubicina, gemcitabina, gemzar, antraciclinas, adriamicina, inhibidores de topoisomerasa I, inhibidores de topoisomerasa II, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, irinotecan, inhibidores de tirosina cinasa del receptor (por ejemplo, erlotinib, gefitinib), inhibidores de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), inhibidores de cinasa, y ARNsi's.

Una proteína de enlace de la invención también se puede administrar con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles en el tratamiento de diversos padecimientos.

Una proteína de enlace de la invención se puede utilizar sola o en combinación para tratar tales padecimientos. Se debe entender las proteínas de enlace se pueden utilizar solas o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, dicho agente adicional que selecciona por el artesano experto para su propósito pretendido. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en el arte como útil para tratar el padecimiento o la condición que se trata por el anticuerpo de la presente invención.

El agente adicional también puede ser un agente que imparta un atributo benéfico a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que afecte la viscosidad de la composición.

Se debe entender además que las combinaciones que se van a incluir en esta invención son aquellas combinaciones útiles para el propósito deseado. Los agentes establecidos debajo son ilustrativos y no pretenden ser limitados. Las combinaciones, que son parte de esta invención, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado de las listas de abajo. 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 formada puede realizar su función pretendida.

Las combinaciones para tratar los padecimientos autoinmunes e inflamatorios son fármacos anti-inflamatorios no esteroideos también referidos como NSAIDS que incluyen fármacos como el ibuprofeno. Otras combinaciones son corticoesteroides que incluyen prednisolona; los efectos secundarios bien conocidos del uso de esteroides se pueden reducir o incluso eliminar reduciendo la dosis de esteroides requerida cuando se tratan pacientes en combinación con las DVD Igs de esta invención. Ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la artritis reumatoide con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: fármacos anti-inflamatorios supresores de citocina (CSAIDs); anticuerpos para o antagonistas de otros factores de crecimiento o citocinas humanas, 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 enlace de la invención, o las porciones de enlace

al antígeno de las mismas, se pueden combinar con anticuerpos para las 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 los agentes terapéuticos puede interferir en diferentes puntos en la cascada autoinmune e inflamatoria subsiguiente; los ejemplos incluyen antagonistas de TNF como anticuerpos TNF quiméricos, humanizados o humanos, Adalimumab, (Publicación PCT No. WO 97/29131), CA2 (Remicade™), CDP 571, y receptores de TNF p55 o p75 solubles, derivados de los mismos, (p75TNFRIgG (Enbrel™) o p55TNFRIgG (Lenercept), y también inhibidores de la enzima de conversión de TNFα (TACE); similarmente los inhibidores de IL-1 (inhibidores de la enzima de conversión de Interleucina 1, IL-1RA etc.) pueden ser efectivos por la misma razón. Otras combinaciones incluyen interleucina 11. Todavía otra combinación incluye actores clave de la respuesta autoinmune que pueden actuar en paralelo a, dependiente de o en concierto con la función de IL-12; son especialmente antagonistas de IL-18 incluyendo anticuerpos IL-18 o receptores solubles de IL-18, o proteínas de enlace a IL-18. Se ha demostrado que la IL-12 y la IL-18 tienen funciones solapantes pero distintas y puede ser más efectiva una combinación de antagonistas para ambas. Todavía otra combinación son los inhibidores anti-CD4 no agotadores. Otras combinaciones adicionales incluyen antagonistas de la ruta co-estimuladora CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) incluyendo anticuerpos, receptores solubles o ligandos antagónicos.

Las proteínas de enlace de la invención también se pueden combinar con agentes, tales como metotrexato, 6-MP, azatioprina, sulfasalazina, mesalazina,

olsalazina cloroquinina/hidroxicloroquina, pencilamina, aurotiomalato (intramuscular y oral), azatioprina, colchicina, corticoesteroides (orales, inhalados e inyección local), agonistas del adrenoreceptor beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeteral), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromil, cetotifeno, ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticoesteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasas, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización mediante citocinas proinflamatorias tales como TNF-α o IL-1 (por ejemplo, IRAK, NIK, IKK , p38 o inhibidores de MAP cinasa), inhibidores de la enzima de conversión de IL-1β, inhibidores de la enzima de conversión de TNFα (TACE), inhibidores de la señalización de las células T tales como inhibidores de cinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina, receptores de citocinas solubles y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores de TNF p55 o p75 solubles y los derivados p75TNFRIgG (Enbrel™ y p55TNFRIgG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ), celecoxib, ácido fólico, sulfato de hidroxicloroquina, rofecoxib, etanercept, infliximab, naproxeno, valdecoxib, sulfasalazina, metilprednisolona, meloxicam, acetato de metilprednisolona, tiomalato sódico de oro, aspirina, acetónido de triamcinolona, napsilato de propoxifeno/apap, folato, nabumetona, diclofenaco, piroxicam, etodolaco, diclofenaco sódico, oxaprozina, clorhidrato de oxicodona, bitartrato de hidrocodona/apap, diclofenaco sódico/misoprostol, fentanilo, anakinra,

recombinante humano, clorhidrato de tramadol, salsalato, sulindaco, cianocobalamina/fa/piridoxina, acetaminofeno, alendronato sódico, prednisolona, sulfato de morfina, clorhidrato de lidocaína, indometacina, sulfato de glucosamina/condroitina, clorhidrato de amitriptilina, sulfadiazina, clorhidrato de oxicodona/acetaminofeno, clorhidrato de olopatadina, misoprostol, naproxeno sódico, omeprazol, ciclofosfamida, rituximab, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, anti-IL-18, Anti-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, Roflumilast, IC-485, CDC-801, y Mesopram. Las combinaciones incluyen metotrexato o leflunomida y en casos de artritis reumatoide moderada o severa, ciclosporina.

Agentes adicionales no limitantes que también se pueden utilizar en combinación con una proteína de enlace para tratar la artritis reumatoide incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs); fármacos anti-inflamatorios supresores de citocina (CSAIDs); CDP-571/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNFα humanizado; Celltech/Bayer); cA2/infliximab (anticuerpo anti-TNFα quimérico; Centocor); 75 kdTNFR-IgG/etanercept (proteína de fusión IgG del receptor de 75 kD TNF; Immunex; (1994) Arthritis & Rheumatism 37:S295; (1996) J. Invest. Med. 44:235A); 55 kdTNF-IgG (proteína de fusión IgG del receptor de 55 kD TNF; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (anticuerpo anti-CD4 primatizado no agotador; IDEC/SmithKline; (1995) Arthrit. Rheum. 38:S185); DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteínas de fusión de IL-2; Seragen; (1993) Arthrit. Rheum. 36:1223); Anti-Tac (anti-IL-2Rα humanizada; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (citocina anti-inflamatoria; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante, citocina anti-

inflamatoria; DNAX/Schering); agonistas de IL-4; 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 enlace a TNF soluble; (1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S284; (1995) Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology 268:37-42); R973401 (inhibidor de fosfodiesterasa Tipo IV; (1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S282); MK-966 (Inhibidor de COX-2; (1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S81); Iloprost ((1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S82); metotrexato; talidomida ((1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S282) y fármacos relacionados a la talidomida (por ejemplo, Celgen); leflunomida (inhibidor de citocina y anti-inflamatorio; (1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S131; (1996) Inflammation Research 45:103-107); ácido tranexámico (inhibidor de la activación del plasminógeno; (1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S284); T-614 (inhibidor de citocina; (1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S282); prostaglandina E1 ((1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S282); Tenidap (fármaco anti-inflamatorio no esteroideo; (1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S280); Naproxeno (fármaco anti-inflamatorio no esteroideo; (1996) Neuro Report 7:1209-1213); Meloxicam (fármaco anti-inflamatorio no esteroideo); Ibuprofeno (fármaco anti-inflamatorio no esteroideo); Piroxicam (fármaco anti-inflamatorio no esteroideo); Diclofenaco (fármaco anti-inflamatorio no esteroideo); Indometacina (fármaco anti-inflamatorio no esteroideo); Sulfasalazina ((1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S281); Azatioprina ((1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S281); inhibidor de ICE (inhibidor de la enzima de conversión de interleucina-1β de enzima); inhibidor de lck y/o zap-70 (inhibidor de la tirosina cinasa lck o zap-70); inhibidor de VEGF y/o inhibidor de

VEGF-R (inhibidores del factor de crecimiento de las células endoteliales vasculares o del receptor del factor de crecimiento de las células endoteliales vasculares; inhibidores de angiogénesis); fármacos anti-inflamatorios corticoesteroides (por ejemplo, SB203580); inhibidores de la convertasa de TNF; anticuerpos anti-IL-12; anticuerpos anti-IL-18; interleucina-11 ((1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S296); interleucina-13 ((1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S308); inhibidores de interleucina -17 (véase por ejemplo, (1996) Arthrit. Rheum. 39 (9; suplemento): S120); oro; penicilamina; cloroquina; clorambucilo; hidroxicloroquina; ciclosporina; ciclofosfamida; irradiación linfoide total; globulina anti-timocito; anticuerpos anti-CD4; toxinas de CD5; péptidos oralmente administrados y colágeno; lobenzarit disódico; Agentes de Regulación de Citocina (CRAs) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); oligo-desoxinucleótidos de fosforotioato antisentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 de complemento soluble (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; polisulfato de glicosaminoglicano; minociclina; anticuerpos anti-IL2R; lípidos marinos y botánicos (ácidos grasos de pescado y semillas de plantas; DeLuca et al. (1995) Rheum. Dis. Clin. North Am. 21:759-777); auranofina; fenilbutazona; ácido meclofenámico; ácido flufenámico; inmunoglobulina intravenosa; zileutón; azaribina; ácido micofenólico (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicina); amiprilosa (terafectina); cladribina (2-clorodesoxiadenosina); metotrexato; inhibidores de bcl-2 (Bruncko et al.(2007) J. Med. Chem. 50(4):641-662); antivirales y agentes de modulación inmune.

En una modalidad, la proteína de enlace o porción de enlace al antígeno de la misma, 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; leflunomida; naproxeno; valdecoxib; sulfasalazina; metilprednisolona; ibuprofeno; meloxicam; acetato de metilprednisolona; tiomalato sódico de oro; aspirina; azatioprina; acetónido de triamcinolona; napsilato de propoxifeno/apap; folato; nabumetona; diclofenaco; piroxicam; etodolaco; diclofenaco sódico; oxaprozina; clorhidrato de oxicodona; bitartrato de hidrocodona/apap; diclofenaco sódico/misoprostol; fentanilo; anakinra, recombinante humano; clorhidrato de tramadol; salsalato; sulindaco; cianocobalamina/fa/piridoxina; acetaminofeno; alendronato sódico; 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 sódico; omeprazol; micofenolato mofetil; ciclofosfamida; rituximab; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-IG; IL-18 BP; IL-12/23; anti-IL 18; anti-IL 15; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; Roflumilast; IC-485; CDC-801; y mesopram.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para padecimiento inflamatorio intestinal con los que se puede combinar una proteína de enlace de la invención incluyen lo siguiente: budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticoesteroides; ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipoxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxanos; antagonistas del receptor de IL-1; anti-IL-1β mAbs; anti-IL-6 mAbs; factores de crecimiento; inhibidores de

elastasa; compuestos piridinilo-imidazol; anticuerpos para o antagonistas de otros factores de crecimiento o citocinas humanas, 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 enlace al antígeno de los mismos, se pueden combinar con anticuerpos para las 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 enlace al antígeno de los mismos, también se pueden combinar con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticoesteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasas, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización mediante citocinas proinflamatorias tales como TNFα o IL-1 (por ejemplo, IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de MAP cinasa), inhibidores de la enzima de conversión de IL-1β, inhibidores de la enzima de conversión de TNFα, inhibidores de la señalización de las células T tales como inhibidores de cinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina, receptores de citocinas solubles y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) y citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ) e inhibidores de bcl-2.

Ejemplos de agentes terapéuticos para el padecimiento de Crohn en los cuales se puede combinar una proteína de enlace incluyen lo siguiente: antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, Adalimumab (Publicación

PCT No. WO 97/29131; HUMIRA), CA2 (REMICADE), CDP 571, constructos de TNFR-Ig, inhibidores (p75TNFRIgG (ENBREL) y p55TNFRIgG (LENERCEPT)) e inhibidores de PDE4. Los anticuerpos de la invención, o las porciones de enlace al antígeno de los mismos, se pueden combinar con corticoesteroides, por ejemplo, budenosida y dexametasona. Las proteínas de enlace de la invención o las porciones de enlace al antígeno de las mismas, también se pueden combinar con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico y olsalazina, y agentes que interfieren con la síntesis o acción de las citocinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de la enzima de conversión de IL-1β e IL-1ra. Los anticuerpos de la invención o la porción de enlace al antígeno de los mismos también se pueden utilizar con inhibidores de la señalización de las células T, por ejemplo, los inhibidores de tirosina cinasa 6-mercaptopurinas. Las proteínas de enlace de la invención, o las porciones de enlace al antígeno de las mismas, se pueden combinar con IL-11. Las proteínas de enlace de la invención, o las porciones de enlace al antígeno de las mismas, se pueden combinar con mesalamina, prednisona, azatioprina, mercaptopurina, infliximab, succinato sódico de metilprednisolona, 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/sucrosa, clorhidrato de ciprofloxacina, sulfato de hiosciamina, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de oxicodona/acetaminofeno, clorhidrato de prometazina, fosfato de sodio, sulfametoxazol/trimetoprima, 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.

Ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para esclerosis múltiple con los cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen lo siguiente: corticoesteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón-β1a (AVONEX; Biogen); interferón-β1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferón α-n3) (Interferon Sciences/Fujimoto), interferón-α (Alfa Wassermann/J&J), interferón β1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), Peginterferón α 2b (Enzon/Schering-Plough), Copolímero 1 (Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; clabribina; anticuerpos para o antagonistas de otros factores de crecimiento o citocinas humanas 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 enlace de la invención se pueden combinar con anticuerpos para 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 enlace de la invención, también se pueden combinar con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticoesteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasas, agonistas de adensosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización mediante citocinas proinflamatorias tales como TNFα o IL-1 (por ejemplo, IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de MAP cinasa), inhibidores de la

enzima de conversión de IL-1β, inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de las células T tales como inhibidores de cinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina, receptores de citocinas solubles y derivados de los mismos (por ejemplo, receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-13 y TGFβ) e inhibidores de bcl-2.

Ejemplos de agentes terapéuticos para esclerosis múltiple en los cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen interferón-β, por ejemplo, IFNβ1a e IFNβ1b; copaxone, corticoesteroides, inhibidores de caspasas, por ejemplo inhibidores de caspasa-1, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF, y anticuerpos para ligando CD40 y CD80.

Las proteínas de enlace de la invención, también se pueden combinar con agentes, tales como alemtuzumab, dronabinol, Unimed, daclizumab, mitoxantrona, clorhidrato de xaliprodeno, fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinnabidol, a-inmunocina NNSO3, ABR-215062, AnergiX.MS, antagonistas del receptor de quimiocina, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulada en liposoma), THC.CBD (agonista cannabinoide) 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, y agonistas de IL-4.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Angina con los

cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen lo siguiente: aspirina, nitroglicerina, mononitrato de isosorbida, succinato de metoprolol, atenolol, tartrato de metoprolol, besilato de amlodipino, clorhidrato de diltiazem, dinitrato de isosorbida, bisulfato de clopidogrel, nifedipina, atorvastatina cálcica, cloruro de potasio, furosemida, simvastatina, clorhidrato de verapamilo, digoxina, clorhidrato de propranolol, carvedilol, lisinopril, espironolactona, hidroclorotiazida, maleato de enalapril, nadolol, ramipril, enoxaparina sódica, heparina sódica, valsartan, clorhidrato de sotalol, fenofibrato, ezetimiba, bumetanida, losartan potásico, lisinopril/hidroclorotiazida, felodipina, captopril, y fumarato de bisoprolol.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Espondilitis Anquilosante con los cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen lo siguiente: ibuprofeno, diclofenaco y misoprostol, naproxeno, meloxicam, indometacina, diclofenaco, celecoxib, rofecoxib, Sulfasalazina, Metotrexato, azatioprina, minociclina, prednisona, etanercept, e infliximab.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Asma con los cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen lo siguiente: albuterol, salmeterol/fluticasona, montelukast sódico, propionato de fluticasona, budesonida, prednisona, xinafoato de salmeterol, clorhidrato de levalbuterol, sulfato de albuterol/ipratropio, fosfato sódico de prednisolona, acetónido de triamcinolona, dipropionato de beclometasona, bromuro de ipratropio, azitromicina, acetato de pirbuterol, prednisolona, teofilina anhidra, succinato sódico de metilprednisolona, claritromicina, zafirlukast, fumarato de formoterol, vacuna del virus de influenza, metilprednisolona, trihidrato de amoxicilina, flunisolida, inyección

contra la alergia, cromolina sódica, clorhidrato de fexofenadina, flunisolida/mentol, amoxicilina/clavulanato, levofloxacina, dispositivo de asistencia del inhalador, guaifenesina, fosfato sódico de dexametasona, clorhidrato de moxifloxacina, 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, clorhidrato de cetirizina/pseudoefed, fenilefrina/cod/prometazina, codeína/prometazina, cefprozil, dexametasona, guaifenesina/pseudoefedrina, clorfeniramina/hidrocodona, nedocromil sódico, sulfato de terbutalina, epinefrina, metilprednisolona, sulfato de metaproterenol.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para COPD con los cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen lo siguiente: sulfato de albuterol/ipratropio, bromuro de ipratropio, salmeterol/fluticasona, albuterol, xinafoato de salmeterol, propionato de fluticasona, prednisona, teofilina anhidra, succinato sódico de metilprednisolona, montelukast sódico, budesonida, fumarato de formoterol, acetónido de triamcinolona, levofloxacina, guaifenesina, azitromicina, dipropionato de beclometasona, clorhidrato de levalbuterol, 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, y Roflumilast.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para HCV con los

cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen lo siguiente: Interferón-alfa-2a, Interferón-alfa-2b, Interferón-alfa con1, Interferón-alfa-n1, interferón-alfa-2a pegilado, interferón-alfa-2b pegilado, ribavirina, Peginterferón alfa-2b + ribavirina, Ácido Ursodesoxicólico, Ácido Glicirrícico, Timalfasina, Maxamina, VX-497 y cualquier compuesto que se utilice para tratar HCV a través de la intervención con los siguientes objetivos: polimerasa HCV, proteasa HCV, helicasa HCV, HCV IRES (sitio de entrada al ribosoma interno) .

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Fibrosis Pulmonar Idiopática con los cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen lo siguiente: prednisona, azatioprina, albuterol, colchicina, sulfato de albuterol, digoxina, interferón gamma, succinato sódico de metilprednisolona, lorazepam, furosemida, lisinopril, nitroglicerina, espironolactona, ciclofosfamida, bromuro de ipratropio, actinomicina d, alteplasa, propionato de fluticasona, levofloxacina, sulfato de metaproterenol, sulfato de morfina, clorhidrato de oxicodona, cloruro de potasio, acetónido de triamcinolona, tacrolimus anhidro, calcio, interferón-alfa, metotrexato, micofenolato mofetil, Interferón-gamma-1β.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Infarto del Miocardio con los cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen lo siguiente: 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, ramipril, tenecteplasa, maleato de enalapril, torsemida, retavasa, losartan potásico, clorhidrato de quinapril/carb mag, bumetanida, alteplasa, enalaprilato, clorhidrato de amiodarona, m-hidrato de

clorhidrato de tirofiban, clorhidrato de diltiazem, captopril, irbesartan, valsartan, clorhidrato de propranolol, fosinopril sódico, clorhidrato de lidocaína, eptifibatida, cefazolina sódica, sulfato de atropina, ácido aminocaproico, espironolactona, interferón, clorhidrato de sotalol, cloruro de potasio, docusato sódico, clorhidrato de dobutamina, alprazolam, pravastatina sódica, atorvastatina cálcica, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de meperidina, dinitrato de isosorbida, epinefrina, clorhidrato de dopamina, bivalirudina, rosuvastatina, ezetimiba/simvastatina, avasimiba, y cariporida.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Psoriasis con los cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen lo siguiente: inhibidor de moléculas pequeñas de KDR, inhibidor de moléculas pequeñas de Tie-2, calcipotrieno, propionato de clobetasol, acetónido de triamcinolona, propionato de halobetasol, tazaroteno, metotrexato, fluocinonida, dipropionato aumentado de betametasona, acetónido de fluocinolona, acitretina, champú de alquitrán, valerato de betametasona, furoato de mometasona, ketoconazol, pramoxina/fluocinolona, valerato de hidrocortisona, flurandrenólido, urea, betametasona, propionato de clobetasol/emol, propionato de fluticasona, azitromicina, hidrocortisona, fórmula humectante, ácido fólico, desonida, pimecrolimus, alquitrán de hulla, diacetato de diflorasona, folato de etanercept, ácido láctico, metoxsaleno, hc/bismuto subgal/znox/resor, acetato de metilprednisolona, prednisona, filtro solar, halcinonida, ácido salicílico, antralina, pivalato de clocortolona, extracto de hulla, alquitrán de hulla/ácido salicílico, alquitrán de hulla/ácido salicílico/azufre, desoximetasona, diazepam, emoliente, fluocinonida/emoliente, aceite mineral/aceite de ricino/lact na, aceite mineral/aceite

de cacahuete, petróleo/misristato de isopropilo, psoraleno, ácido salicílico, jabón/tribromsalan, timerosal/ácido bórico, celecoxib, infliximab, ciclosporina, alefacept, efalizumab, tacrolimus, pimecrolimus, PUVA, UVB, y sulfasalazina.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Artritis Psoriásica con los cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen lo siguiente: metotrexato, etanercept, rofecoxib, celecoxib, ácido fólico, sulfasalazina, naproxeno, leflunomida, acetato de metilprednisolona, indometacina, sulfato de hidroxicloroquina, prednisona, sulindaco, dipropionato aumentado de betametasona, infliximab, metotrexato, folato, acetónido de triamcinolona, diclofenaco, dimetilsulfóxido, piroxicam, diclofenaco sódico, ketoprofeno, meloxicam, metilprednisolona, nabumetona, tolmetina sódica, calcipotrieno, ciclosporina, diclofenaco sódico/misoprostol, fluocinonida, sulfato de glucosamina, tiomalato sódico de oro, bitartrato de hidrocodona/apap, ibuprofeno, risedronato sódico, sulfadiazina, tioguanina, valdecoxib, alefacept, efalizumab e inhibidores de bcl-2.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Restenosis con los cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen lo siguiente: sirolimus, paclitaxel, everolimus, tacrolimus, Zotarolimus, acetaminofeno.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para Ciática con los cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen lo siguiente: bitartrato de hidrocodona/apap, rofecoxib, clorhidrato de ciclobenzaprina, metilprednisolona, naproxeno, ibuprofeno, clorhidrato de oxicodona/acetaminofeno, celecoxib, valdecoxib, acetato de metilprednisolona, prednisona, fosfato de codeína/apap, clorhidrato de tramadol/acetaminofeno, metaxalona, meloxicam,

metocarbamol, clorhidrato de lidocaína, diclofenaco sódico, gabapentina, dexametasona, carisoprodol, ketorolaco trometamina, indometacina, acetaminofeno, diazepam, nabumetona, clorhidrato de oxicodona, clorhidrato de tizanidina, diclofenaco sódico/misoprostol, napsilato de propoxifeno/apap, asa/oxicod/ter de oxicodona, ibuprofeno/bit de hidrocodona, clorhidrato de tramadol, etodolaco, clorhidrato de propoxifeno, clorhidrato de amitriptilina, carisoprodol/fos de codeína/asa, sulfato de morfina, multivitaminas, naproxeno sódico, citrato de orfenadrina, y temazepam.

Ejemplos de agentes terapéuticos para SLE (Lupus) en los cuales se pueden combinar las proteínas de enlace de la invención incluyen lo siguiente: NSAIDS, por ejemplo, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, piroxicam, indometacina; inhibidores de COX2, por ejemplo, Celecoxib, rofecoxib, valdecoxib; antimaláricos, por ejemplo, hidroxicloroquina; Esteroides, por ejemplo, prednisona, prednisolona, budenosida, dexametasona; Citotóxicos, por ejemplo, azatioprina, ciclofosfamida, micofenolato mofetil, metotrexato; inhibidores de PDE4 o inhibidor de la síntesis de purina, por ejemplo Cellcept. Las proteínas de enlace de la invención, también se pueden combinar con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, olsalazina, Imuran y agentes que interfieren con la síntesis, producción o acción de las citocinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de caspasas como los inhibidores de la enzima de conversión de IL-1β e IL-1ra. Las proteínas de enlace de la invención también se pueden utilizar con inhibidores de la señalización de las células T, por ejemplo, inhibidores de tirosina cinasa; o moléculas que tienen como objetivo las moléculas de activación de las células T, por ejemplo, CTLA-4-Ig o anticuerpos anti-familia B7, anticuerpos anti-

familia PD-1. Las proteínas de enlace de la invención, se pueden combinar con IL-11 o anticuerpos anti-citocina, por ejemplo, fonotolizumab (anticuerpo anti-IFNg), o anticuerpos anti-receptores, por ejemplo, anticuerpo anti-receptor de IL-6 y anticuerpos para las moléculas de la superficie de las células B. Los anticuerpos de la invención o la porción de enlace al antígeno de los mismos también se pueden utilizar con LJP 394 (abetimus), agentes que agotan o inactivan las células B, por ejemplo, Rituximab (anticuerpo anti-CD20) , linfostat-B (anticuerpo anti-BlyS), antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, Adalimumab (Publicación PCT No. WO 97/29131; HUMIRA), CA2 (REMICADE), CDP 571, constructos de TNFR-Ig, inhibidores (p75TNFRIgG (ENBREL) y p55TNFRIgG (LENERCEPT)) y bcl-2, debido a que se ha demostrado que la sobreexpresión de bcl-2 en ratones transgénicos causa un fenotipo similar al lupus (véase Marquina et al. (2004) J. Immunol. 172(11):7177-7185), por lo tanto, se espera que la inhibición tenga efectos terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de una proteína de enlace de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de enlace se puede determinar por una persona experta en el arte y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado del padecimiento, la edad, el sexo, y el peso del individuo, y la habilidad de la proteína de enlace para producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también aquella en la que cualquier efecto

tóxico o perjudicial del anticuerpo, o porción de anticuerpo, es contrarrestado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, debido a que se utiliza una dosis profiláctica en los sujetos antes de o en una fase temprana del padecimiento, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo individual, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar la dosis proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. El término “forma de dosificación unitaria” se refiere a las unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a ser tratados; cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas de dosificación unitarias de la invención están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular a ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de elaboración de compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un rango ejemplar, no limitante para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de una proteína de enlace de la invención es 0.1-20 mg/kg, por ejemplo, 1-10 mg/kg. Se debe notar que los valores de la dosis pueden variar con el tipo y severidad de la condición a ser aliviada. Adicionalmente se debe entender que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar con el paso del tiempo de acuerdo con la necesidad del individuo y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación aquí establecidos son sólo ejemplares y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reclamada.

Será fácilmente aparente para los expertos en el arte que son obvias otras adaptaciones y modificaciones adecuadas de los métodos de la invención aquí descritos y que se pueden hacer utilizando equivalentes adecuados sin desviarse del alcance de la invención o las modalidades aquí divulgadas. Habiendo descrito ahora la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente mediante la referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se incluyen sólo por propósitos de ilustración y no pretenden ser limitantes de la invención.

V. Diagnóstico

La divulgación en la presente también proporciona aplicaciones de diagnóstico. Esto es elucidado adicionalmente a continuación.

I. Método de Ensayo

La presente divulgación también proporciona un método para

determinar la presencia, cantidad o concentración de un analito (o un fragmento del mismo) en una muestra de prueba utilizando al menos una DVD-Ig según se describe aquí. Como es conocido en el arte, se puede utilizar cualquier prueba adecuada en el método. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayo, tal como inmunoensayo en emparedado (por ejemplo, inmunoensayos en emparedado monoclonales, policlonales y/o de DVD-Ig o cualquier variación de los mismos (por ejemplo, monoclonal/DVD-Ig, DVD-Ig/policlonal, etcétera), incluyendo detección de radioisótopo (radioinmunoensayo (RIA)) y detección de enzimas (inmunoensayo de enzimas (EIA) o ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) (por ejemplo, los ensayos ELISA Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN))), inmunoensayo de inhibición competitiva (por ejemplo, hacia adelante y reversa), inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA), técnica de inmunoensayo enzimático multiplicado (EMIT), transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET), y ensayo quimioluminiscente homogéneo, etcétera. En un inmunoensayo basado en SELDI, un reactivo de captura que enlaza específicamente un analito (o un fragmento del mismo) de interés se une a la superficie de una sonda de espectroscopía de masas, tal como un arreglo de chip de proteínas pre-activado. El analito (o un fragmento del mismo) posteriormente es específicamente capturado en el biochip, y el analito capturado (o un fragmento del mismo) se detecta mediante espectroscopía de masas. Alternativamente, el analito (o un fragmento del mismo) puede ser eluido del reactivo de captura y detectado mediante MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz) tradicional o mediante SELDI. Un inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes, en particular uno que emplea el analizador

automatizado ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), es un ejemplo de un inmunoensayo preferido.

Los métodos bien conocidos en el arte para colectar, manipular y procesar orina, sangre, suero y plasma, y otros fluidos corporales, se utilizan en la práctica de la presente divulgación, por ejemplo, cuando una DVD-Ig según se describe aquí se emplea como un reactivo de inmunodiagnóstico y/o en un kit de inmunoensayo de analito. La muestra de prueba puede comprender más radicales además del analito de interés, tales como anticuerpos, antígenos, haptenos, hormonas, fármacos, enzimas, receptores, proteínas, péptidos, polipéptidos, oligonucleótidos y/o polinucleótidos. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de sangre entera obtenida a partir de un sujeto. Puede ser necesario o deseado que una muestra de prueba, particularmente sangre entera, sea tratada antes del inmunoensayo según se describe aquí, por ejemplo, con un reactivo de pre-tratamiento. Incluso en los casos donde no es necesario el pre-tratamiento (por ejemplo, la mayoría de las muestras de orina), el pre-tratamiento se puede hacer opcionalmente (por ejemplo, como parte de un régimen en una plataforma comercial).

El reactivo de pre-tratamiento puede ser cualquier reactivo apropiado para el uso con el inmunoensayo y los kits de la invención. El pre-tratamiento opcionalmente comprende: (a) uno o más solventes (por ejemplo, metanol y etilenglicol) y opcionalmente, sal, (b) uno o más solventes y sal, y opcionalmente, detergente, (c) detergente, o (d) detergente y sal. Los reactivos de pre-tratamiento son conocidos en el arte, y tal pre-tratamiento se puede emplear, por ejemplo, según se utiliza para los ensayos en los analizadores Abbott TDx, AxSYM®, y

ARCHITECT® (Yatscoff et al. (1990) Clin. Chem. 36:1969-1973, y Wallemacq et al. (1999) Clin. Chem. 45:432-435), y/o según se encuentran comercialmente disponibles. Adicionalmente, el pre-tratamiento se puede hacer según se describe en la Patente Norteamericana No. 5,135,875; la Publicación de Patente de la EU No. EU0471293; la. Patente Norteamericana No 6,660,843; y la Solicitud de Patente Norteamericana No. 20080020401. El reactivo de pre-tratamiento puede ser un agente heterogéneo o un agente homogéneo.

Con el uso de un reactivo de pre-tratamiento heterogéneo, el reactivo de pre-tratamiento precipita la proteína de enlace al analito (por ejemplo, la proteína que puede enlazar a un analito o un fragmento del mismo) presente en la muestra. Tal etapa de pre-tratamiento comprende remover cualquier proteína de enlace al analito separando de la proteína de enlace al analito precipitada el sobrenadante de la mezcla formada por la adición del agente de pre-tratamiento a la muestra. En tal ensayo, el sobrenadante de la mezcla en ausencia de cualquier proteína de enlace se utiliza en el ensayo, procediendo directamente a la etapa de captura del anticuerpo.

Con el uso de un reactivo de pre-tratamiento homogéneo no hay tal etapa de separación. La mezcla entera de muestra de prueba y reactivo de pre-tratamiento se contacta con un asociado de enlace específico etiquetado para el analito (o un fragmento del mismo), tal como un anticuerpo anti-analito etiquetado (o un fragmento antigénicamente reactivo del mismo). El reactivo de pre-tratamiento empleado para tal ensayo típicamente se diluye en la mezcla de muestra de prueba pre-tratada, ya sea antes o durante la captura por el primer asociado de enlace específico. A pesar de tal dilución, una cierta cantidad del

reactivo de pre-tratamiento está todavía presente (o permanece) en la mezcla de muestra de prueba durante la captura. De acuerdo con la invención, el asociado de enlace específico etiquetado puede ser una DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma).

En un formato heterogéneo, después de que la muestra de prueba se obtiene a partir de un sujeto, se prepara una primera mezcla. La mezcla contiene la muestra de prueba que se evalúa por un analito (o un fragmento del mismo) y un primer asociado de enlace específico, en donde el primer asociado de enlace específico y cualquier analito contenido en la muestra de prueba forman un primer complejo asociado de enlace específico-analito. Preferiblemente, el primer asociado de enlace específico es un anticuerpo anti-analito o un fragmento del mismo. El primer asociado de enlace específico puede ser una DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma) según se describe aquí. El orden en que la muestra de prueba y el primer asociado de enlace específico se agregan para formar la mezcla no es crítico. Preferiblemente, el primer asociado de enlace específico es inmovilizado sobre una fase sólida. La fase sólida utilizada en el inmunoensayo (para el primer asociado de enlace específico y, opcionalmente, el segundo asociado de enlace específico) puede ser cualquier fase sólida conocida en el arte, tal como, pero no limitado a, una partícula magnética, una cuenta, un tubo de ensayo, una placa de microtitulación, una cubeta, una membrana, una molécula de andamiaje, una película, un papel filtro, un disco y un chip.

Después de que se forma la mezcla que contiene el primer complejo asociado de enlace específico-analito, cualquier analito no enlazado se remueve

del complejo utilizando cualquier técnica conocida en el arte. Por ejemplo, el analito no enlazado se puede remover mediante lavado. Deseablemente, sin embargo, el primer asociado de enlace específico está presente en exceso de cualquier analito presente en la muestra de prueba, tal que todo el analito que está presente en la muestra de prueba se enlaza por el primer asociado de enlace específico.

Después de que se remueve cualquier analito no enlazado, se agrega un segundo asociado de enlace específico a la mezcla para formar un complejo primer asociado de enlace específico-analito-segundo asociado de enlace específico. El segundo asociado de enlace específico es preferiblemente un anticuerpo anti-analito que se enlaza a un epítope en el analito que difiere del epítope en el analito enlazado por el primer asociado de enlace específico. Además, también preferiblemente, el segundo asociado de enlace específico se etiqueta con o contiene una etiqueta detectable según se describe anteriormente. El segundo asociado de enlace específico puede ser una DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante de la misma) según se describe aquí.

Se puede utilizar cualquier etiqueta detectable adecuada como es conocido en el arte. Por ejemplo, la etiqueta detectable puede ser una etiqueta radiactiva (tal como 3H, 125I, 35S, 14C, 32P, y 33P), una etiqueta enzimática (tal como peroxidasa de rábano, peroxidasa alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, y similares), una etiqueta quimioluminiscente (tal como ésteres de acridinio, tioésteres, o sulfonamidas; luminol, isoluminol, ésteres de fenantridinio, y similares), una etiqueta fluorescente (tal como fluoresceína (por ejemplo, 5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3',6-carboxifluoresceína, 5(6)-

carboxifluoresceína, 6-hexacloro-fluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, y similares)), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, puntos cuánticos (por ejemplo, sulfuro de cinc-seleniuro de cadmio capsulado), una etiqueta termométrica, o una inmuno-etiqueta de reacción en cadena de polimerasa. Una introducción a las etiquetas, procedimientos de etiquetado y detección de etiquetas se encuentra en Polak and Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2a ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), y en Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1996), que es un catálogo y manual combinado publicado por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon. Una etiqueta fluorescente se puede utilizar en FPIA (Patentes Norteamericanas Nos. 5,593,896; 5,573,904; 5,496,925; 5,359,093; y 5,352,803). Un compuesto de acridinio se puede utilizar como una etiqueta detectable en un ensayo quimioluminiscente homogéneo o heterogéneo (Adamczyk et al. (2006) Bioorg. Med. Chem. Lett. 16:1324-1328; Adamczyk et al. (2004) Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:2313-2317; Adamczyk et al. (2004) Biorg. Med. Chem. Lett. 14: 3917-3921; y Adamczyk et al. (2003) Org. Lett. 5:3779-3782).

Un compuesto de acridinio preferido es una acridinio-9-carboxamida. Los métodos para preparar acridinio 9-carboxamidas se describen en Mattingly (1991) J. Biolumin. Chemilumin. 6:107-114; Adamczyk et al. (1998) J. Org. Chem. 63:5636-5639; Adamczyk et al. (1999) Tetrahedron 55:10899-10914; Adamczyk et al. (1999) Org. Lett. 1:779-781; Adamczyk et al. (2000) Bioconjug. Chem. 11:714-724; Mattingly et al., In Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications; Dyke, Ed. (2002) CRC Press: Boca Raton, pp. 77-105; Adamczyk et al. (2003) Org. Lett. 5: 3779-3782; y las Patentes Norteamericanas Nos. 5,468,646; 5,543,524; y

5,783,699. Otro compuesto de acridinio preferido es un aril éster de acridinio-9-carboxilato. Un ejemplo de un aril éster de acridinio-9-carboxilato es fluorosulfonato de 10-metil-9-(fenoxicarbonil)acridinio (disponible a partir de Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Los métodos para preparar aril ésteres de acridinio 9-carboxilato se describen en McCapra et al. (1965) Photochem. Photobiol. 4:1111-21; Razavi et al. (2000) Luminescence 15:245-249; Razavi et al. (2000) Luminescence 15:239-244; y la Patente Norteamericana No. 5,241,070. Más detalles referentes al aril éster de acridinio-9-carboxilato y su uso se establecen en la Publicación de Patente Norteamericana No. 20080248493.

Se pueden realizar ensayos quimioluminiscentes (por ejemplo, utilizando acridinio como se describe anteriormente u otros agentes quimioluminiscentes) de acuerdo con los métodos descritos en Adamczyk et al. (2006) Anal. Chim. Acta 579(I):61-67. Aunque se puede utilizar cualquier formato de ensayo adecuado, un quimioiluminómetro de microplacas (Mithras LB-940, Berthold Technologies USA, LLC, Oak Ridge, TN) permite rápidamente el ensayo de múltiples muestras de volúmenes pequeños.

El orden en el cual la muestra de análisis y el(los) socio(s) de unión específico(s) se agregan para formar la mezcla del ensayo quimioluminiscente no es crítico. Si el primer socio de unión específico se etiqueta de manera detectable con un agente quimioluminiscente tal como un compuesto de acridinio, forma complejos del primer socio de unión específico-analito detectablemente etiquetado. Alternativamente, si se utiliza un socio de unión específico y el segundo socio de unión específico se etiqueta detectablemente con un agente quimioluminiscente tal como un compuesto de acridinio, forma complejos del primer socio de unión

específico-analito-segundo socio de unión específico etiquetado detectablemente. Cualquier socio de unión específico no unido, ya sea etiquetado o no etiquetado, se puede remover de la mezcla utilizando cualquier técnica conocida en el arte, tal como el lavado.

Se puede generar peróxido de hidrógeno in situ en la mezcla o se provee o suministra a la mezcla (por ejemplo, la fuente del peróxido de hidrógeno que es uno o más amortiguadores u otras soluciones que se sabe contienen peróxido de hidrógeno) antes, simultáneamente con, o después de la adición de un compuesto de acridinio anteriormente descrito. Se puede generar peróxido de hidrógeno in situ en una serie de maneras tal como podría ser evidente para un experto en la técnica.

Tras la adición simultánea o subsecuente de al menos una solución básica a la muestra, se genera una señal detectable, particularmente, una señal quimioluminiscente, indicativa de la presencia del analito. La solución básica contiene al menos una base y tiene un pH mayor o igual a 10, preferiblemente, mayor o igual a 12. Los ejemplos de soluciones básicas incluyen, pero no están limitadas a, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de amonio, hidróxido de magnesio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, y bicarbonato de calcio. La cantidad de solución básica agregada a la muestra depende de la concentración de la solución básica. En base a la concentración de la solución básica utilizada, un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de solución básica que se agrega a la muestra.

La señal quimioluminiscente que se genera se puede detectar

utilizando técnicas rutinarias conocidas para aquellos expertos en el arte. En base a la intensidad de la señal generada, 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 generada. La cantidad de analito presente se puede cuantificar comparando la cantidad de luz generada respecto a una curva estándar del analito o mediante su comparación con un estándar de referencia. La curva estándar se puede generar utilizando diluciones en serie o soluciones de concentraciones conocidas de analito mediante espectroscopia de masa, métodos gravimétricos, y otras técnicas conocidas en el arte. Aunque lo anterior se describe con énfasis en el uso de un compuesto de acridinio como el agente quimioluminiscente, un experto en la técnica puede adaptar rápidamente esta descripción para el uso de otros agentes quimioluminiscentes.

Los inmunoensayos del analito generalmente se pueden realizar utilizando cualquier formato conocido en la técnica, tal como, pero no limitado a, un formato de fase doble. Específicamente, en un formato de inmunoensayo, se emplean al menos dos anticuerpos para separar y cuantificar el analito, tal como un analito humano, o un fragmento del mismo en una muestra. Más específicamente, los al menos dos anticuerpos se unen a diferentes epítopes en un analito (o un fragmento del mismo) que forma un complejo inmune, el cual se refiere como una “fase doble”. Generalmente, en los inmunoensayos se pueden utilizar uno o más anticuerpos para capturar el analito (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis (estos anticuerpos frecuentemente se refieren como un anticuerpo de “captura” o anticuerpos de “captura”) y se pueden utilizar uno o más anticuerpos para unir una etiqueta detectable (particularmente, cuantificable) a la

fase doble (estos anticuerpos frecuentemente se refieren como el “anticuerpo de detección”, los “anticuerpos de detección”, el “conjugado”, o los “conjugados”). Por consiguiente, en el contexto de un formato de inmunoensayo de fase doble, se puede utilizar una proteína de unión o DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante del mismo) que se describe en la presente como un anticuerpo de captura, o un anticuerpo de detección, o ambos. Por ejemplo se puede utilizar una proteína de unión o DVD-Ig que tiene un dominio que puede unir un primer epítope en un analito (o un fragmento del mismo) como un anticuerpo de captura y/u otra proteína de unión o DVD-Ig que tiene un dominio que puede unir un segundo epítope en un analito (o un fragmento del mismo) como un anticuerpo de detección. En este sentido, se puede utilizar una proteína de unión o DVD-Ig que tiene un primer dominio que puede unir un primer epítope en un analito (o un fragmento del mismo y un segundo dominio que puede unir un segundo epítope en un analito (o un fragmento del mismo) como un anticuerpo de captura y/o anticuerpo de detección. Alternativamente, se puede utilizar una proteína de unión o DVD-Ig que tiene un primer dominio que puede unir un epítope en un primer analito (o un fragmento del mismo) y un segundo dominio que puede unir un epítope en un segundo analito (o un fragmento del mismo) como un anticuerpo de captura y/o un anticuerpo de detección para detectar, y opcionalmente cuantificar, dos o más analitos. En el caso de que un analito pueda estar presente en una muestra en más de una forma, tal como una forma monomérica y una forma dimérica/multimérica, que puede ser homomérica o heteromérica, una proteína de unión o DVD-Ig que tiene un dominio que puede unir un epítope que solamente se expone en la forma monomérica y se puede utilizar otra proteína de unión o DVD-

Ig que tiene un dominio que puede unir un epítope en una parte diferente de una forma dimérica/multimérica como anticuerpos de captura y/o anticuerpos de detección, permitiendo así la detección, y cuantificación opcional, de diferentes formas de un analito dado. Además, el empleo de DVD-Igs con diferentes afinidades diferenciales dentro de una sola proteína de unión o DVD-Ig y/o entre proteínas de unión o DVD-Igs puede proporcionar una ventaja de avidez. En el contexto de los inmunoensayos que se describen en la presente, generalmente puede ser útil o deseado incorporar uno o más enlaces dentro de la estructura de una proteína de unión o DVD-Ig. Cuando está presente, óptimamente el enlace podría ser de suficiente longitud y flexibilidad estructura para permitir la unión de un epítope por medio de los dominios internos así como la unión de otro epítope mediante los dominios externos. En este sentido, si una proteína de unión o DVD-Ig puede unir dos diferentes analitos y un analito es más grande que el otro, deseablemente el analito más grande se une mediante los dominios externos.

En términos generales, una muestra que se analiza (por ejemplo, que se sospecha que contiene) un analito (o un fragmento del mismo) se puede poner en contacto con al menos un anticuerpo de captura (o anticuerpos) y al menos un anticuerpo de detección (que puede ser un segundo anticuerpo de detección o un tercer anticuerpo de detección o incluso un anticuerpo numerado de manera sucesiva, por ejemplo, como cuando el anticuerpo de captura y/o detección comprende múltiples anticuerpos) ya sea simultánea o secuencialmente y en cualquier orden. Por ejemplo, la muestra de análisis se puede poner en contacto primero con al menos un anticuerpo de captura y luego (secuencialmente) con al menos un anticuerpo de detección. Alternativamente, la muestra de análisis se

puede poner primero en contacto con al menos un anticuerpo de detección y luego (secuencialmente) con al menos un anticuerpo de captura. En aún otra alternativa, la muestra de análisis se puede poner en contacto simultáneamente con un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección.

En un formato de ensayo de fase doble, una muestra que se sospecha contiene el analito (o un 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 del primer anticuerpo/analito. Si se utiliza más de un anticuerpo de captura, se forma un complejo del primer anticuerpo de captura/analito que comprende dos o más anticuerpos de captura. En el inmunoensayo de fase doble, los anticuerpos, es decir, preferiblemente, el al menos un anticuerpo de captura, se utilizan en cantidades molares en exceso de la cantidad máxima de analito (o un fragmento del mismo) esperadas en la muestra de análisis. Por ejemplo, se pueden utilizar desde aproximadamente 5 µg hasta aproximadamente 1 mg de anticuerpo por mL de amortiguador (por ejemplo, amortiguador de revestimiento de micro-partículas).

Los inmunoensayos de inhibición competitiva, los cuales frecuentemente se utilizan para medir analitos pequeños se debido a que se requiere solamente por un anticuerpo, comprenden formatos secuenciales y clásicos. En un inmunoensayo de inhibición competitiva secuencial un anticuerpo de captura para un analito de interés se revisto en un pozo de una placa de microtitulación u otro soporte sólido. Cuando la muestra que contiene el analito de interés se agrega al pozo, el analito de interés se une al anticuerpo de captura. Después del lavado, se agrega una cantidad conocida de analito de biotina

etiquetada o peroxidasa de rábano (HRP)) al pozo. Es necesario un substrato para una etiqueta enzimática para generar una señal. Un ejemplo de un substrato adecuado para la HRP es 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Después del lavado, la señal generada por el analito etiquetado se mide y es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra. En un análisis de inhibición competitiva clásico se reviste un anticuerpo en un analito de interés sobre un soporte sólido (por ejemplo, un pozo de una placa de microtitulación). Sin embargo, a diferencia del inmunoensayo de inhibición competitiva secuencial, la muestra y el analito etiquetado se agregan al pozo al mismo tiempo. Cualquier analito en la muestra compite con el analito etiquetado para unirse al anticuerpo de captura. Después del lavado, la señal generada por el analito etiquetado se mide y es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra.

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

Los ejemplos incluyen un pozo 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), perlas (por ejemplo, perlas de poliestireno o perlas magnéticas), una tira de un filtro/membrana (por ejemplo, nitrocelulosa o nylon), micropartículas

(por ejemplo, partículas de látex, micropartículas magnetizables (por ejemplo, micropartículas que tengan núcleos de óxido férrico u óxido de cromo y revestimientos homo- o hetero-poliméricos y radios de aproximadamente 1-10 micras). El substrato puede comprender un material poroso adecuado con una afinidad de superficie adecuada para unir antígenos y suficiente porosidad para permitir el acceso mediante anticuerpos de detección. Generalmente se prefiere un material microporoso, aunque se puede utilizar un material gelatinoso en un estado hidratado. Tales substratos porosos preferiblemente están en la forma de láminas que tienen un grosor de aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 0.5 mm, de manera preferible de aproximadamente 0.1 mm. Aunque el tamaño de poro puede variar bastante, preferiblemente el tamaño de poro es de aproximadamente 0.025 hasta aproximadamente 15 micras, de manera más preferible de aproximadamente 0.15 hasta aproximadamente 15 micras. La superficie de tales substratos se puede activar mediante procesos químicos que causan el enlace covalente de un anticuerpo al substrato. La unión irreversible, se da como resultado generalmente mediante adsorción a través de fuerzas hidrófobas, del antígeno o el anticuerpo al substrato; alternativamente se puede utilizar un agente de acoplamiento químico u otro medio para unir covalente el anticuerpo al substrato, siempre que tal unión no interfiera con la capacidad del anticuerpo de unirse al analito. Alternativamente, el anticuerpo se puede unir con micropartículas, que se han revestido previamente con estreptavidina (por ejemplo, DYNAL® Magnetic Beads, Invitrogen, Carlsbad, CA) o biotina (por ejemplo, utilizando micropartículas revestidas con estreptavidina Power-BindTM-SA-MP (Seradyn, Indianapolis, IN)) o anticuerpos monoclonales de especies anti-específicas. Si es

necesario, el substrato se puede derivar para permitir la reactividad con varios grupos funcionales en el anticuerpo. Tal derivación requiere el uso de ciertos agentes de acoplamiento, los ejemplos de los cuales incluyen, pero no están limitados a, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida, y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida. Si se desea, se pueden adherir uno o más reactivos de captura, tal como anticuerpos (o un fragmentos de los mismos), cada uno de los cuales es especifico del(los) analito(s) a fases sólidas en diferentes ubicaciones físicas o localizables (por ejemplo, tal como una configuración de biochip (ver, por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 6,225,047; 6,329,209; y 5,242,828; y Publicación PCT No. WO 99/51773 y WO 00/56934). Si el reactivo de captura se adhiere a una sonda de espectrometría de masa como el soporte sólido, se puede detectar la cantidad de analito unido a la sonda mediante espectrometría de masa de ionización de desorción láser. Alternativamente, se puede empacar una sola columna con diferentes perlas, las cuales se derivan con uno o más reactivos de captura, capturando así el analito en un solo lugar (ver, tecnologías basadas en perlas derivadas de anticuerpos, por ejemplo, la tecnología xMAP de Luminex (Austin, TX)).

Después de que se examina la muestra de análisis del analito (o un fragmento del mismo) se pone en contacto con al menos un anticuerpo de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura), la mezcla se incuba a fin de permitir la formación de un complejo del primer anticuerpo (o múltiples anticuerpos)-analito (o un fragmento del mismo). La incubación se puede llevar a cabo a un pH de aproximadamente 4.5 hasta aproximadamente 10.0, a una temperatura de aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 45°, y durante un periodo de al

menos aproximadamente un (1) minuto hasta aproximadamente dieciocho (18) horas, preferiblemente de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 24 minutos, más preferiblemente durante aproximadamente 4 hasta aproximadamente 18 minutos. El inmunoensayo descrito en la presente se puede realizar en una etapa (es decir la muestra de análisis, al menos un anticuerpo de captura y al menos un anticuerpo de detección se agregan todos secuencialmente o simultáneamente a un recipiente de reacción) o en más de una etapa, tal como dos etapas, tres etapas, etc.

Después de la formación del complejo del (primer o múltiple) anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo), el complejo se pone en contacto entonces con al menos un anticuerpo de detección bajo condiciones las cuales permiten la formación de un complejo del (primer o múltiple) anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo)/segundo anticuerpo de detección). Aunque se sobrepone por claridad como el “segundo” anticuerpo (por ejemplo, el segundo anticuerpo de detección), de hecho, cuando se utilizan múltiples anticuerpos para captura y/o detección, el al menos un anticuerpo de detección puede ser el segundo, tercero, cuarto, etc., anticuerpos utilizados en el inmunoensayo. Si el complejo de anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo) se pone en contacto con más de un anticuerpo de detección, entonces se forma un (primer o múltiple) anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo)/(múltiple) anticuerpo de detección. Al igual que el anticuerpo de captura (por ejemplo, el primer anticuerpo de captura), cuando el al menos un (por ejemplo, segundo y cualquier subsecuente) anticuerpo de detección se pone en contacto con el complejo de anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo), se

requiere un periodo de incubación bajo condiciones similares a las descritas anteriormente para la formación del complejo del (primer o múltiple) anticuerpo de detección/analito (o un fragmento del mismo)/(segundo o múltiple) anticuerpo de detección. Preferiblemente, el al menos un anticuerpo de detección contiene una etiqueta detectable. La etiqueta detectable se puede unir al menos a un anticuerpo de detección (por ejemplo el segundo anticuerpo de detección) antes de, simultáneamente con, o después de la formación del complejo del (primer o múltiple) anticuerpo de captura/analito (o un fragmento del mismo)/(segundo o múltiple) anticuerpo de detección. Se puede utilizar cualquier etiqueta detectable conocida en la técnica (ver discusión anterior, incluyendo las referencias de Polak and Van Noorden (1997) y Haugland (1996)).

La etiqueta detectable se puede unir a los anticuerpos ya sea directamente o a través de un agente de acoplamiento. Un ejemplo de un agente de acoplamiento que se puede utilizar es EDAC (clorhidrato de (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida), que está disponible comercialmente de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Otros agentes de acoplamiento que se pueden utilizar son conocidos en la técnica. Los métodos para unir una etiqueta detectable a un anticuerpo son conocidos en la técnica. Adicionalmente, se pueden adquirir o sintetizar muchas etiquetas detectables que ya contengan grupos terminales que faciliten el acoplamiento de la etiqueta detectable al anticuerpo, tal como CPSP-Acridinium Ester (es decir, carboxamida de 9-[N-tosil-N-(3-carboxipropil)]-10-(3-sulfopropil)acridinio) o SPSP-Acridinium Ester (es decir, N10-(3-sulfopropil)-N-(3-sulfopropil)-acridinio-9-carboxamida).

El complejo del (primer o múltiple) anticuerpo de

captura/analito/(segundo o múltiple) anticuerpo de detección puede estar, aunque no tiene que, separarse del resto de la muestra de análisis antes de la cuantificación de la etiqueta. 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 pozo o una perla, la separación se puede lograr removiendo el fluido (de la muestra de análisis) de su contacto con el soporte sólido. Alternativamente, si el primer anticuerpo de captura se une a un soporte sólido, el mismo se puede poner en contacto simultáneamente con la muestra que contiene el analito y el al menos un segundo anticuerpo de detección para formar un complejo del primer (múltiple) anticuerpo/analito/segundo (múltiple) anticuerpo, seguido por la remoción del fluido (muestra de análisis) de su contacto con el soporte sólido. Si el al menos un primer anticuerpo de captura no se une a un soporte sólido, entonces el complejo del (primer o múltiple) anticuerpo de captura/analito/(segundo o múltiple) anticuerpo de detección no tiene que removerse de la muestra de análisis para la cuantificación de la cantidad de la etiqueta.

Después de la formación del complejo de anticuerpo de captura/analito/anticuerpo de detección etiquetado (por ejemplo, el complejo del primer anticuerpo de captura/analito/segundo anticuerpo de detección), la cantidad de etiqueta en el complejo se cuantifica utilizando las técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, si se utiliza una etiqueta enzimática, el complejo etiquetado se hace reaccionar con un substrato para que la etiqueta de una reacción cuantificación tal como el desarrollo de color. Si la etiqueta es una etiqueta radioactiva, la etiqueta se cuantifica utilizando medios apropiados, tal como un contador de centelleo. Si la etiqueta es una etiqueta fluorescente, la etiqueta se cuantifica estimulando la

etiqueta con una luz de un color (el cual es conocido como la “longitud de onda de excitación”) y se detecta otro color (el cual es conocido como la “longitud de onda de emisión”) que es emitido por la etiqueta en respuesta a la estimulación. Si la etiqueta es una etiqueta quimioluminiscente, la etiqueta se cuantifica detectando la luz emitida ya sea visualmente o utilizando luminómetros, película de rayos x, película fotográfica de alta velocidad, una cámara CCD, etc. Una vez que la cantidad de la etiqueta en el complejo se ha cuantificado, la concentración del analito o un fragmento del mismo en la muestra de análisis se determinan mediante medios apropiados, tal como mediante el uso de una curva estándar que ha sido generada utilizando diluciones en serie del analito o un fragmento del mismo de concentración conocida. Aparte de utilizar diluciones en serie del analito o un fragmento del mismo, la curva estándar se puede generar gravimétricamente, mediante espectroscopia de masa y mediante otras técnicas conocidas en el arte.

En un análisis con micropartículas quimioluminiscentes que emplea el analizador ARCHITECT®, el pH del diluyente conjugado deberá ser de aproximadamente 6.0 +/-, el amortiguador de revestimiento de micropartículas deberá mantenerse aproximadamente a temperatura ambiente (es decir, desde aproximadamente 17 hasta aproximadamente 27 ŏC), el pH del amortiguador de revestimiento de micropartículas deberá ser de aproximadamente 6.5 +/- 0.2, y el pH del diluyente de micropartículas deberá ser de aproximadamente 7.8 +/- 0.2. Los sólidos preferiblemente son menores de aproximadamente 0.2%, tal como menos de aproximadamente 0.15%, menos de aproximadamente 0.14%, menos de aproximadamente 0.13%, menos de aproximadamente 0.12%, o menos de aproximadamente 0.11%, tal como aproximadamente 0.10%.

Los FPIAs se basan en los principios del inmunoensayo de unión competitiva. Un compuesto etiquetado fluorescentemente, cuando se excita mediante una luz polarizada linealmente, emitirá fluorescencia que tiene un grado de polimerización inversamente proporcional a su ritmo de rotación. Cuando un complejo de indicador-anticuerpo etiquetado fluorescentemente se excita mediante una luz polarizada linealmente, la luz emitida permanece altamente polarizada debido a que el fluoróforo que se limita que rote entre la luz del tiempo, es absorbido y la luz de tiempo es emitida. Cuando un compuesto indicador "libre" (es decir, un compuesto que no está unido a un anticuerpo) es excitado por medio de luz polarizada linealmente, su rotación es mucho más rápida que el correspondiente conjugado de indicador-anticuerpo (o proteína de unión indicadora y/o DVD-Ig indicador) producido en un inmunoensayo de unión competitivo. Los FPIAs son ventajosos sobre los RIAs en vista de que no hay sustancias radioactivas que requieran un manejo y desecho especiales. Además, los FPIAs son análisis homogéneos que se pueden realizar fácil y rápidamente.

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

analito, (ii') al menos una etiqueta detectable y (ii) que comprende comparar una señal generada por la etiqueta detectable como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del analito (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis con una señal generada como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del analito (o un fragmento del mismo) en un control o calibrador. El calibrador es opcionalmente parte de una serie de calibradores, en los cuales cada uno de los calibradores difiere de los otros calibradores por la concentración del analito.

El método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de análisis con al menos un primer socio de unión específico del analito (o un fragmento del mismo) seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que puede unirse a un analito, una variante de un anticuerpo que puede unirse a un analito, un fragmento de una variante que puede unirse a un analito, y un DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante del mismo) que puede unirse a un analito a fin de formar un complejo del primer socio de unión específico/analito (o un fragmento del mismo), (ii) poner en contacto el complejo del primer socio de unión específico/analito (o un fragmento del mismo) con al menos un complejo del segundo socio de unión específico del analito (o un fragmento del mismo) seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo anti-analito detectablemente etiquetado, un fragmento detectablemente etiquetado de un anticuerpo anti-analito que puede unirse al analito, una variante detectablemente etiquetada de un anticuerpo anti-analito que se puede unir al analito, un fragmento detectablemente etiquetado de una variante de un anticuerpo anti-analito que puede unirse al analito, y un DVD-Ig

detectablemente etiquetado (o un fragmento, variante, o un fragmento de una variante del mismo) a fin de formar un complejo del primer socio de unión específico/analito (o un fragmento del mismo)/segundo socio de unión específico, y (iii) determinar la presencia, cantidad o concentración del analito en la muestra de análisis detectando o midiendo la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo del primer socio de unión específico/analito (o un fragmento del mismo)/segundo socio de unión específico formado en (ii). Un método en el cual al menos un primer socio de unión específico del analito (o un fragmento del mismo) y/o al menos un segundo socio de unión específico del analito (o un fragmento del mismo) es un DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante del mismo) que se describe en la presente se puede preferir.

Alternativamente, el método puede comprender poner en contacto la muestra de análisis con al menos un primer socio de unión específico del analito (o un fragmento del mismo) seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que se puede unir a un analito, una variante de un anticuerpo que se puede unir a un analito, un fragmento de una variante de un anticuerpo que se puede unir a un analito, y un DVD-Ig (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante del mismo) y simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, poner en contacto la muestra de análisis con al menos un segundo socio de unión específico, el cual puede competir con el analito (o un fragmento del mismo) para unirse al menos a un primer socio de unión específico y el cual se selecciona del grupo que consiste de un analito detectablemente etiquetado, un fragmento detectablemente etiquetado del analito que se puede unir al primer socio de unión específico, una variante

detectablemente etiquetado del analito que se puede unir al primer socio de unión específico, y un fragmento detectablemente etiquetado de una variante del analito que se puede unir al primer socio de unión específico. Cualquier analito (o un fragmento del mismo) presente en la muestra de análisis y al menos un segundo socio de unión específico compiten entre sí para formar un complejo del primer socio de unión específico/analito (o un fragmento del mismo) y un complejo del primer socio de unión específico/segundo socio de unión específico, respectivamente. El método comprende además determinar la presencia, cantidad o concentración de analito en la muestra de análisis detectando o midiendo la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo del primer socio de unión específico/segundo socio de unión específico formado en (ii), etiqueta detectable la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo del primer socio de unión específico/segundo socio de unión específico es inversamente proporcional a la cantidad o concentración del analito en la muestra de análisis.

Los métodos anteriores pueden comprender además diagnosticar, pronosticar, o evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico de un paciente de quien se obtuvo la muestra de análisis. Si el método comprende además evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente del quien se obtuvo la muestra de análisis, el método comprende además opcionalmente modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente cuando sea necesario mejorar la eficacia. El método se puede adaptar para usarse en un sistema automatizado o un sistema semi-automatizado.

Más específicamente, se provee un método para determinar la presencia, cantidad o concentración de un antígeno (o un fragmento del mismo) en

la muestra de análisis. El método comprende evaluar la muestra de análisis del antígeno (o un fragmento del mismo) mediante un inmunoensayo. El inmunoensayo (i) emplea al menos una proteína de unión y al menos una etiqueta detectable y (ii) comprende comparar una señal generada por la etiqueta detectable como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis con una señal generada 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 los cuales cada uno de los calibradores difiere de los demás calibradores en la serie por la concentración del antígeno (o un fragmento del mismo)). Una de al menos una proteína de unión (i') comprende una cadena de polipéptidos que comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en la cual VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo parental (o una porción de unión del antígeno del mismo), el cual puede ser igual o diferente al primer antígeno parental, C es un dominio constante de cadena pesada, (X1)n es un enlace, el cual está opcionalmente presente y, cuando está presente, es diferente 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 análisis con al menos un agente de captura, el cual se une a un epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) a fin de formar un complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), (ii) poner en contacto el complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) con al menos un agente de detección, el cual comprende una etiqueta detectable y se une a un

epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) que no se une mediante el agente de captura, para formar un complejo de 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 análisis en base a la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo)/agente de detección formado en (ii), en donde al menos un agente de captura y/o al menos un agente de detección es al menos una proteína de unión. Alternativamente, el método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de análisis con al menos un agente de captura, el cual se une a un epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) a fin de formar un complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), y simultanea o secuencialmente, en cualquier orden, poner en contacto la muestra de análisis con el antígeno detectablemente etiquetado (o un fragmento del mismo), el cual puede competir con cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis para unirse al menos a un agente de captura, en donde cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) presente en la muestra de análisis y el antígeno detectablemente etiquetado compiten entre sí para formar un complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) y un complejo de agente de captura/antígeno detectablemente etiquetado (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 análisis en base a la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno detectablemente etiquetado (o un fragmento del mismo) formado en (ii), en donde al menos un agente de captura es al menos una proteína de unión

y en donde la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno detectablemente etiquetado (o un fragmento del mismo) es inversamente proporcional a la cantidad o concentración de antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis. La muestra de análisis puede ser de un paciente, en cuyo caso el método puede comprender además diagnosticar, pronosticar, o evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente. Si el método comprende además evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente, el método comprende además opcionalmente modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente cuando sea necesario mejorar la eficacia. El método se puede adaptar para usarse en un sistema automatizado o un sistema semi-automatizado.

Se provee otro método para determinar la presencia, cantidad o concentración de un antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis. El método comprende evaluar la muestra de análisis del antígeno (o un fragmento del mismo) mediante un inmunoensayo. El inmunoensayo (i) emplea al menos una proteína de unión y al menos una etiqueta detectable y (ii) comprende comparar una señal generada por la etiqueta detectable como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis con una señal generada 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 los cuales cada uno de los calibradores difiere de otros calibradores en la serie por la concentración del antígeno (o un fragmento del mismo). Una de al menos una proteína de unión (i')

comprende una cadena de polipéptidos que comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en la cual VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido del segundo anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente del primer anticuerpo parental, C es un dominio constante de cadena ligera, (X1)n es un enlace, el cual está opcionalmente presente y, cuando está presente, es diferente a CH1, y (X2)n es una región Fc, que opcionalmente está presente, y (ii') puede unir un par de antígenos. El método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de análisis con al menos un agente de captura, el cual se une a un epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) a fin de formar un complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), (ii) poner en contacto el complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) con al menos un agente de detección, el cual comprende una etiqueta detectable y se une a un epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) que no se une mediante el agente de captura, para formar un complejo de 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 análisis en base a la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo)/agente de detección formado en (ii), en donde al menos un agente de captura y/o al menos un agente de detección es al menos una proteína de unión. Alternativamente, el método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de análisis con al menos un agente de captura, el cual se une a un epítope en el antígeno (o un

fragmento del mismo) a fin de formar un complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), y simultanea o secuencialmente, en cualquier orden, poner en contacto la muestra de análisis con el antígeno detectablemente etiquetado (o un fragmento del mismo), el cual puede competir con cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis para unirse al menos a un agente de captura, en donde cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) presente en la muestra de análisis y el antígeno detectablemente etiquetado compiten entre sí para formar un complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) y un complejo de agente de captura/antígeno detectablemente etiquetado (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 análisis en base a la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno detectablemente etiquetado (o un fragmento del mismo) formado en (ii), en donde al menos un agente de captura es al menos una proteína de unión y en donde la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno detectablemente etiquetado (o un fragmento del mismo) es inversamente proporcional a la cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis. Si la muestra de análisis es de un paciente, el método puede comprender además diagnosticar, pronosticar, o evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente. Si el método comprende además evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente, el método comprende además opcionalmente modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente cuando sea necesario mejorar la eficacia. El

método se puede adaptar para usarse en un sistema automatizado o un sistema semi-automatizado.

Se provee incluso otro método para determinar la presencia de, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis. El método comprende evaluar la muestra de análisis del antígeno (o un fragmento del mismo) mediante un inmunoensayo. El inmunoensayo (i) emplea al menos una proteína de unión y al menos una etiqueta detectable y (ii) comprende comparar una señal generada por la etiqueta detectable como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis con una señal generada 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 los cuales cada uno de los calibradores difiere de otros calibradores en la serie por la concentración del antígeno (o un fragmento del mismo). Una de al menos una proteína de unión (i') comprende una cadena de polipéptidos que comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en la cual VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido del segundo anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente del primer anticuerpo parental, C es un dominio constante de cadena ligera, (X1)n es un enlace, el cual está opcionalmente presente y, cuando está presente, es diferente a CH1, y (X2)n es una región Fc, que opcionalmente está presente, y en donde la segunda cadena de polipéptidos comprende un segundo

VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en el cual VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido del segundo anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente del primer anticuerpo parental, C es un dominio constante de cadena ligera, (X1)n es un enlace, el cual está opcionalmente presente y, cuando está presente, es diferente a CH1, y (X2)n es una región Fc, que opcionalmente está presente, y (ii') puede unir un par de antígenos. El método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de análisis con al menos un agente de captura, el cual se une a un epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) a fin de formar un complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), (ii) poner en contacto el complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) con al menos un agente de detección, el cual comprende una etiqueta detectable y se une a un epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) que no se une mediante el agente de captura, para formar un complejo de 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 análisis en base a la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo)/agente de detección formado en (ii), en donde al menos un agente de captura y/o al menos un agente de detección es al menos una proteína de unión. Alternativamente, el método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de análisis con al menos un agente de captura, el cual se une a un epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) a fin de formar un complejo de agente de

captura/antígeno (o un fragmento del mismo), y simultanea o secuencialmente, en cualquier orden, poner en contacto la muestra de análisis con el antígeno detectablemente etiquetado (o un fragmento del mismo), el cual puede competir con cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis para unirse al menos a un agente de captura, en donde cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) presente en la muestra de análisis y el antígeno detectablemente etiquetado compiten entre sí para formar un complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) y un complejo de agente de captura/antígeno detectablemente etiquetado (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 análisis en base a la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno detectablemente etiquetado (o un fragmento del mismo) formado en (ii), en donde al menos un agente de captura es al menos una proteína de unión y en donde la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno detectablemente etiquetado (o un fragmento del mismo) es inversamente proporcional a la cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis. Si la muestra de análisis es de un paciente, el método puede comprender además diagnosticar, pronosticar, o evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente. Si el método comprende además evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente, el método comprende además opcionalmente modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente cuando sea necesario mejorar la eficacia. El método se puede adaptar para usarse en un sistema automatizado o un sistema

semi-automatizado.

Se provee todavía otro método más para determinar la presencia de, cantidad o concentración de un antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis. El método comprende evaluar la muestra de análisis del antígeno (o un fragmento del mismo) mediante un inmunoensayo. El inmunoensayo (i) emplea al menos un DVD-Ig que puede unir dos antígenos y al menos una etiqueta detectable y (ii) comprende comparar una señal generada por la etiqueta detectable como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis con una señal generada 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 los cuales cada uno de los calibradores difiere de otros calibradores en la serie por la concentración del antígeno (o un fragmento del mismo). Uno de al menos un DVD-Ig (i') comprende cuatro cadenas de polipéptidos, en donde la primera y tercera cadenas de polipéptidos comprenden un primer VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en el cual VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente del primer anticuerpo parental, C es un dominio constante de cadena pesada, (X1)n es un enlace, el cual está opcionalmente presente y, cuando está presente, es diferente de CH1, y (X2)n es una región Fc, que opcionalmente está presente, y en donde la segunda y cuarta cadenas de polipéptidos comprenden un

segundo VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en el cual VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido del segundo anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), que puede ser igual que o diferente del primer anticuerpo parental, C es un dominio constante de cadena ligera, (X1)n es un enlace, el cual está opcionalmente presente y, cuando está presente, es diferente de CH1, y (X2)n es una región Fc, que opcionalmente está presente, y (ii') puede unir dos antígenos (o fragmentos de los mismos). El método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de análisis con al menos un agente de captura, el cual se une a un epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) a fin de formar un complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), (ii) poner en contacto el complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) con al menos un agente de detección, el cual comprende una etiqueta detectable y se une a un epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) que no se une mediante el agente de captura, para formar un complejo de 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 análisis en base a la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo)/agente de detección formado en (ii), en donde al menos un agente de captura y/o al menos un agente de detección es al menos un DVD-Ig. Alternativamente, el método puede comprender (i) poner en contacto la muestra de análisis con al menos un agente de captura, el cual se une a un epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) a fin de formar un

complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), y simultanea o secuencialmente, en cualquier orden, poner en contacto la muestra de análisis con el antígeno detectablemente etiquetado (o un fragmento del mismo), el cual puede competir con cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis para unirse al menos a un agente de captura, en donde cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) presente en la muestra de análisis y el antígeno detectablemente etiquetado compiten entre sí para formar un complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) y un complejo de agente de captura/antígeno detectablemente etiquetado (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 análisis en base a la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno detectablemente etiquetado (o un fragmento del mismo) formado en (ii), en donde al menos un agente de captura es al menos un DVD-Ig y en donde la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno detectablemente etiquetado (o un fragmento del mismo) es inversamente proporcional a la cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de análisis. Si la muestra de análisis es de un paciente, el método puede comprender además diagnosticar, pronosticar, o evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente. Si el método comprende además evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente, el método comprende además opcionalmente modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente cuando sea necesario mejorar la eficacia. El método se puede adaptar para usarse en un sistema automatizado o un sistema

semi-automatizado.

Con respecto a los métodos de análisis (y kit para el mismo), puede ser posible emplear anticuerpos anti-analitos comercialmente disponibles o métodos para la producción de anti-analito que se describen en la literatura. Los suministros comerciales de varios anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA), Gen Way Biotech, Inc. (San Diego, CA), y R&D Systems (RDS; Minneapolis, MN).

Generalmente, se puede emplear un nivel predeterminado como un estándar de evaluación contra el cual evaluar los resultados obtenidos tras evaluar una muestra de análisis del analito o un fragmento del mismo, por ejemplo, para detectar una enfermedad o el riesgo de enfermedad. Generalmente, al hacer tal comparación, se obtiene el nivel predeterminado al correr un análisis ejecutando un análisis particular un número suficiente de veces y bajo condiciones apropiadas de tal modo que se pueda hacer un vínculo o asociación de la presencia, cantidad o concentración del analito con una etapa particular o término de un padecimiento, enfermedad o condición o con indicios clínicos particulares. Típicamente, se obtiene el nivel predeterminado con análisis de sujetos de consulta (o poblaciones de sujetos). El analito medido puede incluir fragmentos del mismo, productos de degradación del mismo, y/o productos de escisión enzimática del mismo.

En particular, con respecto a un nivel predeterminado que se emplea para monitorear el avance y/o tratamiento del padecimiento, la cantidad o concentración del analito o un fragmento del mismo puede ser “invariable”, “favorable” (o “favorablemente alterado”), o “desfavorable” (o “desfavorablemente alterado”). “Elevado” o “incremento” se refieren a una cantidad o una concentración

en la muestra de análisis que es mayor a un nivel o rango típico o normal (por ejemplo, nivel predeterminado), o es mayor a otro nivel o rango de referencia (por ejemplo, primer muestra o muestra base). El término “disminuido” o “reducido” se refiere a una cantidad o una concentración en la muestra de análisis que es más baja que un nivel o rango típico o normal (por ejemplo nivel predeterminado), o es más baja que otro nivel o rango de referencia (por ejemplo primer muestra o muestra base). El término “alterado” se refiere a una cantidad o una concentración en una muestra que es alterada (incrementada o disminuida) en un nivel o rango típico o normal (por ejemplo, un nivel predeterminado), o en otro nivel o rango de referencia (por ejemplo, primer muestra o muestra base).

El nivel o rango típico o normal del analito se define de acuerdo con la práctica estándar. Debido a que los niveles del analito en algunos casos serán muy bajos, se puede considerar que un así llamado nivel alterado o alterado haya ocurrido cuando hay cualquier cambio neto en comparación con el nivel o rango típico o normal, o nivel o rango de referencia, el cual no se puede explicar por medio de error experimental o variación de muestra. Por consiguiente, el nivel medido en una muestra particular se comparará con el nivel o rango de niveles determinados en muestras similares de un así llamado sujeto normal. En este contexto, un “sujeto normal” es un individuo sin un padecimiento detectable, por ejemplo, y un paciente o población “normal” (algunas veces denominado “control”) es/son el(los) que no exhibe(n) un padecimiento, respectivamente, por ejemplo. Además, dado que el analito no se encuentra habitualmente a un nivel alto en la mayoría de la población humana, se puede considerar como un “sujeto normal” un individuo sin cantidad o concentración incrementada o elevada detectable

sustancial del analito, y un paciente o población “normal” (algunas veces denominado “control”) es/son el(los) que no exhibe(n) una cantidad o concentración de analito incrementada o elevada detectable sustancial. Un “sujeto aparentemente normal” es uno en el cual el analito aún no se ha o actualmente está siendo evaluado. El nivel de un analito se dice que es “elevado” cuando el analito es normalmente indetectable (por ejemplo, el nivel normal es cero, o está dentro de un rango de aproximadamente 25 hasta aproximadamente 75 percentiles de poblaciones normales), aunque se detecta en una muestra de análisis, así como cuando el analito está presente en la muestra de análisis a un nivel mayor al normal. Por consiguiente, entre otros, la descripción provee un método para identificar a un sujeto que tenga, o esté en riesgo de tener, un padecimiento particular, enfermedad, o condición. El método de evaluación también puede involucrar la evaluación de otros marcadores y similares.

De acuerdo con esto, los métodos descritos en la presente se pueden utilizar para determinar si un sujeto tiene o no o está en riesgo o no de desarrollar un padecimiento dado, enfermedad o condición. Específicamente, tal método puede comprender las etapas de (a) determinar la concentración o cantidad en una muestra de análisis del analito de un sujeto (o un fragmento del mismo) (por ejemplo, utilizando los métodos descritos en la presente, o métodos conocidos en la técnica); y (b) comparar la concentración o cantidad del analito (o un fragmento del mismo) determinado en la etapa (a) con un nivel predeterminado, en donde, si la concentración o cantidad del analito determinada en la etapa (a) es favorable con respecto a un nivel predeterminado, entonces se determina que el sujeto tiene o está en riesgo de un padecimiento, enfermedad o condición dada. Sin embargo,

si la concentración o cantidad del analito determinado en la etapa (a) es desfavorable con respecto al nivel predeterminado, entonces se determina que el sujeto tiene o está en riesgo de un padecimiento, enfermedad o condición dada.

Adicionalmente, se provee en la presente un método para monitorear el avance del padecimiento en un sujeto. Opcionalmente el método comprende las etapas de (a) determinar la concentración o cantidad en una muestra de análisis del analito de un sujeto; (b) determinar la concentración o cantidad en una muestra de análisis del analito del sujeto; y (c) comparar la concentración o cantidad del analito que se determina en la etapa (b) con la concentración o cantidad del analito determinado en la etapa (a), en donde si la concentración o cantidad determinada en la etapa (b) es invariable o es desfavorable cuando se compara con la concentración o cantidad del analito determinado en la etapa (a), entonces el padecimiento en el sujeto se determina que ha continuado, avanzado o empeorado. En comparación, si la concentración o cantidad del analito que se determina en la etapa (b) es favorable cuando se compara con la concentración o cantidad del analito que se determina en la etapa (a), entonces el padecimiento en el sujeto se determina que ha cesado, retrocedido, o mejorado.

Opcionalmente, el método comprende además comparar la concentración o cantidad del analito que se determina en la etapa (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 del analito que se determina en la etapa (b), por ejemplo, se altera desfavorablemente con respecto al nivel predeterminado.

Además todavía, los métodos se pueden utilizar para monitorear el tratamiento en un sujeto que recibe tratamiento con una o más composiciones farmacéuticas. Específicamente, tales métodos involucran proveer una primera muestra de análisis de un sujeto antes que se haya administrado al sujeto una o más composiciones farmacéuticas. A continuación, la concentración o cantidad en una primera muestra de análisis del analito de un sujeto se determina (por ejemplo, utilizando los métodos descritos en la presente o que son conocidos en la técnica). Después de que se determina la concentración o cantidad, opcionalmente la concentración o cantidad del analito se compara entonces con un nivel predeterminado. Si la concentración o cantidad del analito que se determina en la primera muestra de análisis es más baja que el nivel predeterminado, entones el sujeto no se trata con una o más composiciones farmacéuticas. Sin embargo, si la concentración o cantidad del analito que se determina en la primera muestra de análisis es más alta que el nivel predeterminado, entones el sujeto se trata con una o más composiciones farmacéuticas durante un periodo de tiempo. El periodo de tiempo que el sujeto se trata con una o más composiciones farmacéuticas se puede determinar por un experto en la técnica (por ejemplo, el periodo de tiempo puede ser de aproximadamente siete (7) días hasta aproximadamente dos años, de manera preferible desde aproximadamente (14) días hasta aproximadamente un (1) año).

Durante el transcurso del tratamiento con una o más composiciones farmacéuticas se obtiene una segunda y subsecuentes muestras de análisis del sujeto. El número de muestras de análisis y el tiempo en el cual dichas muestras de análisis se obtienen del sujeto no es crítico. Por ejemplo, podría obtenerse una

segunda muestra de análisis siete (7) días después de que se administra primero al sujeto una o más composiciones farmacéuticas, una tercera muestra de análisis podría obtenerse dos (2) semanas después de que se administra primero al sujeto una o más composiciones farmacéuticas, una cuarta muestra de análisis podría obtenerse tres (3) semanas después que se administra primero al sujeto una o más composiciones farmacéuticas, una quinta muestra de análisis podría obtenerse cuatro (4) semanas después que se administra primero al sujeto una o más composiciones farmacéuticas, etc.

Después de que se obtiene cada segunda y subsecuente muestra de análisis del sujeto, la concentración o cantidad del analito se determina en la segunda o subsecuente muestra del analito se determina en la segunda o subsecuente muestra de análisis se determina (por ejemplo, utilizando los métodos descritos en la presente o que son conocidos en la técnica. La concentración o cantidad del analito que se determina en cada una de la segunda y subsecuentes muestras de análisis se compara entonces con la concentración o cantidad del analito que se determina en la primera muestra de análisis (por ejemplo, la muestra de análisis que se comparó originalmente de manera opcional con el nivel predeterminado). Si la concentración o cantidad del analito que se determina en la etapa (c) es favorable cuando se compara con la concentración o cantidad del analito que se determina en la etapa (a), entonces el padecimiento en el sujeto se determina que ha cesado, retrocedido o mejorado, y se podrá seguir administrando al sujeto una o más composiciones farmacéuticas de la etapa (b). Sin embargo, si la concentración o cantidad determinado en la etapa (c) es invariable o es desfavorable cuando se compara con la concentración o cantidad del analito que

se determina en la etapa (a), entonces se determina que el sujeto ha seguido, avanzado o empeorado, y se deberá tratar al sujeto con una concentración más alta de una o más composiciones farmacéuticas administradas al sujeto en la etapa (b) o se deberá de tratar al sujeto con una o más composiciones farmacéuticas que son diferentes de las composiciones farmacéuticas administradas al sujeto en la etapa (b). Específicamente, el sujeto se puede tratar con una o más composiciones farmacéuticas que son diferentes de una o más composiciones farmacéuticas que el sujeto ha recibido previamente para disminuir o reducir dicho nivel de analito del sujeto.

Generalmente, para los ensayos que los cuales puede hacerse un análisis repetido (por ejemplo, monitoreando el avance del padecimiento y/o respuesta al tratamiento), se obtiene una segunda o subsecuente muestra de análisis en un periodo en el tiempo después de que se ha obtenido la primera muestra de análisis del sujeto. Específicamente, se puede obtener una segunda muestra de análisis del sujeto minutos, horas, días, semanas o años después de que se ha obtenido la primera muestra de análisis del sujeto. Por ejemplo, la segunda muestra de análisis se puede obtener del sujeto en un periodo de tiempo de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas,

aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas,

aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas, aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 51 semanas, aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 1.5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2.5 años, aproximadamente 3.0 años, aproximadamente 3.5 años, aproximadamente 4.0 años, aproximadamente 4.5 años, aproximadamente 5.0 años, aproximadamente 5.5 años, aproximadamente 6.0 años, aproximadamente 6.5 años, aproximadamente 7.0 años, aproximadamente 7.5 años, aproximadamente 8.0 años, aproximadamente 8.5 años, aproximadamente 9.0 años, aproximadamente 9.5 años o aproximadamente 10.0 años después de que se obtiene la primera muestra de análisis del sujeto.

Cuando se utiliza para monitorear el avance del padecimiento, se puede utilizar el análisis anterior para monitorear el avance del padecimiento en sujetos que padecen de condiciones agudas. Las condiciones agudas, también conocidas como condiciones de cuidados intensivos, se refieren a padecimientos agudos, que ponen la vida en peligro u otras condiciones médicas críticas que involucran, por ejemplo, el sistema cardiovascular o sistema excretorio. Típicamente, las condiciones de cuidados intensivos se refieren a aquellas condiciones que requieren intervención médica aguda en un entorno de hospital (que incluye, pero no está limitada a, la sala de primeros auxilios, unidad de cuidados intensivos, centro de traumas, u otro entorno de atención de emergencia) o la administración por parte de un paramédico u otro personal médico en el campo. Para las condiciones de cuidados intensivos, el monitoreo repetido generalmente se hace dentro de un margen de tiempo, particularmente, minutos, horas o días (por ejemplo, aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5

minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días), y el análisis inicial asimismo se hace dentro de un margen de tiempo más corto, por ejemplo, de aproximadamente minutos, horas o días de la aparición del padecimiento o condición.

Los ensayos también se pueden utilizar para monitorear el avance del padecimiento en sujetos que padecen condiciones crónicas o no agudas. Las condiciones de cuidado no críticas o no agudas, se refieren a condiciones distintas a los padecimientos agudos que ponen en peligro la vida u otras condiciones médicas que involucran, por ejemplo, el sistema cardiovascular y/o sistema excretorio. Típicamente, las condiciones no agudas incluyen aquéllas de largo plazo o duración crónica. Para condiciones no agudas, el monitoreo repetido generalmente se hace con un margen de tiempo más prolongado, por ejemplo, horas, días, semanas, meses o años (por ejemplo, 1 hora, aproximadamente 2

horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas,

aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas, aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 51 semanas, aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 1.5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2.5 años, aproximadamente 3.0 años, aproximadamente 3.5 años, aproximadamente 4.0 años, aproximadamente 4.5 años, aproximadamente 5.0 años, aproximadamente 5.5 años, aproximadamente 6.0 años, aproximadamente 6.5 años, aproximadamente 7.0 años, aproximadamente 7.5 años, aproximadamente 8.0 años, aproximadamente 8.5 años, aproximadamente 9.0 años, aproximadamente 9.5 años o aproximadamente 10.0 años), y el ensayo inicial se hace dentro de un margen de tiempo más prolongado, por ejemplo, aproximadamente horas, días, meses o años de la aparición del padecimiento o condición.

Además, los análisis anteriores se pueden realizar utilizando una primera muestra de análisis obtenido de un sujeto donde la primera muestra de análisis se obtiene de una fuente, tal como orina, suero o plasma. Opcionalmente, los análisis anteriores se pueden repetir utilizando una segunda muestra de análisis obtenida del sujeto donde la segunda muestra de análisis se obtiene de otra fuente. Por ejemplo, si la primera muestra de análisis se obtuvo de la orina, la segunda muestra de análisis se puede obtener de suero o plasma. Los resultados obtenidos de los análisis utilizando la primera muestra de análisis y la segunda

muestra de análisis se pueden comparar. La comparación se puede utilizar para analizar el estatus de un padecimiento o condición en el sujeto.

Además, la presente descripción también se refiere a métodos para determinar si el sujeto está predispuesto a o padece un padecimiento, enfermedad o condición dada se beneficiará del tratamiento. En particular, la descripción se refiere a métodos y productos de diagnóstico acompañantes para analitos. Por consiguiente, el método para “monitorear el tratamiento del padecimiento en un sujeto” que se describe en la presente opcionalmente además también puede abarcar seleccionar o identificar candidatos para terapia.

Por consiguiente, en modalidades particulares, la descripción también provee un método para determinar si un sujeto que tiene, o está en riesgo de, un padecimiento, desorden o condición dada es candidato a terapia. Generalmente el sujeto es uno que ha experimento algún síntoma de un padecimiento, desorden o condición dada o que actualmente se ha diagnosticado que tiene, o está en riesgo de, un padecimiento, desorden o condición dada, y/o que demuestra una concentración o cantidad desfavorable de analito de un fragmento del mismo, que se describe en la presente.

El método comprende opcionalmente un análisis que se describe en la presente, donde el analito se analiza antes y después del tratamiento de un sujeto con una o más composiciones farmacéuticas (por ejemplo, particularmente con un fármaco relacionado con un mecanismo de acción que involucra el analito), con terapia inmunosupresora, o mediante terapia de inmunoabsorción, o donde el analito se analiza después de tal tratamiento y la concentración o la cantidad del analito se compara contra un nivel predeterminado. Una concentración o cantidad

desfavorable de analito observada después de que el tratamiento confirma que el sujeto no se beneficiará al recibir un tratamiento adicional o continuo, mientras que una concentración o cantidad favorable del analito observada después de que el tratamiento confirma que el sujeto se beneficiará al recibir un tratamiento adicional o continúo. Esta confirmación ayuda al manejo de los estudios clínicos, y a la provisión del cuidado mejorado del paciente.

No hace falta decir que, aunque ciertas modalidades de la presente son ventajosas cuando se emplear para analizar un padecimiento, enfermedad o condición dada que se aborda en la presente, los análisis y kits se pueden emplear para analizar el analito en otros padecimientos, enfermedades y condiciones. El método de análisis también puede involucrar el análisis de otros marcadores y similares.

El método de análisis también se puede utilizar para identificar un compuesto que mejore un padecimiento, enfermedad o condición dada. Por ejemplo, una célula que expresa el analito se puede poner en contacto con un compuesto candidato. El nivel de expresión del analito en la célula en contacto con el compuesto se puede comparar con aquél en una célula de control que utiliza el método de análisis descrito en la presente.

II. Kit o Equipo

También se provee un kit para examinar la presencia, cantidad o concentración en la muestra de análisis de un analito (o un fragmento del mismo) en una muestra de análisis. El kit comprende al menos un componente para analizar la muestra de análisis del analito (o un fragmento del mismo) e

instrucciones para analizar la muestra de análisis del analito (o un fragmento del mismo). El al menos un componente para analizar la muestra de análisis del analito (o un fragmento del mismo) puede incluir una composición que comprende un DVD-Ig anti-analito (o un fragmento, una variante o un fragmento o una variante del mismo), que opcionalmente se inmoviliza en una fase sólida.

El kit puede comprender al menos un componente para analizar la muestra de análisis de un analito mediante inmunoensayo, por ejemplo, inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes, e instrucciones para analizar la muestra de análisis de un analito mediante inmunoensayo, por ejemplo inmunoensayo de partículas quimioluminiscentes. Por ejemplo, el kit puede comprender al menos un socio de unión específico de un analito, tal como un anticuerpo monoclonal/policlonal anti-analito (o un fragmento del mismo que se puede unir al analito, una variante del mismo que se puede unir al analito, o un fragmento de una variante que se puede unir al analito) o un DVD-Ig anti-analito ((o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante del mismo), cualquiera de los cuales se puede etiquetar detectablemente. Alternativa o adicionalmente, el kit puede comprender el analito detectablemente etiquetado (o un fragmento del mismo) que se puede unir al anticuerpo monoclonal/policlonal anti-analito o un DVD-Ig anti-analito (o un fragmento, una variante, o un fragmento o una variante del mismo)), el cual puede competir con cualquier analito en una muestra de análisis para unirse a un anticuerpo monoclonal/policlonal anti-analito (o un fragmento del mismo que se puede unir al analito, una variante del mismo que se puede unir al analito, o un fragmento de una variante que se puede unir al analito) o un DVD-Ig anti-analito (o un fragmento, una variante o un fragmento de una

variante del mismo), cualquiera de los cuales se puede inmovilizar en un soporte sólido. El kit puede comprender un calibrador o control, por ejemplo, un analito aislado o purificado. El kit puede comprender al menos un contenedor (por ejemplo, tubo, placas de microtitulación, placas o tiras, que pueden ya sea estar revestidos con un primer socio de unión específico, por ejemplo) para realizar el análisis, y/o un amortiguador, tal como un amortiguador de análisis o un amortiguador de lavado, cualquiera de los cuales se puede proveer como una solución concentrada, una solución de substrato para la etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta enzimática), o una solución de detención. Preferiblemente, el kit comprende todos los componentes, es decir, reactivos, estándares, amortiguadores, diluyentes, etc., que son necesarios para realizar el análisis. Las instrucciones puede estar en forma de papel o forma leíble en computadora, tal como un disco, CD, DVD, o similares.

Más específicamente, se provee un kit para analizar una muestra de análisis de un antígeno (o un fragmento del mismo). El kit comprende al menos un componente para analizar la muestra de análisis de un antígeno (o un fragmento del mismo) e instrucciones para analizar la muestra de análisis de 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 de polipéptidos que comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en la cual VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo parental (o una porción de unión del antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), el cual puede ser igual que o diferente al

primer anticuerpo parental, C es un dominio constante de cadena pesada, (X1)n es un enlace, el cual está opcionalmente presente y, cuando está presente, es diferente 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 de manera opcional se etiqueta detectablemente.

Se provee además otro kit para analizar una muestra de análisis de un antígeno (o un fragmento del mismo). El kit comprende al menos un componente para analizar la muestra de análisis de un antígeno (o un fragmento del mismo) e instrucciones para analizar la muestra de análisis de 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 de polipéptidos que comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en la cual VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo parental (o una porción de unión del antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), el cual puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un dominio constante de cadena ligera, (X1)n es un enlace, el cual está opcionalmente presente y, cuando está presente, es diferente 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 de manera opcional se etiqueta detectablemente.

Se provee además todavía otro kit para analizar una muestra de análisis de un antígeno (o un fragmento del mismo). El kit comprende al menos un componente para analizar la muestra de análisis de un antígeno (o un fragmento

del mismo) e instrucciones para analizar la muestra de análisis de 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 de polipéptidos y una segunda cadena de polipéptidos, en donde el primer polipéptido comprende una primera VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en la cual VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo parental (o una porción de unión del antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), el cual puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un dominio constante de cadena pesada, (X1)n es un enlace, el cual está opcionalmente presente y, cuando está presente, es diferente a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y en donde la segunda cadena de polipéptidos comprende una segunda VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en la cual VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo parental (o una porción de unión del antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), el cual puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un dominio constante de cadena ligera, (X1)n es un enlace, el cual está opcionalmente presente y, cuando está presente, es diferente 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 de manera opcional se etiqueta detectablemente.

Se provee incluso además todavía otro kit para analizar una muestra

de análisis de un antígeno (o un fragmento del mismo). El kit comprende al menos un componente para analizar la muestra de análisis de un antígeno (o un fragmento del mismo) e instrucciones para analizar la muestra de análisis de un antígeno (o un fragmento del mismo), en donde el al menos un componente incluye al menos una composición que comprende un DVD-Ig, que (i') comprende cuatro cadenas de polipéptidos, en donde la primera y tercera cadenas de polipéptidos comprenden una primera VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en la cual VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo parental (o una porción de unión del antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), el cual puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un dominio constante de cadena pesada, (X1)n es un enlace, el cual está opcionalmente presente y, cuando está presente, es diferente a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y en donde la segunda y cuarta cadenas de polipéptidos comprenden una segunda VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en la cual VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo parental (o una porción de unión del antígeno del mismo), VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo parental (o porción de unión del antígeno del mismo), el cual puede ser igual que o diferente al primer anticuerpo parental, C es un dominio constante de cadena ligera, (X1)n es un enlace, el cual está opcionalmente presente y, cuando está presente, es diferente a CH1, y (X2)n es una región Fc, que está opcionalmente presente, y (ii') puede unir dos antígenos (o fragmentos de los mismos), en donde la DVD-Ig de manera opcional se etiqueta

detectablemente.

Cualquier anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-analito o un DVD-Ig anti-analito, o un indicador puede incorporar una etiqueta detectable, tal como un fluoróforo, una porción radioactiva, una enzima, una etiqueta de biotina/avidina, un cromóforo, una etiqueta quimioluminiscente, o similar, o el kit puede incluir reactivos para llevar a cabo el etiquetado detectable. Los anticuerpos, calibradores y/o controles se pueden proveer en contenedores separados o pre-suministrados en un formato de análisis apropiado, por ejemplo, en placas de microtitulación.

Opcionalmente, el kit incluye componentes de control de calidad (por ejemplo, paneles de sensibilidad, calibradores, controles positivos). La preparación de reactivos de control de calidad es bien conocida en la técnica y se describe en insertos de una variedad de productos de inmunodiagnóstico. Opcionalmente se utilizan miembros del panel de sensibilidad para establecer las características del desempeño del análisis, y además opcionalmente son indicadores útiles de la integridad de los reactivos del kit de inmunoensayo, y la estandarización de análisis.

El kit también puede incluir opcionalmente otros reactivos requeridos para realizar un ensayo de diagnóstico o facilitar evaluaciones de control de calidad, tales como amortiguadores, sales, enzimas, co-factores de enzimas, substratos de enzimas, reactivos de detección, y similares. Otros componentes, tales como amortiguadores y soluciones para el aislamiento y/o tratamiento de una muestra de análisis (por ejemplo, reactivos de pretratamiento), también se pueden incluir en el kit. El kit también puede incluir adicionalmente uno o más de otros controles. Uno o más de los componentes del kit se pueden liofilizar, en cuyo caso

el kit también puede comprender además reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados.

Los diversos componentes del kit opcionalmente se proveen en contenedores adecuados cuando es necesario, por ejemplo, una placa de microtitulación. El kit puede incluir además contenedores para contener o almacenar una muestra (por ejemplo, un contenedor o cartucho para una muestra de orina). Cuando es apropiado, el kit opcionalmente también puede contener recipientes de reacción, recipientes de mezclado, y otros componentes que faciliten la preparación de reactivos o la muestra de análisis. El kit también puede incluir uno o más instrumentos para ayudar a obtener una muestra de análisis, tal como una jeringa, pipeta, pinzas, cuchara medidora, o similares.

Si la etiqueta detectable es al menos un compuesto de acridinio, el kit puede comprender al menos una acridinio-9-carboxamida, al menos un aril-éster del acridinio-9-carboxilato, o cualquier combinación de los mismos. Si la etiqueta detectable es al menos un compuesto de acridinio, el kit también puede comprender una fuente de peróxido de hidrógeno, tal como un amortiguador, una solución, y/o al menos una solución básica. Si se desea, el kit puede contener una fase sólida, tal como una partícula magnética, perla, tubo de ensayo, placa de microtitulación, tubo de laboratorio, membrana, molécula de andamio, película, papel filtro, disco o chip.

C. Adaptación del Kit y Método

El kit (o componentes del mismo), así como el método para determinar la presencia, cantidad o concentración de un analito en una muestra de

análisis mediante un análisis, tal como un inmunoensayo se puede adaptar para usarse en una variedad de sistemas automatizados y semi-automatizados (que incluyen aquéllos etiqueta detectable la fase sólida comprende una micropartícula), como se describe por ejemplo, en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,089,424 y 5,006,309, y que se promueven comercialmente, por ejemplo, por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) como ARCHITECT®.

Algunas de las diferencias entre un sistema automatizado o semi-automatizado en comparación con un sistema no automatizado (por ejemplo, ELISA) incluyen el substrato al cual se adhiere el primer socio de unión específico (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal/policlonal anti-analito (o un fragmento del mismo, una variante del mismo, o un fragmento de una variante del mismo) o un DVD-Ig anti-analito (o un fragmento del mismo, una variante del mismo, o un fragmento de una variante del mismo); de cualquier modo, se puede impactar la formación de fase doble y reactividad del analito), y la longitud y duración de la captura, detención y/o cualquier etapa de lavado opcional. Mientras que un formato no automatizado, tal como un ELISA, puede requerir un tiempo de incubación relativamente más prolongado con la muestra y reactivo de captura (por ejemplo, aproximadamente 2 horas), un formato automatizado o semi-automatizado (por ejemplo ARCHITECT®, Abbott Laboratories) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (por ejemplo, aproximadamente 18 minutos para ARCHITECT®. De manera similar, mientras que un formato no automatizado, tal como una ELISA, puede incubar un anticuerpo de detección, tal como el reactivo de conjugado, para un tiempo de incubación relativamente más prolongado (por ejemplo, aproximadamente 2 horas), un formato automatizado o semi-

automatizado (por ejemplo, ARCHITECT®) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (por ejemplo, aproximadamente 4 minutos para el ARCHITECT®).

Otras plataformas disponibles de Abbott Laboratories incluyen, pero no están limitadas a, AxSYM®, IMx® (Patente Norteamericana No. 5,294,404), PRISM®, EIA (perlas), y Quantum™ II, así como otras plataformas. Adicionalmente, los kits de análisis y componentes del kit se pueden emplear en otros formatos, por ejemplo, en sistemas de análisis electroquímicos u otros sistemas de análisis portátiles o punto de atención. La presente descripción, por ejemplo, es aplicable al sistema de inmunoensayo electroquímico del Punto de Cuidado de Abbott comercial que realiza inmunoensayo de fase doble. Se describen inmunosensores y sus métodos de fabricación y operación en dispositivos de análisis de un solo uso, por ejemplo, en las Patentes Norteamericanas Nos. 063,081; 7,419,821; y 7,682,833; y Patentes Norteamericanas Nos. 20040018577 y 20060160164.

En particular, con respecto a la adaptación de un análisis de analitos al sistema I-STAT®, se prefiere la siguiente configuración. Un chip de silicio micro-fabricado se fabrica con un par de electrodos de operación amperométrica de oro y un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata. En uno de los electrodos de operación, se adhieren perlas de poliestireno (0.2 mm de diámetro) con anticuerpo monoclonal/policlonal anti-analito, inmovilizado (o un fragmento del mismo, una variante del mismo, o un fragmento de una variante del mismo), a un revestimiento de polímero a base de alcohol polivinílico sobre el electrodo. Este chip se ensambla en un cartucho I-STAT® con un formato de mecánica de fluidos

adecuado para inmunoensayo. Una porción de la pared de la cámara de contención de muestras del cartucho hay una capa que comprende un socio de unión específico de un analito, tal como un anticuerpo monoclonal/policlonal anti-analito (o un fragmento del mismo, una variante del mismo, o un fragmento de una variante del mismo) o un DVD-Ig anti-analito (o un fragmento del mismo, una variante del mismo, o un fragmento de una variante del mismo que se puede unir al analito), cualquiera de los cuales se puede etiquetar detectablemente. Dentro del saquillo de fluidos del cartucho está un reactivo acuoso que incluye fosfato de p-aminofenol.

En operación, se agrega una muestra que se sospecha contiene un analito a la cámara de contención del cartucho de análisis, y el cartucho se inserta en el lector I-STAT®. Después de que se ha disuelto el socio de unión específico de un analito en la muestra, un elemento de bomba dentro del cartucho impulsa la muestra hacia un conducto que contiene el chip. Aquí el mismo se hace oscilar para propiciar la formación de la fase doble. En la penúltima etapa del ensayo, el fluido se impulsa fuera del saquillo y hacia el conducto para lavar la muestra fuera del chip y hacia una cámara de desechos. En la etapa final del análisis, la etiqueta de fosfatasa alcalina hace reacción con el fosfato de p-aminofenol para escindir el grupo de fosfato y permitir oxidar electroquímicamente el p-aminofenol liberado en el electrodo de operación. En base a la corriente medida, el lector es capaz de calcular la cantidad de analito en la muestra por medio de un algoritmo incluid y curva de calibración determinada en fábrica.

Los métodos y kits que se describen en la presente abarcan necesariamente otros reactivos y métodos para llevar a cabo el inmunoensayo. Por

ejemplo, se abarcan varios amortiguadores tal como se conocen en la técnica y/o que se pueden preparar u optimizar fácilmente para emplearse, por ejemplo, para lavado, como un diluyente conjugado, diluyente de micropartículas, y/o como un diluyente del calibrador. Un diluyente conjugado ejemplificante es el diluyente conjugado ARCHITECT® empleado en ciertos kits (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y que contienen el ácido (N-morfolino)etansulfónico, una sal, un bloqueador de proteína, un agente antimicrobiano, y un detergente. Un diluyente calibrador ejemplificante es el diluyente calibrador humano ARCHITECT® empleado en ciertos kits (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), que comprende un amortiguador que contiene MES, otra sal, un bloqueador de proteína, y un agente antimicrobiano. Adicionalmente, como se describe en la Solicitud Patente Norteamericana No. 61/142,048 presentada el 31 de Diciembre de 2008, puede obtenerse una generación de señales mejorada, por ejemplo, en un formato de cartucho I-Stat, que utiliza una secuencia de ácido nucleico enlazada al anticuerpo de señal como un amplificador de señal.

EJEMPLIFICACIÓN

Ejemplo 1: Diseño, Construcción, y Análisis de una Molécula DVD-Ig™

Ejemplo 1.1: Ensayos Utilizados para Identificar y caracterizar Anticuerpos Parentales y Moléculas de DVD-Ig

Los siguientes ensayos se utilizaron en todos los Ejemplos para identificar y caracterizar anticuerpos parentales y moléculas de DVD-Ig, a menos que se indique de otro modo.

Ejemplo 1.1.1: Ensayos Utilizados para Determinar la Unión y Afinidad de Anticuerpos Parentales y Moléculas de DVD-Ig a Su(s) Antígeno(s) Objetivo

Ejemplo 1.1.1A: ELISA de Unión Directa

Se realizan Enzimoinmunoensayo Absorbentes para seleccionar anticuerpos que se unan a un antígeno objetivo deseado como sigue. Se revisten placas de ELISA de unión elevada (Corning Costar # 3369, Acton, MA) con 100 µL/pozo de 10 µg/ml de antígeno objetivo deseado (R&D Systems, Minneapolis, MN) o proteína de fusión de dominio extra-celular/FC (R&D Systems, Minneapolis, MN) o anticuerpo anti-poliHistidina de ratón monoclonal (R&D Systems # MAB050, Minneapolis, MN) en solución salina amortiguada con fosfato (10X PBS, Abbott Bioresearch Center, Media Prep# MPS-073, Worcester, MA) toda la noche a 4°C. Las placas se lavan cuatro veces con PBS que contiene Tween 20 al 0.02%. Las placas se bloquean con la adición de 300 µL/pozo de solución de bloqueo (polvo de leche deshidratada sin grasa, varios proveedores al por menor, diluida a 2% en PBS) durante 1/2 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan cuatro veces después del bloqueo con PBS que contiene Tween 20 al 0.02%.

Alternativamente, se agregan cien microlitros por pozo de 10 µg/ml de antígeno objetivo deseado marcado con Histidina (His) (R&D Systems, Minneapolis, MN) a placas de ELISA revestidas con anticuerpo anti-poliHistidina de ratón monoclonal que se describe anteriormente y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos se lavan cuatro veces con PBS que contiene Tween 20 al 0.02%.

Se agregan cien microlitros de preparaciones de anticuerpo o DVD-Ig

diluidas en solución bloqueadora que se describe anteriormente a la placa de antígeno objetivo deseado o placa de fusión de antígeno/FC objetivo deseada o el anticuerpo anti-poliHistidina/placa de antígeno objetivo deseado marcado con Histidina, preparadas como se describe anteriormente y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos se lavan cuatro veces con PBS que contiene Tween 20 al 0.02%.

Se agregan cien microlitros de anticuerpo conjugado con HRP específico de Ig-FC anti-humano de cabra 10 ng/mL (Southern Biotech # 2040-05, Birmingham, AL) a cada pozo de la placa del antígeno objetivo deseado o placa del antígeno objetivo deseado o placa de anticuerpo anti-poliHistidina/antígeno objetivo deseado marcado con Histidina. Alternativamente, se agregan cien microlitros de anticuerpo conjugado con HRP específico de cadena ligera IgG-kappa anti-humana de cabra 10 ng/mL (Southern Biotech # 2060-05 Birmingham, AL) a cada pozo de la placa de fusión de antígeno/FC objetivo deseado y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan 4 veces con PBS que contiene Tween 20 al 0.02%.

Se agregan cien microlitros de solución de TMB reforzada (Neogen Corp. #308177, K Blue, Lexington, KY) a cada pozo y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene mediante la adición de ácido sulfúrico 1N 50 µL. Las placas se leen espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm.

En el ELISA de Unión Directa, algunas veces no se observa la unión, probablemente debido al sitio de unión de anticuerpos en el antígeno objetivo ya sea se “enmascara” o el antígeno se “deforma” cuando se reviste en la superficie

plástica. La incapacidad de una molécula de DVD-Ig de unir su objetivo también puede deberse a la limitación estérica impuesta en las moléculas de DVD-Ig mediante el formato de ELISA de Unión Directa. Los anticuerpos parentales y moléculas de DVD-Ig que no se unen en el formato de ELISA de Unión Directa puede unirse al antígeno objetivo en otros formatos de ELISA, tal como FACS, Biacore, o bioensayo. La no unión de una molécula de DVD-Ig también se restaura ajustando la longitud del enlace entre los dos dominios variables de la molécula de DVD-Ig, como se muestra previamente.

Ejemplo 1.1.1.B: <u>ELISA de Captura</u>

Para determinar la unión de proteínas parentales y de DVD-Ig a IL-1α o IL-1β mediante ELISA de captura, se incubaron placas de ELISA (Nunc, MaxiSorp, Rochester, NY) toda la noche a 4°C con anticuerpo Fc anti-humano diluido en amortiguador Pierce Coat a 2 µg/ml (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Las placas se lavaron cinco veces en amortiguador de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0.05%) y se bloquearon 1 hora a 25°C con 200 µL por pozo de amortiguador bloqueador superblock (Thermo scientific, #37515). El amortiguador bloqueador se removió, y se agregaron 2 µg/ml de cada anticuerpo o molécula de DVD-Ig en PBS que contiene superblock al 10%, Tween 20 al 0.5% a los pozos a 100 µL por pozo y se incubó a 25°C durante 1 hora. Los pozos se lavaron cinco veces en 1XPBST, y 1 µg/ml de antígeno biotinilado se tituló a diluciones en serie de 1:6 (para un rango de µg a pg en PBS que contiene superblock al 10%, y tween 20 al 0.05%). Cada dilución de antígeno se agregó entonces a las placas y se incubó durante 1 hora a 25°C. Los pozos se lavaron

cinco veces en 1XPBST y se incubaron durante 1 hora a 25°C con estreptavidina poliHRP (KPL #474-3000, Gaithersburg, MD). Los pozos se lavaron cinco veces en 1XPBST, y se agregaron 100 µL de ULTRA-TMB ELISA (Pierce, Rockford, IL) por pozo. Después del desarrollo de color la reacción se detuvo con HCl 1N y se mide la absorbancia a 450 nM. La Tabla 3 muestra datos del ELISA de captura para construcciones de DVD-Ig que focalizan la IL-1α y IL-1β, y el valor numérico indica la unión de los anticuerpos anti-IL-Iα y anti-IL-Iβ humanos, o proteínas de DVD-Ig anti-IL-Iα/β a IL-Iα y/o IL-Iβ humanas.

Tabla 3: ELISA DE Captura de Anticuerpos Parentales y Construcciones de DVD-Ig de IL-Iα e IL-Iβ

Anticuerpo Parental o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-terminal	Dominio Variable C-terminal	ELISA de Captura VD N-terminal EC50 (pM)	ELISA de Captura VD C-terminal EC50 (pM)
E26.13	IL-1β		7.7	
3D12.8	IL-1α		28	
3D12.16	IL-1α		10	
3D12-362-10/372-15	IL-1α		7.0	
3D12r16	IL-1α		72.0	
E26.35	IL-1β		10.4	
E26.35-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	6.3	10.6
1B12.1	IL-1β		39.9	
1B12.1-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	40.9	8.7
1B12.3	IL-1β		43.8	
1B12.3-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	35.2	20.8
1B12.6	IL-1β		45.9	
1B12.6-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	65.1	9.9

Ejemplo 1.1.1.C: Determinación de Afinidad Utilizando Tecnología BIACORE

Tabla 4: Reactivo Utilizado en Análisis Biacore

Antígeno	Designación del Proveedor	Proveedor	Catálogo #
IL-1α	IL-1α Humana Recombinante	R&D systems	200-LA/CF
IL-1β	IL-1β Humana Recombinante	R&D systems	201-LB

Métodos BIACORE:

El ensayo BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) determina la afinidad de anticuerpos o molécula de DVD-Ig con mediciones cinéticas de constantes dentro del índice y fuera de índice. La unión de los anticuerpos o molécula de DVD-Ig a un antígeno objetivo (por ejemplo, un antígeno objetivo recombinante purificado) se determina por medio de mediciones a base de resonancia de plasmón superficial con el instrumento Biacore® 1000 o 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia) utilizando HBS-EP de corrida (HEPES 10 mM [pH 7.4], NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, y el surfactante P20 al 0.005%) a 25°C. Todos los químicos se obtienen Biacore® AB (Uppsala, Suecia) o del algún otro modo de una fuente diferente que se describe el texto. Por ejemplo, aproximadamente 5000 RU de IgG anti-ratón de cabra (Fcγ), anticuerpo policlonal de fragmento específico (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4.5) se inmoviliza directamente a través de un chip biosensor de calidad investigación CM5 utilizando un kit de acoplamiento con amina estándar de acuerdo a las instrucciones y procedimientos del fabricante a 25 µg/ml. Las porciones sin reaccionar en la superficie del biosensor se bloquean con etanolamina. La superficie de carboximetil-dextrano modificada en la celda de flujo 2 y 4 se utiliza como una superficie de reacción. El carboximetil-dextrano no modificado sin IgG anti-ratón de cabra en la celda de flujo 1 y 3 se utiliza como la superficie de

referencia. Para el análisis cinético, se adaptan ecuaciones de proporción derivadas del modelo de unión de Langmuir 1:1 simultáneamente con fases de asociación y disociación en todas las ocho inyecciones (utilizando análisis de adecuación global) con el uso del programa informático Biaevaluation 4.0.1. Los anticuerpos purificados o molécula de DVD-Ig se diluyen en solución salina amortiguada con HEPES para capturarse a través de superficies de reacción específicas de IgG anti-ratón de cabra. Los anticuerpos o molécula de DVD-Ig a capturarse como un ligando (25 µg/ml) se inyectan en matrices de reacción a una relación de flujo de 5 µl/min. Las constantes de relación de asociación y disociación, k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (s^{-1}) se determinan bajo una relación de flujo continua de 25 µl/minuto. Las constantes de relación se derivan haciendo mediciones de unión cinéticas en diferentes concentraciones de antígenos que varían de 10 - 200 nM. La constante de disociación de equilibrio (M) de la reacción entre los anticuerpos o moléculas de DVD-Ig y el antígeno objetivo se calcula entonces a partir de las constantes de relación cinética mediante la siguiente fórmula: KD = k_{off}/k_{on}. La unión se registra como una función de tiempo y constantes de relación cinética se calculan. En este ensayo, las relaciones dentro del índice se pueden medir tan rápido como 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ y relaciones fuera de índice se pueden medir tan lento como 10^{-6} s^{-1}.

Tabla 5: <u>Análisis BIACORE de Anticuerpos Parentales y Constructos de DVD-Ig</u>

Anticuerpo Parental o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-Terminal (VD)	Dominio Variable C-Terminal (VD)	k_{on} (M-1s-1)	k_{off} (s-1)	K_D (M)
E26.13	IL-1β		$9.5 \times 10^{+5}$	4.23×10^{-5}	4.45×10^{-11}
E26.35	IL-1β		$1.02 \times 10^{+6}$	2.50×10^{-5}	2.39×10^{-11}
1B12.1	IL-1β		$5.55 \times 10^{+6}$	1.03×10^{-3}	1.86×10^{-10}
1B12.3	IL-1β		$5.73 \times 10^{+6}$	1.18×10^{-3}	2.06×10^{-10}
1B12.6	IL-1β		$6.20 \times 10^{+6}$	1.25×10^{-3}	2.02×10^{-10}
3D12.8	IL-1α		$2.04 \times 10^{+6}$	2.74×10^{-3}	1.35×10^{-9}
3D12.16	IL-1α		$1.21 \times 10^{+6}$	2.53×10^{-3}	2.09×10^{-9}
3D12r16	IL-1α		$9 \times 10^{+5}$	2.77×10^{-5}	3.1×10^{-11}
3D12.10/15	IL-1α		$3.55 \times 10^{+5}$	4.10×10^{-5}	1.15×10^{-10}
E26.13-SS-3D12.10/15	IL-1α		$5.69 \times 10^{+4}$	3.25×10^{-5}	5.69×10^{-10}
E26.13-SS-3D12.10/15		IL-1β	$1.66 \times 10^{+6}$	2.65×10^{-5}	1.61×10^{-11}
E26.35-SS-3D12.10/15	IL-1α		$5.81 \times 10^{+4}$	2.34×10^{-5}	4.03×10^{-10}
E26.35-SS-3D12.10/15		IL-1β	$1.28 \times 10^{+6}$	7.85×10^{-6}	6.11×10^{-12}
E26.35-SS-3D12r16	IL-1α		$9.36 \times 10^{+4}$	$<1 \times 10^{-6}$	$<1 \times 10^{-11}$
E26.35-SS-3D12r16		IL-1β	$1.17 \times 10^{+6}$	4.11×10^{-6}	3.52×10^{-12}
1B12.1-SS-3D12r16	IL-1α		$1.11 \times 10^{+5}$	1.33×10^{-5}	1.2×10^{-10}
1B12.1-SS-3D12r16		IL-1β	$3.08 \times 10^{+6}$	1.10×10^{-3}	3.55×10^{-10}
1B12.3-SS-3D12r16	IL-1α		$4.39 \times 10^{+4}$	$<1 \times 10^{-6}$	$<2.30 \times 10^{-11}$
1B12.3-SS-3D12r16		IL-1β	$3.70 \times 10^{+6}$	1.17×10^{-3}	3.15×10^{-10}
1B12.6-SS-3D12r16	IL-1α		$5.62 \times 10^{+4}$	$<1 \times 10^{-6}$	$<1.78 \times 10^{-11}$
1B12.6-SS-3D12r16		IL-1β	$2.93 \times 10^{+6}$	1.84×10^{-3}	6.26×10^{-10}

La unión de todos los constructos de DVD-Ig caracterizados por la tecnología Biacore se mantuvo y fue comparable con el de los anticuerpos parentales. Los dominios variables N-terminales se unieron con una alta afinidad similar como el anticuerpo parental.

Tabla 6: <u>Análisis BIACORE de Anticuerpos Parentales y Constructos de DVD-</u>

Ig en IL-α e IL-1β de Mono Macaco

Anticuerpo Parental o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-Terminal (VD)	Dominio Variable C-Terminal (VD)	k_{on} (M-1s-1)	k_{off} (s-1)	K_D (M)
E26.13	IL-1β		$1.23 \times 10^{+6}$	1.79×10^{-5}	1.46×10^{-11}
E26.35	IL-1β		$9.21 \times 10^{+5}$	1.29×10^{-5}	1.4×10^{-11}
3D12.10/15	IL-1α		$3.89 \times 10^{+5}$	2.25×10^{-5}	5.78×10^{-11}
E26.35-SS-3D12r16	IL-1α		$1.01 \times 10^{+5}$	8.23×10^{-6}	8.11×10^{-11}
E26.35-SS-3D12r16		IL-1β	$3.95 \times 10^{+5}$	7.91×10^{-6}	2.0×10^{-11}

La unión de todos los constructos de DVD-Ig caracterizados por la tecnología Biacore se mantuvo y fue comparable con el de los anticuerpos parentales. Los dominios variables N-terminales se unieron con una alta afinidad similar como el anticuerpo parental.

Ejemplo 1.1.2: Ensayos Utilizados para Determinar la Actividad Funcional de Anticuerpos Parentales y Molécula de DVD-Ig

Ejemplo 1.1.2.A: Bioensayo con Citocina

La capacidad de un anticuerpo parental anti-citocina o un factor anti-crecimiento o molécula de DVD-Ig que contiene secuencias anti-citocina o de factor anti-crecimiento para inhibir o neutralizar una citocina objetivo o bioactividad del factor de crecimiento se analiza determinando el potencial inhibidor del anticuerpo o molécula de DVD-Ig. Por ejemplo, puede utilizarse la capacidad de un anticuerpo anti-IL-4 para inhibir la producción de IgE mediada por IL-4. Por ejemplo, se aíslan células B simples humanas de la sangre periférica, respectivamente, de capas de leucocitos mediante centrifugación de densidad

Ficoll-paque, seguido por separación magnética con perlas MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) específico para anticuerpos F(ab)2 de cabra etiquetados con FITC sIgD humana seguido por perlas MACS anti-FITC. Las células B simples clasificadas magnéticamente se ajustan a 3 x 10^5 células por ml en XVI 5 y se colocan en placas en 100 µl por pozo de placas de 96 pozos en una distribución de 6 x 6 en el centro de la placa, rodeada por pozos llenados con PBS durante los 10 días de cultivo a 37°C en la presencia de CO_2 al 5%. Cada placa se prepara por anticuerpo a analizarse, que consiste de 3 pozos cada uno de controles no inducidos e inducidos y repeticiones quintuplicadas de titulaciones de anticuerpos que comienzan en 7 g/ml y que se realiza en un dilución triple hasta concentraciones finales de 29 ng/ml agregadas en pre-dilución cuatro veces concentrada 50 µl. Para inducir la producción de IgE, se agrega rhIL-4 a 20 ng/ml más el anticuerpo monoclonal anti-CD40 (Novartis, Basilea, Suiza) a concentraciones finales de 0.5 g/ml en 50 µl cada uno a cada pozo, y las concentraciones de IgE se determinan al final del periodo de cultivo mediante un método ELISA de fase doble estándar.

Ejemplo 1.1.2.B: <u>Ensayo de Liberación de Citocina</u>

Se analiza la capacidad de un anticuerpo parental o molécula de DVD-Ig para causar la liberación de citocina. Se extrae sangre periférica de tres donadores saludables mediante venopunción en tubos vacutainer con heparina. La sangre entera se diluye 1:5 con medio RPMI-1640 y se coloca en placas de cultivo de tejido de 24 pozos en 0.5 mL por pozo. Los anticuerpos anti-citocina (por ejemplo, anti-IL-4) se diluyen en RPMI-1640 y se colocan en las placas a 0.5

mL/pozo para dar concentraciones finales de 200, 100, 50, 10, y 1 g/mL. La dilución final de sangre entera en las placas de cultivo es de 1:10. Se agregan LPS y PHA a pozos separados a una concentración final de 2 µg/mL y 5 µg/mL como un control positivo para liberación de citocina. Se utiliza IgG humana policlonal como anticuerpo de control negativo. El experimento se realiza por duplicado. Las placas se incuban a 37°C en CO_2 al 5%. Veinticuatro horas después el contenido de los pozos se transfiere a tubos de ensayo y se giran durante 5 minutos a 1200 rpm. Se recolectan sobrenadantes libres de células y se congelan para ensayos de citocina. Las células restantes 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 del medio (para llevar el volumen al mismo nivel que las muestras de sobrenadantes libres de células) y se recolectan preparaciones y se congelan para los ensayos de citocina. Se examinan de los sobrenadantes libres de células y lisados celulares mediante ELISA, por ejemplo, para niveles de IL-8, IL-6, IL-Iβ, IL-1RA, o TNF-α.

Ejemplo 1.1.2.C: <u>Estudio de Reactividad Cruzada de la Citocina</u>

Se analiza la capacidad de un anticuerpo parental anti-citocina o molécula de DVD-Ig dirigida a una citocina(s) de interés para hacer reacción de manera cruzada con otras citocinas. Los anticuerpos parentales o molécula de DVD-Ig se inmovilizan en una matriz del biosensor Biacore. Un mAb Fc anti-humano se enlaza covalentemente a través de grupos de amina libre a la matriz de dextrano activando primero los grupos carboxilo en la matriz con N-hidroxisuccinimida (NHS) 100 mM y clorhidrato de N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) 400 mM. Aproximadamente, 50 µL de cada anticuerpo o

preparación de DVD-Ig a una concentración de 25 g/mL, diluido en acetato de sodio, pH 4.5, se inyecta a través del biosensor activado y aminas libres en la proteína se unen directamente a los grupos de carboxilo activado. Típicamente, se inmovilizan 5000 Unidades de Resonancia (RUs). Los ésteres EDC de matriz sin reaccionar se desactivan mediante una inyección de etanolamina 1 M. Se prepara una segunda celda de flujo como un estándar de referencia inmovilizando IgG1/K humana utilizando el kit de acoplamiento de amina estándar. Las mediciones SPR se realizan utilizando el chip biosensor CM. Todos los antígenos a analizarse en la superficie del biosensor se diluyen en amortiguador de corrida HBS-EP que contiene P20 al 0.01%.

Para examinar la especificidad de unión de la citocina, se inyecta un exceso de la citocina de interés (100 nM, por ejemplo, humana recombinante soluble) a través del anticuerpo parenteral anti-citocina o superficie del biosensor inmovilizado con molécula de DVD-Ig (tiempo de contacto 5 minutos). Antes de la inyección de la citocina de interés e inmediatamente después, el amortiguador de HBS-EP solo fluye a través de cada celda de flujo. La diferencia neta en las señales entre la línea base y el punto correspondiente aproximadamente a 30 segundos después del completamiento de la inyección de citocina se toman para representar el valor de unión final. De nuevo, la respuesta se mide en Unidades de Resonancia. Las matrices del biosensor se regeneran utilizando HCl 10 mM antes de la inyección de la siguiente muestra donde se observa un evento de unión, de algún otro modo se inyectó el amortiguador de corrida en las matrices. También se inyectan citocinas humanas (por ejemplo IL-Ia, IL-Iβ, 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 de IgG1/K de ratón inmovilizada para registrar cualquier fondo de unión no específico. Al preparar una superficie de referencia y reacción, Biacore puede sustraer automáticamente los datos de la superficie de referencia de los datos de la superficie de reacción a fin de eliminar la mayoría del cambio de índice refractivo y ruido de inyección. Por consiguiente, es posible averiguar la verdadera respuesta de unión atribuida a una reacción de unión del anticuerpo anti-citocina o molécula de DVD-Ig.

Cuando se inyecta una citocina de interés a través del anticuerpo anti-citocina inmovilizado, se observa una unión significativa. La regeneración de HCl 10 mM se remueve completamente de todas las proteínas asociadas no covalentemente. El examen del sensograma muestra que la unión del anticuerpo anti-citocina inmovilizado o molécula de DVD-Ig a la citocina soluble es fuerte y robusta. Después de confirmar el resultado esperado con la citocina de interés, se analiza el resto del panel de citocinas humanas recombinantes, de cada anticuerpo o molécula de DVD-Ig por separado. La cantidad de citocina unida o no unida al anticuerpo anti-citocina o molécula de DVD-Ig de cada ciclo de inyección se registra. Los resultados de tres experimentos independientes se utilizan para determinar el perfil de especificidad de cada anticuerpo o molécula de DVD-Ig. Se seleccionan anticuerpos o molécula de DVD-Ig con la unión esperada a la citocina de interés y que no se unen a cualquier otra citocina.

Ejemplo 1.1.2.D: <u>Reactividad Cruzada del Tejido</u>

Los estudios de reactividad cruzada del tejido se hacen en tres

etapas, con la primera etapa que incluye crio-secciones de 32 tejidos, la segunda etapa incluye hasta 38 tejidos, y la 3ª etapa incluye tejidos adicionales de 3 adultos no relacionados entre sí como se describe más adelante. Los estudios típicamente se hacen en niveles de dos dosis.

Etapa 1: Se fijan crio-secciones (aproximadamente 5 µm) de tejidos humanos (32 tejidos (típicamente: Glándula Adrenal, Tracto Gastrointestinal, Próstata, Vejiga, Corazón, Musculo Esquelético, Células Sanguíneas, Riñón, Piel, Médula Ósea, Hígado, Médula Espinal, Seno, Pulmón, Bazo, Cerebelo, Nódulo Linfático, Testículos, Corteza Cerebral, Ovario, Timo, Colon, Páncreas, Tiroides, Endotelio, Paratiroides, Uréter, Ojos, Pituitaria, Útero, Trompa de Falopio y Placenta) de un donador humano obtenido en la autopsia o biopsia) y se secan sobre un portaobjetos. La tinción con peroxidasa de secciones de tejido se realiza, utilizando el sistema de avidina-biotina.

Etapa 2: Crio-secciones (aproximadamente 5 µm) de tejidos humanos, 38 tejidos (que incluyen suprarrenal, sangre, vaso sanguíneo, médula ósea, cerebelo, cerebro, cuello del útero, esófago, ojos, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, nódulo linfático, glándula mamaria del seno, ovario, oviducto, páncreas, paratiroides, nervio periférico, pituitaria, placenta, próstata, glándula salivaría, piel, intestino delgado, médula espinal, bazo, estomago, músculo estriado, testículos, timo, tiroides, amígdala, uréter, vejiga urinaria, y útero) de 3 adultos sin relación entre sí, obtenidos en la autopsia o biopsia) se fijan y secan en el portaobjetos. La tinción con peroxidasa de secciones de tejido se realiza, utilizando el sistema de avidina-biotina.

Etapa 3: Crio-secciones (aproximadamente 5 µm) de tejidos

humanos, 38 tejidos (que incluyen suprarrenal, sangre, vaso sanguíneo, médula ósea, cerebelo, cerebro, cuello del útero, esófago, ojos, corazón, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, nódulo linfático, glándula mamaria del seno, ovario, oviducto, páncreas, paratiroides, nervio periférico, pituitaria, placenta, próstata, glándula salivaría, piel, intestino delgado, médula espinal, bazo, estómago, músculo estriado, testículos, timo, tiroides, amígdala, uréter, vejiga urinaria, y útero) de 3 adultos sin relación entre sí, obtenidos en la autopsia o biopsia) se fijan y secan en el portaobjetos. La tinción con peroxidasa de secciones de tejido se realiza, utilizando el sistema de avidina-biotina.

El anticuerpo o molécula de DVD-Ig se incuba con la IgG anti-humana biotinilada secundaria y se desarrolla en complejo inmune. El complejo inmune a las concentraciones finales de 2 y 10 µg/mL de anticuerpo o molécula de DVD-Ig se agrega en secciones de tejido en un portaobjetos y luego las secciones de tejido se hacen reaccionar durante 30 minutos con un kit de avidina-biotina-peroxidasa. Subsecuentemente, se aplica DAB (3,3'-diaminobenzidina), un substrato para la reacción de peroxidasa, durante 4 minutos para la tinción del tejido. Se utilizan perlas de antígeno Sepharose como secciones de tejido de control positivo. El antígeno objetivo y estudios de bloqueo del suero humano sirven como controles adicionales. El complejo inmune en las concentraciones finales de 2 y 10 µg/mL del anticuerpo o molécula de DVD-Ig se pre-incuba con antígeno objetivo (concentración final de 100 µg/ml) o suero humano (concentración final al 10%) durante 30 minutos, y luego se agregan en las secciones de tejido en el portaobjetos y luego las secciones de tejido se hacen reaccionar durante 30 minutos con un kit de avidina-biotina-peroxidasa. Subsecuentemente, se aplica

DAB (3,3'-diaminobenzidina), un substrato para la reacción de peroxidasa, durante 4 minutos para la tinción del tejido.

Se considera que cualquier tinción específica es ya sea una reacción esperada (por ejemplo, consistente con la expresión del antígeno) o inesperada en base a la expresión conocida del antígeno objetivo en cuestión. Se califica la intensidad y frecuencia de cualquier tinción que se considere específica. La tinción de tejidos entre la etapa 2 (tejido humano) y etapa 3 (tejido de mono macaco) se considera que es similar o diferente.

Ejemplo 1.1.2.E: Bioensayo de IL-1α/β y Ensayo de Neutralización

Ejemplo 1.1.2.E.1: Bioensayo de IL-1α e IL-1β Humana para Anticuerpos Monoclonales

Para examinar la actividad funcional de los anticuerpos de IL-1 alfa anti-humana y la IL-1 beta anti-humana en la invención, los anticuerpos se detectan en un bioensayo MRC-5. La línea celular MRC-5 es una línea celular de fibroblastos de pulmón humano que produce IL-8 humana en respuesta a la IL-1 humana alfa o beta de una manera dependiente de la dosis. La línea celular MRC-5 también hace reacción cruzada con IL-1 alfa y la IL-1 beta de mono macaco. La potencia del anticuerpo se basa en la capacidad del anticuerpo para inhibir la citocina hIL-9 inducida con IL-alfa o beta. Las células MRC-5 (originalmente obtenidas de ATCC) se hacen crecer y cultivan en MEM complete que contiene

FBS al 10% en una incubadora con CO_2 al 5%, 37°C. El día anterior al ensayo, las células MRC5 se colocan en placas en un volumen de 100 µL en una placa de fondo plano de 96 pozos (Costar# 3599) a 1 x 10^4 luego se incuban toda la noche a 37°C, CO_2 al 5%. El día del ensayo, se prepara un anticuerpo 4x de trabajo y stock de antigeno de IL-1α humana o IL-1β humana, o IL-1α cino o IL-1β cino en medio MEM completo. Se realiza una dilución de anticuerpo en serie de ocho puntos (rango de 10-0.0001 nM) en MEM completo en placas de ensayo en bloques. Se transfieren sesenta y cinco µL de anticuerpo diluido por cuadriplicado a una placa de fondo en v de 96 pozos (Costar# 3894) luego se agregan 65 µL de un stock 4x de antígeno apropiado (200 pg/mL) a pozos que contienen el anticuerpo. Se colocan sesenta y cinco µL de antígeno (200 pg/mL) en pozos de control de antígeno con 65 µL de medios MEM. Los pozos de control de los medios reciben 130 µL de medios MEM. Después de 1 hora de incubación, se agregan 100 µL de la mezcla Ab/Ag a las células MRC-5. Los volúmenes de los pozos se igualan a 200 µL/pozo y todos los reactivos están a una concentración final de 1x. Después de una incubación de toda la noche (16-24 horas), 150 µL de sobrenadante se transfiere a una placa de fondo redondo de 96 pozos (Costar# 3799) y las placas se colocan en un congelador a -20°C. Se analizan los niveles de hIL-8 de los sobrenadantes utilizando un kit para ELISA IL-8 humana (R&D Systems, Minneapolis, MN) o hIL-8 MSD (kit de quimioluminiscencia). La potencia de neutralización del anticuerpo se determina calculando la inhibición porcentual en relación al valor de control del antígeno solo.

Ejemplo 1.1.2.E.2: <u>Bioensayo de IL-1α/β para Proteínas de DVD-Ig Anti-IL-1</u>

α/β

Para examinar la actividad funcional de las proteínas de DVD-Ig de IL-1 alfa y beta anti-humana en la invención, las proteínas de DVD-Ig se detectan en un bioensayo MRC-5. La línea celular MRC-5 es una línea celular de fibroblastos de pulmón humano que produce IL-8 humana en respuesta tanto a la IL-1 humana alfa y beta e IL-1 cino alfa y beta de una manera dependiente de la dosis. La potencia de la molécula de DVD-Ig se basa en la capacidad de la molécula de DVD-Ig de inhibir la citocina hIL-8 inducida con IL-1. Las células MRC-5 (originalmente obtenidas de ATCC) se hacen crecer y cultivan en MEM complete que contiene FBS al 10% en una incubadora con CO_2 al 5%, 37°C. El día anterior al ensayo, las células MRC5 se colocan en placas en un volumen de 100 µL en una placa de fondo plano de 96 pozos (Costar# 3599) a 1 x 10^4 luego se incuban toda la noche a 37°C, CO_2 al 5%. El día del ensayo, se prepara un stock de trabajo 4x de trabajo de molécula de DVD-Ig, se prepararon stocks de antígeno de hIL-1α e hIL-1β o IL-1α cino e IL-1β cino en medio MEM completo. El día del ensayo, se realizó una dilución en serie de la molécula de DVD-Ig de ocho puntos (rango de 10-0.0001 nM) en MEM completo en placas de ensayo en bloques. Se transfieren sesenta y cinco µL de molécula de DVD-Ig diluida por cuadriplicado a una placa de fondo en v de 96 pozos (Costar# 3894) luego se agregan 65 µL de ya sea un stock 4x (200 pg/mL) de IL-1α o IL-1β a pozos que contienen la molécula de DVD-Ig. Se colocan sesenta y cinco µL de IL-1α (200 pg/mL) o 65 µL de IL-1β (200 pg/mL) en pozos de control de antígeno con 65 µL de medios MEM. Los pozos de control con antígenos con 65 µL de medios MEM. Los pozos de control de los medios recibieron 130 µL de los medios MEM. Después de 1 hora de incubación, se

agregan 100 µL de la mezcla de DVD-Ig/AG a las células MRC-5. Los volúmenes de los pozos se igualan a 200 µL/pozo y todos los reactivos estuvieron a una concentración final de 1x. Después de una incubación de toda la noche (16-24 horas), 150 µL de sobrenadante se transfieren a una placa de fondo redondo de 96 pozos (Costar# 3799) y las placas se colocan en un congelador a -20°C. Se analizan los niveles de hIL-8 de los sobrenadantes utilizando un kit para ELISA IL-8 humana (R&D Systems, Minneapolis, MN) o hIL-8 MSD (kit de quimioluminiscencia). La potencia de neutralización de la molécula de DVD-Ig se determinó calculando la inhibición porcentual en relación a la IL-1α o el valor de control de solo de IL-1β. La Tabla 7 demuestra la neutralización de IL-1α humana mediante el anticuerpo parental de IL-1α y proteínas de DVD-Ig de IL-1α e IL-1β. La Tabla 8 demuestra la neutralización de IL-1β humana mediante el anticuerpo parental de IL-1β y proteínas de DVD-Ig de IL-1α e IL-1β. La Tabla 9 demuestra la neutralización de IL-1α de mono macaco mediante el anticuerpo parental de IL-1α y proteínas de DVD-Ig de IL-1α e IL-1β. La Tabla 10 demuestra la neutralización de IL-1β de mono macaco mediante el anticuerpo parental de IL-1β y proteínas de DVD-Ig de IL-1α e IL-1β.

Tabla 7: Ensayo de Neutralización de IL-1α Humana Con Anticuerpo Parental de IL-1α y Constructos de DVD-Ig

Anticuerpo Parental o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-Terminal (VD)	Dominio Variable C-Terminal (VD)	Ensayo de Neutralización de IL-1α Humana VD N-Terminal EC50 nM	Ensayo de Neutralización de IL-1α Humana VD C-Terminal EC50 nM
3D12.10/15	IL-1α		0.0057	
3D12r16	IL-1α		0.00056	
E26.35-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	NA	0.0355
E26.13-SS-3D12.10/15	IL-1β	IL-1α	NA	0.0538
E26.35-SS-3D12.10/15	IL-1β	IL-1α	NA	0.0479
1B12.1-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	NA	0.0307
1B12.3-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	NA	0.0687
1B12.6-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	NA	0.0648

NA: No aplicable.

Todas las moléculas de DVD-Ig mostraron la neutralización en el ensayo de neutralización de IL-1α/β de MRC5.

Tabla 8: <u>Ensayo de Neutralización de IL-1β Humana Con Anticuerpo Parental de IL-1β y Constructos de DVD-Ig</u>

Anticuerpo Parental o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-Terminal (VD)	Dominio Variable C-Terminal (VD)	Ensayo de Neutralización de IL-1β Humana VD N-Terminal EC50 nM	Ensayo de Neutralización de IL-1β Humana VD C-Terminal EC50 nM
E26.13	IL-1β		0.0157	
E26.13-SS-3D12.10/15	IL-1β	IL-1α	0.0099	NA
E26.35	IL-1β		0.0072	
E26.35-SS-3D12.10/15	IL-1β	IL-1α	0.002	NA
E26.35-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	0.0029	NA

1B12.1	IL-1β		0.15	
1B12.1-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	2.05	NA
1B12.3	IL-1β		0.30	
1B12.3-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	1.74	NA
1B12.6	IL-1β		0.38	
1B12.6-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	2.58	NA

NA: No aplicable.

Todas las moléculas de DVD-Ig mostraron la neutralización en el ensayo de neutralización de IL-1α/β de MRC5.

Tabla 9: Ensayo de Neutralización de IL-1α de Mono Macaco Con Anticuerpo Parental de IL-1α y Constructos de DVD-Ig

Anticuerpo Parental o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-Terminal (VD)	Dominio Variable C-Terminal (VD)	Ensayo de Neutralización de Cino IL-1α VD N-Terminal EC50 nM	Ensayo de Neutralización de Cino IL-1α VD C-Terminal EC50 nM
3D12.10/15	IL-1α		0.0126	
E26.13-SS-3D12.10/15	IL-1β	IL-1α	NA	0.0626
E26.35-SS-3D12.10/15	IL-1β	IL-1α	NA	0.081
3D12r16	IL-1α		0.0008	
E26.35-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	NA	0.1011

NA: No aplicable.

Todas las moléculas de DVD-Ig mostraron la neutralización en el ensayo de neutralización de IL-1α/β de MRC5.

Tabla 10: Ensayo de Neutralización de IL-1β de Mono Macaco Con Anticuerpo Parental de IL-1β y Constructos de DVD-Ig

Anticuerpo Parental o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-Terminal (VD)	Dominio Variable C-Terminal (VD)	Ensayo de Neutralización de Cino IL-1β VD N-Terminal EC50 nM	Ensayo de Neutralización de Cino IL-1β VD C-Terminal EC50 nM
E26.13	IL-1β		0.0084	
E26.13-SS-3D12.10/15	IL-1β	IL-1α	0.0056	NA
E26.35	IL-1β		0.0034	
E26.35-SS-3D12.10/15	IL-1β	IL-1α	0.0121	NA
E26.35-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	0.004	NA

NA: No aplicable.

Todas las moléculas de DVD-Ig mostraron la neutralización en el ensayo de neutralización de IL-1α/β de MRC5.

Ejemplo 1.1.2.F: Efecto Inhibidor del Crecimiento de un Anticuerpo Monoclonal Receptor de Tumores o Moléculas DVD-Ig In Vitro

Se agregan 20 µL anticuerpos monoclonales receptores de tumores o moléculas de DVD-Ig diluidos en D-PBS-BSA (solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco con BSA al 0.1%) a células tumorales humanas a concentraciones finales de 0.01 µg/mL-100 µg/mL en 180 µL.

Las placas se incuban a 37°C en una atmosfera de CO_2 al 5% humidificada durante 3 días. El número de células vivas en cada pozo se cuantifica utilizando reactivos MTS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI) para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento tumoral. Se utilizan pozos sin tratamiento con anticuerpos como controles del 0% de inhibición mientras que se considera que los pozos sin células muestran 100% de inhibición.

Ejemplo 1.1.2.G: Efecto Tumoricida de Un Anticuerpo Parental o Molécula de DVD-Ig In Vitro

Puede analizarse la actividad tumoricida de los anticuerpos parentales o moléculas de DVD-Ig que se unen a antígenos objetivo en las células tumorales. En breve, los anticuerpos parentales o molécula de DVD-Ig se diluyen en D-PBS-BSA (solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco con BSA al 0.1%) y se

agregan a células tumorales humanas a concentraciones finales de 0.01 g/mL a 100 µg/mL en 280 µL. Las placas se incuban a 37°C en una atmosfera de CO_2 al 5% humidificada durante 3 días. El número de células vivas en cada pozo se cuantifica utilizando reactivos MTS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI) para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento tumoral. Se utilizan pozos sin tratamiento con anticuerpos como controles del 0% de inhibición mientras que se considera que los pozos sin células muestran 100% de inhibición.

Para la evaluación de la apoptosis, se determina la activación de la caspasa-3 mediante el siguiente protocolo: células tratadas con anticuerpos en placas de 96 pozos se lisan en 120 µl de amortiguador de lisis 1x (Hepes 1.67 mM, pH 7.4, KCl 7 mM, $MgCl_2$ 0.83 mM, EDTA 0.11 mM, EGTA 0.11 mM, CHAPS 0.57%, DTT 1 mM, tableta del coctel inhibidor 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 un amortiguador de la reacción de caspasa 3 (Hepes 48m M, pH 7.5, saraos 252 mM, CHAPS 0.1%, DTT 4 mM, y substrato de Ac-DEVD-AMC 20 µM; Biomol Research Labs, Inc., Plymouth Meeting, PA) se agrega y las placas se incuban durante 2 horas a 37°C. Las placas se leen en un Contador Multi-etiqueta 1420 VICTOR (Perkin Elmer Life Sciences, Downers Grove, IL) utilizando los siguientes ajustes: excitación = 360/40, emisión= 460/40. Un incremento de unidades de fluorescencia de las células tratadas con anticuerpos en relación a las células tratadas con el control de anticuerpo de isotipo es indicativo de apoptosis.

Ejemplo 1.1.2.H: Inhibición de la Proliferación Celular mediante Anticuerpo Parental y Constructos de DVD-Ig

Las células tumorales de glioma humano U87-MG se colocan en placas en 2,000 células/pozo en 100 µl en platos de 96 pozos en medio RPMI suplementado con suero de bovino fetal al 5%, y se incuba en CO_2 al 5%, 37°C, toda la noche. Al siguiente día las células se trataron con diluciones en serie de anticuerpo o moléculas de DVD-Ig (rango de dosis de 0.013 nM a 133 nM), y se incuban a 37°C en un atmosfera de CO_2 al 5% humidificada durante 5 días. La supervivencia/proliferación celular se mide indirectamente evaluando los niveles de ATP utilizando un kit ATPlite Perkin Elmer, Waltham, MA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 1.1.2.I: Inhibición de la Fosforilación del Receptor mediante Anticuerpos Parentales o Constructos de DVD-Ig *In Vitro*

Las células de carcinoma humano se colocan en placas de 96 pozos en 40,000 células/pozo en medio libre de suero 180 µl (DMEM+ 0.1% BSA), y se incuban toda la noche en C02 al 5%, a 37°C. Las placas EIA Costar (Lowell, MA) se revisten con 100 µl/pozo del Ab de captura del receptor (concentración final de 4 µg/ml), y se incuban toda la noche a temperatura ambiente mientras se agita. Al siguiente día, las placas de ELISA revestidas con anticuerpo receptor, se lavan (tres veces con PBST = Tween 20 al 0.05% en PBS, pH 7.2 - 7.4), y se agregan 200 µl de solución bloqueadora (BSA al 1%, NaN3 al 0.05% en PBS, pH 7.2 - 7.4.) para bloquearse durante 2 horas a temperatura ambiente en un oscilador. Las células tumorales humanas se co-incuban con anticuerpos o moléculas de DVD-Ig

y ligando. Los anticuerpos monoclonales o moléculas de DVD-Ig se diluyen en D-PBS-BSA (solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco con BSA al 0.1%) se agregan a células de carcinoma humano a concentraciones finales de 0.01 µg/mL-100 µg/mL. Los factores de crecimiento se agregan simultáneamente a las células a concentraciones de 1-100 ng/mL (200 µL), y las células se incuban a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%, humidificada durante 1 hora. Las células se lisan en 120 µl/pozo de amortiguador de extracción de células frías (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 al 1%, Glicerol al 10%, SDS al 0.1%, y coctel inhibidor de proteasa), y se incuban a 4°C durante 20 minutos con agitación. Se agregan lisados de células (100 µl) a la placa de ELISA, y se incuban toda la noche a 4°C con agitación suave. El siguiente día, las placas de ELISA se lavan, y se agregan 100 µl/pozo de Ab de detección pTyr-HRP (kit p- ELISA IGFIR, R&D System # DYC1770, Minneapolis, MN), y las placas se incuban durante 2 horas a 25°C en la oscuridad. Las placas se desarrollan para determinar la fosforilación según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 1.1.2.J: <u>Eficacia de una molécula de DVD-Ig en el Crecimiento de Xenoinjertos del Flanco Subcutáneo del Carcinoma Humano</u>

Se hicieron crecer células de carcinoma epidermoide humano A-431 *in vitro* a viabilidad del 99%, 85% de confluencia en matraces de cultivo de tejido. Los ratones hembra SCID (Charles Rivers Labs, Wilmington, MA) de 19-25 gramos se inyectan subcutáneamente en el costado derecho con 1 x 10^6 células tumorales

humanas (matrigel 1:1) el día 0 del estudio. La administración (IP, QD, 3x/semana) de control con IgG humana o molécula de DVD-Ig se inició después de que los ratones se emparejaron por tamaño en grupos de ratones con volúmenes de tumores medios de aproximadamente 200 a 320 mm^3. Los tumores se miden dos veces a la semana comenzando aproximadamente el día 10 posterior de la inyección de células tumorales.

Ejemplo 1.2: <u>Generación de Anticuerpos Monoclonales Parentales en un Antígeno Humano de Interés</u>

Los mAbs de ratón parentales que se unen a y neutralizan un antígeno humano de interés y una variante del mismo se obtienen como sigue:

Ejemplo 1.2.A: <u>Inmunización de Ratones con un Antígeno Humano de Interés</u>

Veinte microgramos de antígeno humano purificado recombinante (por ejemplo, IL-1α o IL-1β) mezclado con adyuvante de Freund completo o adyuvante Immunoeasy (Qiagen, Valencia, CA) se inyecta subcutáneamente en cinco ratones Balb/C de 6-8 semanas de edad, cinco ratones C57B/6, y cinco ratones AJ el Dia 1. En los días 24, 38, y 49, se inyectan veinte microgramos de variante de antígeno humano purificado recombinante mezclado con adyuvante de Freund incompleto o adyuvante Immunoeasy subcutáneamente en los mismos ratones. El día 84 o día 112 o día 144, los ratones se inyectan intravenosamente con 1 µg del antígeno humano purificado recombinante de interés.

Ejemplo 1.2.B: Generación de un Hibridoma

Los esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados descritos en el Ejemplo 1.2.A se fusionan con células SP2/0-Ag-14 a una proporción de 5:1 de acuerdo al método establecido descrito en Kohler, G. y Milstein (1975) Nature, 256:495 para generar hibridomas. Los productos de fusión se colocan en placas en medios de selección que contienen azaserina e hipoxantina en placas de 96 pozos a una densidad de 2.5 x 106 células del bazo por pozo. Las colonias de hibridoma macroscópicas se observan siete a diez días post-fusión. Se analiza la presencia del anticuerpo en el antígeno de interés del sobrenadante de cada pozo contiene colonias de hibridoma mediante ELISA (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1.1.1.A). Se analiza entonces la actividad de los sobrenadantes que exhiben actividad específica de antígeno (por ejemplo, como se describe en los ensayos del Ejemplo 1.1.2), por ejemplo, la capacidad de neutralizar el antígeno de interés en un bioensayo, por ejemplo, tal como el descrito en el Ejemplo 1.1.2.E).

Ejemplo 1.2.C: Identificación y Caracterización de Anticuerpos Monoclonales Parentales en un Antígeno Objetivo Humano de Interés

Ejemplo 1.2.C.1: Análisis de la Actividad Neutralizante del Anticuerpo Monoclonal Parental

Se analiza la presencia de anticuerpos parentales en sobrenadantes de hibridoma que se unen a un antígeno de interés, generado de acuerdo a los Ejemplos 1.2.A y 1.2.B, y son capaces de unir una variante del antígeno de interes (“variante del antígeno”). Se analizan entonces la potencia de neutralización de

antígenos de los sobrenadantes con anticuerpos positivos en ambos ensayos, por ejemplo, en un bioensayo de citocina del Ejemplo 1.1.2.E. Los anticuerpos que producen hibridomas con valores IC_{50} en el bioensayo menores a 1000 pM, en una modalidad, menores a 100 pM se incrementan paulatinamente y se clonan limitando la dilución. Las células de hibridoma se expanden en medios que contienen suero de bovino fetal de IgG bajo 10% (Hyclone #SH30151, Logan, UT). En promedio, se cosechan 250 mL de cada sobrenadante de hibridoma (derivado de una población de clones), se concentran y purificación mediante cromatografía de afinidad con proteína A, como se describe en Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual. Se determina la capacidad de los mAbs purificados para inhibir la actividad de su antígeno objetivo, por ejemplo, utilizando un bioensayo con citocina que se describe en el Ejemplo I.I.2.E.

Ejemplo 1.2.C.2: <u>Análisis de la reactividad Cruzada del Anticuerpo Monoclonal Parental en el Antígeno Objetivo de Mono Macaco de Interés</u>

Para determinar si el mAbs seleccionado descrito en la presente reconoce el antígeno de mono macaco de interés, se realiza el análisis BIACORE que se describe en la presente (Ejemplo 1.1.1.C) utilizando antígeno objetivo de mono macaco recombinante. Además, también pueden medirse las potencias de neutralización de mAbs contra el antígeno de mono macaco recombinante de interés en un bioensayo con citocina (Ejemplo 1.1.2.E). Se seleccionan los mAbs con buena reactividad cruzada (en una modalidad, dentro de 5 veces la reactividad del antígeno humano) para su futura caracterización.

Ejemplo 1.2.D: <u>Determinación de la Secuencia de Aminoácidos de la Región</u>

Variable de Cada Anticuerpo Monoclonal Anti-Humano Murino

El aislamiento de los ADNcs, la expresión y caracterización de mAbs de ratón anti-humano recombinante se realiza como sigue. Para cada determinación de secuencia de aminoácidos, se aíslan aproximadamente 1 x 106 células de hibridoma mediante centrifugación y se procesan para aislar el ARN total con Trizol (Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se somete a una primera síntesis de ADN de hebra utilizando el Sistema de Síntesis de Primera Hebra Superscript (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se utiliza oligo(dT) para cebar la síntesis de la primera hebra para seleccionar el ARN poli(A)+. El producto de ADNc de primera hebra se amplifica entonces mediante PCR con cebadores diseñados para la amplificación de regiones variables de inmunoglobulina murina (Ig-Primer Sets, Novagen, Madison, WI). Los productos PCR se desarrollan en un gel de agarosa, se cortan, purifican, y luego se subclonan con el kit TOPO Cloning kit en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transforman en E. coli químicamente competente TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se realiza PCR de colonias en los transformantes para identificar clones que contengan insertos. El ADN del plásmido se aísla de los clones que contienen el inserto utilizando el kit QIAprep Miniprep kit (Qiagen, Valencia, CA). Los insertos en el plásmido se secuencian en ambas hebras para determinar las secuencias de ADN de cadena pesada variable o ligera variable utilizando cebadores M13 delanteros y M13 reversos (Fermentas Life Sciences, Hanover MD). Las secuencias de cadena pesada variable y cadena ligera variable de los mAbs se identifican. En una modalidad, los criterios de selección de un panel de mAbs líder de la siguiente etapa de desarrollo (humanización) incluye lo

siguiente:

- El anticuerpo no contiene ningún sitio de glicosilación enlazado a N (NXS), excepto el estándar en CH2
- El anticuerpo no contiene ninguna cisteína extra además de las cisteínas normales en cada anticuerpo
- La secuencia de anticuerpos se alinea con las secuencias de línea germinal humana más cercanas de VH y VL y deberá verificarse la aparición de cualquier aminoácido inusual en otros anticuerpos humanos naturales
- La Glutamina N-terminal (Q) se cambia a Acido Glutámico (E) si no afecta la actividad del anticuerpo. Esto reducirá la heterogeneidad debida a la ciclización de Q
- Se confirma la escisión de secuencia de señales eficiente mediante Espectrofotometría de Masa. Esto se puede hacer con material de célula COS o célula 293
- Se verifica el riesgo de desaminación de Asn en la secuencia de proteína que pudiera dar como resultado pérdida de actividad
- El anticuerpo tiene un bajo nivel de agregación
- El anticuerpo tiene solubilidad >5-10 mg/ml (en fase de investigación); > 25 mg/ml
- El anticuerpo tiene un tamaño normal (5-6 mm) mediante Dispersión de Luz Dinámica (DLS)
- El anticuerpo tiene una heterogeneidad de baja carga
- El anticuerpo carece de liberación de citocina (ver el Ejemplo 1.1.2.B)
- El anticuerpo tiene especificidad para con la citocina propuesta (ver el

Ejemplo 1.1.2.C)

- El anticuerpo carece de reactividad cruzada de tejido inesperada (ver el Ejemplo 1.1.2.D)
- El anticuerpo tiene similitud entre la reactividad cruzada de tejido de humano y mono macaco (ver el Ejemplo 1.1.2.D)

Ejemplo 1.2.2: Anticuerpos Parentales Humanizados Recombinantes

Ejemplo 1.2.2.1: Construcción y Expresión de Anticuerpos Parentales Anti-Humanos Quiméricos Recombinantes

El ADN que codifica la región constante de cadena pesada de mAbs parental anti-humano murino se remplaza con un fragmento de ADNc que codifica la región constante de IgG1 humana que contiene 2 mutaciones de aminoácidos de región articulada mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (Lund et al. (1991) J. Immunol. 147:2657). La región constante de cadena ligera de cada uno de estos anticuerpos es remplazada por una región constante kappa humana. Los anticuerpos quiméricos de longitud completa se expresan temporalmente en células COS mediante la co-transfección de ADNcs de cadena pesada y ligera quiméricos ligados en el plásmido de expresión pBOS (Mizushima y Nagata (1990) Nucl. Acids Res. 18: 5322). Los sobrenadantes de células que contienen anticuerpo quimérico recombinante se purifican mediante cromatografía Sepharose con Proteína A y el anticuerpo unido se diluye mediante la adición de amortiguador ácido. Los anticuerpos se neutralizan y dializan en PBS. El ADNc de cadena

pesada que codifica un mAb quimérico se co-transfecta con su ADNc de cadena ligera quimérica (ambos ligados en el vector pBOS) en células COS. El sobrenadante de células que contienen anticuerpo quimérico recombinante se purifica mediante cromatografía Sepharose con Proteína A y el anticuerpo unido se diluye mediante la adición de ácido. Los anticuerpos se neutralizan y dializan en PBS.

Se analiza la capacidad de unión y la actividad funcional de los mAbs parentales anti-humanos quiméricos purificados, por ejemplo, que se describen en los Ejemplos 1.1.1.C y 1.1.2.B. Los mAbs quiméricos que mantienen la actividad de los mAbs de hibridoma parental 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 Anticuerpos Humanos

Cada secuencia de genes de cadena pesada variable murina y cadena ligera variable se alinea por separado contra secuencias de 44 cadenas pesadas variables de línea germinal de inmunoglobulina o 46 cadenas ligeras variables de línea germinal (derivadas del sitio web NCBI Ig Blast en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html.) utilizando el programa informático Vector NTI.

La humanización e basa en homología de secuencia de aminoácidos, homología, análisis clúster de CDR, frecuencia de uso entre anticuerpos humanos expresados, y la información disponible sobre las estructuras cristalinas de anticuerpos humanos. Tomando en cuenta los posibles efectos en la unión de

anticuerpos, el apareamiento VH-VL, y otros factores, los residuos murinos se mutan en residuos humanos cuando los residuos del marco murino y humano son diferentes, con unas cuantas excepciones. Las estrategias de humanización adicionales se diseñan en base a un análisis de secuencias de anticuerpos de línea germinal humana, o un subgrupo de las mismas, que posee un alto grado de homología, es decir, similitud de secuencia, con la secuencia de aminoácidos presente de las regiones variables de anticuerpos murinos.

Se utiliza modelado por homología para identificar residuos únicos para las secuencias de anticuerpos murinos que se predice que son críticas para la estructura del sitio de combinación de anticuerpos, las CDRs. El modelado de homología es un método computacional mediante el cual se generan coordenadas tridimensionales aproximadas para una proteína. La fuente de coordenadas iniciales y guía para su refinación adicional es una segunda proteína, la proteína de referencia, de la cual las coordenadas tridimensionales son conocidas y la secuencia de la cual se relaciona con la secuencia de la primera proteína. La relación entre las secuencias de las dos proteínas se utiliza para generar una correspondencia entre la proteína de referencia y la proteína para la cual se desean las coordenadas, la proteína objetivo. Las secuencias primarias de las proteínas de referencia y objetivo se alinean con coordenadas de porciones idénticas de las dos proteínas transferidas directamente de la proteína de referencia a la proteína objetivo. Las coordenadas de porciones desiguales de las dos proteínas, por ejemplo, de mutaciones de residuos, inserciones, o eliminaciones, se construyen a partir de plantillas estructurales genéricas y energía refinada para asegurar la consistencia con las coordenadas de modelo ya

transferidas. Esta estructura de proteína computacional puede refinarse además o emplearse directamente en estudios de modelado. La calidad de la estructura del modelo se determina mediante la exactitud de la contención en la que las proteínas de referencia y objetivo se relacionan y la precisión con la cual se construye la alineación de secuencia.

Para los mAbs murinos, se utiliza una combinación de búsqueda BLAST e inspección visual para identificar estructuras de referencia adecuadas. La identidad de secuencia del 25% entre las secuencias de aminoácidos de referencia y objetivo se considera la mínima necesaria para intentar un ejercicio de modelado por homología. Las alineaciones de secuencia se construyen manualmente y se generan coordenadas de modelo con el programa Jackal (ver Petrey et al. (2003) Proteins 53 (Suppl. 6): 430—435).

Las secuencias primarias de las regiones de marco murino y humano de los anticuerpos seleccionados comparten identidad significativa. Las posiciones de residuos que difieren son candidatos para la inclusión del residuo murino en la secuencia humanizada a fin de mantener la potencia de unión observado del anticuerpo murino. Una lista de residuos del marco que difieren entre las secuencias humanas y murinas se construye manualmente. La Tabla 11 muestra las secuencias de marco elegidas para este estudio.

Tabla 11: Secuencia del Dominio Constante de Cadena Pesada de IgG Humana y Dominio Constante de Cadena Ligera

Proteína	SEQ ID NO	Secuencia
		12345678901234567890123456789012345678900
Región constante hIgG1 de tipo silvestre	48	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**LL**GG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE

		MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Región constante hIgG1 mutante	**49**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Región constante Ig Kappa	**50**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Región constante Ig Lambda	**51**	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

La probabilidad de que un residuo de marco cado pudiera impactar las propiedades de unión del anticuerpo depende de su proximidad a los residuos CDR. Por lo tanto, utilizando las estructuras de modelo, los residuos que difieren entre las secuencias murina y humana se clasifican de acuerdo a su distancia desde cualquier átomo en las CDRs. Aquellos residuos que caen dentro de 4.5 Å de cualquier átomo de CDR se identifican como muy importantes y se recomiendan como candidatos para la retención del residuo murino en el anticuerpo humanizado (es decir, retro-mutación).

Los anticuerpos humanizados construidos *in silico* se construyen utilizando oligonucleótidos. Para cada ADNc de región variable, cada uno de los 6 oligonucleótidos de 60-80 nucleótidos para traslaparse entre sí mediante 20 nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de cada oligonucleótido. En una reacción de hibridación, todos los 6 oligonucleótidos se combinan, cocen, e hibridan en la presencia de dNTPs. La polimerasa I de ADN, fragmento grande (New England Biolabs #M0210, Beverley, MA) se agrega para rellenar aproximadamente los

espacios de 40 bp entre los oligonucleótidos superpuestos. La PCR se realiza para amplificar el gen de región variable entera utilizando dos cebadores más alejados que contienen secuencias colgadas complementarias al sitio de clonación múltiple en un vector pBOS modificado (Mizushima and Nagata (1990) Nucl. Acids Res. 18: 17). Los productos PCR derivados de cada ensamble de ADNc se separan en un gel de agarosa y la banda correspondiente al tamaño del ADNc de región variable previsto se corta y purifica. La región pesada variable se inserta en el marco en un fragmento de ADNc que codifica la región constante de IgG1 humana que contiene 2 mutaciones de aminoácidos de región articulada mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de alanina en la posición 235 (Lund et al. (1991) J. Immunol. 147:2657). La región de cadena ligera variable se inserta en marco con la región constante kappa humana mediante recombinación homóloga. Las colonias bacterianas se aíslan y se extrae el ADN de plásmido. Los insertos de ADNc se secuencia en su totalidad. Las cadenas pesadas y ligeras humanizadas correctas correspondientes a cada anticuerpo se co-transfectan en células COS para producir temporalmente anticuerpos anti-humanos humanizados de longitud completa. Los sobrenadantes de células que contienen el anticuerpo quimérico recombinante se purifican mediante cromatografía Sepharose con Proteína A y el anticuerpo unido se diluye mediante la adición de amortiguador ácido. Los anticuerpos se neutralizan y dializan en PBS.

Ejemplo 1.2.2.3: <u>Caracterización de Anticuerpos Humanizados</u>

La capacidad de anticuerpos humanizados purificados para inhibir una

actividad funcional se determina, por ejemplo, utilizando el bioensayo con citocina que se describe en los Ejemplos 1.1.2.A. Las afinidades de unión de los anticuerpos humanizados al antígeno humano recombinante se determinan utilizando la medición con resonancia de plasmón superficial (Biacore®) que se describe en el Ejemplo 1.1.B. Los valores IC_{50} de los bioensayos y la afinidad de los anticuerpos humanizados se clasifican. El mAbs humanizado que mantiene completamente la actividad del mAbs del hibridoma parental se seleccionan como candidatos para su futuro desarrollo. El 2-3 mAbs humanizados más favorables superiores se caracterizan posteriormente.

Ejemplo 1.2.2.3.A: <u>Análisis Farmacocinético de Anticuerpos Humanizados</u>

Se llevan a cabo estudios farmacocinéticos en ratas Sprague-Dawley y monos macacos. Las ratas macho y hembra y monos macacos se dosifican intravenosamente o subcutáneamente con una sola dosis de 4 mg/kg de mAb y las muestras se analizan utilizando ELISA para captura de antígeno, y se determinan los parámetros farmacocinéticos mediante análisis no compartimental. Brevemente, las placas de ELIS se revestin con el anticuerpo anti-biotina de cabra (5 mg/ml, 4°C, toda la noche), bloqueado con Superblock (Pierce), y se incuban con antígeno humano biotinilado en 50 ng/ml en TTBS Superblock 10% a temperatura ambiente durante 2 horas. Las muestras de suero se diluyen en serie (suero 0.5%, Superblock en TTBS 10%) y se incuban en la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. La detección se lleva a cabo con anticuerpo ani-humano de cabra etiquetado con HRP y las concentraciones se determinan con la ayuda de curvas estándar utilizando el ajuste logístico de cuatro parámetros. Los

valores para los parámetros farmacocinéticos se determinan mediante un modelo no compartimental utilizando el programa informático WinNonlin software (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Se seleccionan mAbs humanizados con buen perfil farmacocinético (T1/2 es de 8-13 días o mejor, con baja depuración y excelente biodisponibilidad 50-100%).

Ejemplo 1.2.2.3.B: <u>Análisis Fisicoquímico y de Estabilidad In Vitro de Anticuerpos Monoclonales Humanizados</u>

Cromatografía por exclusión de tamaño

Los anticuerpos se diluyen a 2.5 mg/mL con agua y 20 Ml se analiza en un sistema HPLC Shimadzu utilizando columna G3000 SWXL de gel TSK (Tosoh Bioscience, cat# k5539-05k). Las muestras se diluyen a partir de la columna con sulfato de sodio 211 mM, fosfato de sodio 92 mM, pH 7.0, a una relación de flujo de 0.3 mL/minutos. Las condiciones de operación del sistema HPLC son las siguientes:

Fase móvil: Na_2SO_4 211 mM, Na_2HPO_4 92 mM*$7H_2O$, pH 7.0

Gradiente: Isocrático

Relación de flujo: 0.3 mL/minuto

Longitud de onda del detector: 280 nm

Temp del enfriador del inyector automático: 4°C

Temperatura del horno de columna: Ambiente

Tiempo de corrida: 50 minutos

La Tabla 12 contiene datos de pureza de anticuerpos parentales y constructos de DVD-Ig expresados como monómero porcentual (proteína sin

agregar del peso molecular esperado) que se determina mediante el protocolo anterior.

Tabla 12: Pureza de Anticuerpos Parentales y Constructos de DVD-Ig que se Determinan mediante Cromatografía por Exclusión de Tamaño

Anticuerpo Parental o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-Terminal (VD)	Dominio Variable C-Terminal (VD)	% Monómero (pureza)
E26.13	IL-1β		99.0
3D12.10/15	IL-1α		81.4
E26.13-SS-3D12.10/15	IL-1β	IL-1α	95.1
E26.35	IL-1β		88.1
3D12r16	IL-1α		100
E26.35-SS-3D12.10/15	IL-1β	IL-1α	97.4
E26.35-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	100
1B12.1-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	95.1
1B12.3-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	94.6
1B12.6-SS-3D12r16	IL-1β	IL-1α	95.9

Las moléculas de DVD-Ig mostraron un excelente perfil SEC con más moléculas de DVD-Ig que muestra >94% de monómero. Este perfil de DVD-Ig es similar al observado en los anticuerpos parentales

SDS-PAGE

Los anticuerpos se analizan mediante electroforesis de dodecil-sulfato de sodio-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) bajo condiciones de reducción y sin

reducción. Se utiliza un lote AFP04C de adalimumab como un control. Para condiciones de reducción, las muestras se mezclan 1:1 con un amortiguador muestra de SDS-PAGE con tris-glicina 2x (Invitrogen, cat# LC2676, lote# 1323208) con DTT 100 mM, y se calienta a 60°C durante 30 minutes. Para condiciones sin reducción, las mezclas se muestran 1:1 con el amortiguador muestra y se calienta a 100°C durante 5 minutos. Las muestras reducidas (10 mg por línea) se cargan en un gel de tris-glicina vaciado de antemano al 12% (Invitrogen, cat# EC6005box, lote# 6111021), y las muestras no reducidas (10 mg por línea) se cargan en un gel de tris-glicina vaciado de antemano al 8-16% (Invitrogen, cat# EC6045box, lote# 6111021). Ver Blue Plus 2 (Invitrogen, cat#LC5925, lote# 1351542) se utiliza como un marcador de peso molecular. Los geles se corren en una caja de gel XCell SureLock mini cell (Invitrogen, cat# EI0001) y las proteínas se separan aplicando primero un voltaje de 75 para apilar las muestras en el gel, seguido por un voltaje constante de 125 hasta que el tinte alcance el fondo del gel. El amortiguador de corrida utilizado es el amortiguador SDS de tris-glicina 1X, preparado a partir de amortiguador de SDS con tris-glicina 10X (ABC, MPS-79-080106)). Los geles se tiñen toda la noche con tinte de azul coloidal (Invitrogen cat# 46-7015, 46-7016) y se destiñen con agua Milli-Q hasta que el fondo sea claro. Los geles teñidos se escanean entonces utilizando un escáner Epson Expression (model o1680, S/N DASX003641).

Análisis de Velocidad de Sedimentación

Los anticuerpos se cargan en la cámara de muestras de cada uno de los tres centros epon de carbón de dos sectores estándar. Estos centros tienen una

longitud de trayectoria óptica de 1.2 cm y se construyen con ventanas de zafiro. Se utiliza para un amortiguador de referencia y cada cámara contenía 140 µL. Todas las muestras se examinan simultáneamente utilizando un rotor de 4 orificios (AN-60Ti) en una ultra-centrifuga analítica Beckman ProteomeLab XL-I (serie # PL106C01).

Las condiciones de corrida se programan y el control de la centrifuga se realiza utilizando ProteomeLab (v5.6). Las muestras y el rotor se dejan equilibrar térmicamente durante una hora antes del análisis (20.0 ± 0.1°C). La confirmación de la carga de células apropiada se realiza a 3000 rpm y se registra un solo escaneo para cada célula. Las condiciones de velocidad de sedimentación son las siguientes:

Volumen de Células de Muestra: 420 mL

Volumen de Células de Referencia: 420 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 punto de datos por paso sin promedio de señal.

Número Total de Escaneos: 100

Medición del peso molecular LC-MS de anticuerpos intactos

El peso molecular de los anticuerpos intactos se analizan mediante LC-MS. Cada anticuerpo se diluye aproximadamente a 1 mg/mL con agua. Un sistema

HPLC 1100 (Agilent) con una micro-trampa de proteínas (Michrom Bioresources, Inc, cat# 004/25109/03) se utiliza para desalinizar e introducir 5 mg de la muestra en un espectrómetro de masa API Qstar pulsar i (Applied Biosystems). Se utiliza un gradiente corto para diluir las muestras. El gradiente se corre con la fase móvil A (0.08% FA, 0.02% TFA en agua HPLC) y fase móvil B (0.08% FA y 0.02% TFA en acetonitrilo) a una relación de flujo de 50 mL/minuto. El espectrómetro de masa se opera a un voltaje de atomización de 4.5 kvoltios con un rango de escaneo de relación de masa a carga de 2000 a 3500.

Medición del peso molecular LC-MS de cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo

La medición del peso molecular de cadena ligera (LC), cadena pesada (HC) y HC deglicosiladas del anticuerpo se analizan mediante LC-MS. El anticuerpo se diluye a 1 mg/mL con agua y la muestra se reduce a LC y HC con una concentración final de DTT 10 mM durante 30 minutos a 37°C. Para deglicosilar el anticuerpo, se incuban 100 mg del anticuerpo con 2 mL de PNGasa F, 5 mL de N-octilglucósido 10% en un volumen total de 100 mL toda la noche a 37°C. Después de la deglicosilación la muestra se reduce con una concentración final de DTT 10 mM durante 30 minutos a 37°C. Un sistema HPLC Agilent 1100 con una columna C4 (Vydac, cat# 214TP5115, S/N 060206537204069) para desalinizar e introducir la muestra (5 mg) en un espectrómetro de masa API Qstar pulsar i (Applied Biosystems). Se utiliza un gradiente corto para diluir las muestras. El gradiente se corre con la fase móvil A (0.08% FA, 0.02% TFA en agua HPLC) y fase móvil B (0.08% FA y 0.02% TFA en acetonitrilo) a una relación de flujo de 50

mL/minuto. El espectrómetro de masa se opera a un voltaje de atomización de 4.5 kvoltios con un rango de escaneo de relación de masa a carga de 2000 a 3500.

Mapeo de péptidos

El anticuerpo se desnaturaliza durante 15 minutos a temperatura ambiente con una concentración final de clorhidrato de guanidina 6 M en bicarbonato de amonio 75 mM. Las muestras desnaturalizadas se reducen con una concentración final de DTT 10 mM a 37°C durante 60 minutos, seguido por alquilación con ácido yodoacético 50 mM (IAA) en la oscuridad a 37°C durante 30 minutos. Después de la alquilación, la muestra se dializa toda la noche contra cuatro litros de bicarbonato de amonio 10 mM a 4°C. La muestra dializada se diluye a 1 mg/mL con bicarbonato de amonio 10 mM, pH 7.8 y 100 mg de anticuerpo ya sea digerido con tripsina (Promega, cat# V5111) o Lys-C (Roche, cat# 11 047 825 001) a una relación tripsina/Lys-C:anticuerpo 1:20 (p/p) a 37°C durante 4 hrs. Los digeridos se apagan con 1 mL de HCl 1 N. El mapeo de péptidos con detección de espectrómetro de masa, 40 mL de los digeridos se separan mediante cromatografía de líquido de alta resolución de fase inversa (RPHPLC) en una columna C18 (Vydac, cat# 218TP51, S/N NE9606 10.3.5) con una HPLC Agilent 1100. La separación del péptido se corre con la fase móvil A (0.02% TFA y 0.08% FA en agua HPLC) y fase móvil B (0.02% TFA y 0.02% FA en acetonitrilo) a una relación de flujo de 50 mL/minuto. El espectrómetro de masa API QSTAR Pulsar i se opera en un modo positivo a 4.5 kvoltios y un rango de escaneo de relación de masa a carga de 2000 a 3500.

Mapeo de Unión de Disulfuro

Para desnaturalizar el anticuerpo, se mezclan 100 ml del anticuerpo con 300 mL de HCl de guanidina 8 m en bicarbonato de amonio 100 mM. El pH se verifica para asegurar que éste entre 7 y 8 y las muestras se desnaturalizan durante 15 minutos a temperatura ambiente en una concentración final de HCl de guanina 6 M. Una porción de la muestra desnaturalizada (100 mL) se diluye a 100 mL con agua Milli-Q para dar una concentración de HCl de guanidina final de 1 M. La muestra (220 mg) se digiere con ya sea tripsina (Promega, cat # V5111, lote# 22265901) o Lys-C (Roche, cat# 11047825001, lote# 12808000) a una proporción de tripsina 1:50 o 1:50 Lys-C:anticuerpo (p/p) (4.4 mg de enzima: 220 mg de muestra) a 37°C durante aproximadamente 16 horas. Se agregan 5 mg adicionales de tripsina o Lys-C a las muestras y se permite la digestión para continuar 2 horas adicionales a 37°C. Las digestiones se detienen agregando 1 mL de TFA a cada muestra. Las muestras digeridas se separan mediante RPHPLC utilizando una columna C18 (Vydac, cat# 218TP51 S/N NE020630-4-1A) en un sistema HPLC Agilent. La separación se corre con el mismo gradiente utilizado para el mapeo de péptidos utilizando la fase móvil A (0.02% TFA y 0.08% FA en agua calidad HPLC) y fase móvil B (0.02% TFA y 0.08% FA en acetonitrilo) A Una relación de flujo de 50 mL/minuto. Las condiciones de operación de HPLC son iguales a las utilizadas para el mapeo de péptidos. El espectrómetro de masa API QSTAR Pulsar i se opera en un modo positivo a voltaje de atomización de 4.5 kvoltios y un rango de escaneo de relación de masa a carga de 800 a 2500. Las uniones de disulfuro se asignan emparejando los PMs observados de péptidos con los PMs previstos de péptidos trípticos o Lys-C enlazados mediante uniones de disulfuro.

Determinación de sulfhidrilo libre

El método utilizado para cuantificar las cisteínas libres en un anticuerpo se basa en la reacción del reactivo de Ellman, 5,5'-bis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), con grupos de sulfhidrilo (SH) que da origen a un producto cromofórico característico, 5-tio-(ácido 2-nitrobenzóico) (TNB). La reacción se ilustra en la fórmula:

DTNB + RSH ® RS-TNB + TNB- + H+

La absorbancia del TNB- se mide a 412 nm utilizando un espectrofotómetro Cary 50. Se grafica una curva de absorbancia utilizando diluciones de 2-mercaptoetanol (b-ME) como el estándar SH libre y las concentraciones de los grupos de sulfhidrilo libre en la proteína se determinan a partir de la absorbancia a 412 nm de la muestra.

El stock estándar b-SE ME prepara mediante una dilución en serie de b-ME 14.2 M con agua calidad HPLC a una concentración final de 0.142 mM. Entonces se preparan estándares por triplicado para cada concentración. El anticuerpo se concentra a 10 mg/mL utilizando un filtro de centrifuga amicon ultra 10,000 MWCO (Millipore, cat# UFC801096, lote# L3KN5251) y el amortiguador se cambia al amortiguador de formulación utilizado para adalimumab (fosfato de sodio 5.57 mM monobásico, fosfato de sodio 8.69 mM dibásico, NaCl 106.69 mM, citrato de sodio 1.07 mM, ácido cítrico 6.45 mM, manitol 66.68 mM, pH 5.2 Tween al 0.1% (p/v)). Las muestras se mezclan en un agitador a temperatura ambiente durante 20 minutos. Entonces se agregan 180 mL de amortiguador Tris 100 mM a cada muestra y el seguidor es seguido por la adición de 300 mL de DTNB 2 mM en

amortiguador de fosfato 10 mM, pH 8.1. Después de un mezclado completo, las muestras y estándares se miden para su absorción a 412 nm en un espectrofotómetro Cary 50. La curva estándar se obtiene graficando la cantidad de SH libre y OD412 nm de los estándares b-ME. El contenido de SH libre de las muestras se calcula en base a esta curva después de la substracción de la sustancia en blanco.

Cromatografía de Intercambio de Cationes Débil

El anticuerpo se diluye a 1 mg/mL con fosfato de sodio 10 mM, pH 6.0 La heterogeneidad de carga se analiza utilizando un sistema HPLC Shimadzu con una columna analítica ProPac (Dionex, cat# 054993, S/N 02722). Las muestras se cargan en la columna en fase móvil A 80% (fosfato de sodio 10 mM, pH 6.0) y fase móvil B 20% (fosfato de sodio 10 mM, NaCl 500 mM, pH 6.0) y se diluyen a una relación de flujo de 1.0 mL/minuto.

Perfil de Oligosacáridos

Los oligosacáridos liberados después del tratamiento con PNGasa F del anticuerpo se derivan con el reactivo de etiquetado 2-aminobenzamida (2-AB). Los oligosacáridos etiquetados fluorescentes se separan mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase normal (NPHPLC) y las diferentes formas de oligosacáridos se caracterizan en base a la comparación del tiempo de retención con estándares conocidos.

Ek anticuerpo primero se digiere con PNGasaF para escindir los oligosacáridos N-enlazados de la porción Fc de la cadena pesada. El anticuerpo

(200 mg) se coloca en un tubo Eppendorf de 500 mL junto con PNGasa F 2 mL y 3 mL de N-octilglucosido al 10%. La solución salina amortiguada con fosfato se agrega para llevar el volumen final a 60 mL. La muestra se incuba toda la noche a 37°C en un termo-mezclador Eppendorf ajustado a 700 RPM. El lote AFP04C de adalimumab también se digiere con PNGasa F como un control.

Después del tratamiento con PNGasa, las muestras se incuban a 95°C durante 5 minutos en un termomezclador Eppendorf ajustado a 750 RPM para precipitar las proteínas, luego las muestras se colocan en una centrifuga Eppendorf durante 2 minutos a 10,000 RPM para girar las proteínas precipitadas. El sobrenadante que contiene los oligosacáridos se transfieren a un tubo Eppendorf de 500 mL y se secan en un vacío a velocidad a 65°C.

Los oligosacáridos se etiquetan con 2AB utilizando un kit de etiquetado 2AB adquirido de Prozyme (cat# GKK-404, lote# 132026). El reactivo de etiquetado se prepara de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se agrega ácido acético (150 mL, provisto en el kit) al vial de DMSO (provisto en el kit) y se mezcla pipeteando la solución hacia arriba y hacia abajo varias veces. La mezcla de ácido acético/DMSO (100 mL) se transfiere a un vial de tinte 2-AB (justo antes de usarse) y se mezcla hasta que el tinte se disuelva completamente. La solución del tinte se agrega entonces a un vial de agente reductor (provisto en el kit) y se mezcla adecuadamente (reactivo de etiquetado). El reactivo de etiquetado (5 mL) se agrega a cada vial de muestra de oligosacárido seco, y se mezcla a fondo. Los viales de reacción se colocan en un termomezclador Eppendorf ajustado a 65°C y 700-800 RPM durante 2 horas de reacción.

Después de la reacción de etiquetado, el exceso de tinte fluorescente se

remueve utilizando Cartuchos GlycoClean S de Prozyme (cat# GKI-4726). Antes de agregar las muestras, los cartuchos se lavan con 1 mL de agua milli-Q seguido con 5 platos de solución de ácido acético al 30% 1 mL. Justo antes de agregar las muestras, se agrega 1 mL de acetonitrilo (Burdick and Jackson, cat# AH015-4).

Después de que se pasó todo el acetonitrilo a través del cartucho, la muestra se manchó en el centro del disco recién lavado y se dejó adsorber en el disco durante 10 minutos. El disco se lava con 1 mL de acetonitrilo seguido por cinco discos de 1 ml de acetonitrilo al 96%. Los cartuchos se colocan en un tubo Eppendorf 1.5 mL y los oligosacáridos etiquetados con 2-AB se diluyen con 3 platos (cada plato de 400 ml) de agua milli Q.

Los oligosacáridos se separan utilizando una columna HPLC Glycosep N (cat# GKI-4728) conectado a un sistema HPLC Shimadzu. El sistema HPLC Shimadzu consistió de un controlador de sistema, desgasificador, bombas binarias, inyector automático con un enfriador de muestras, y un detector fluorescente.

Estabilidad a Temperaturas Elevadas

El amortiguador del anticuerpo es ya sea fosfato de sodio 5.57 mM monobásico, fosfato de sodio 8.69 mM dibásico, NaCl 106.69 mM, citrato de sodio 1.07 mM, ácido cítrico 6.45 mM, manitol 66.68 mM, pH 5.2 Tween al 0.1% (p/v), pH 5.2; o histidina 10 mM, metionina 10 mM, manitol 4%, pH 5.9 utilizando filtros de ultra-centrifuga Amicon. La concentración final de los anticuerpos se ajusta a 2 mg/mL con los amortiguadores apropiados. Las soluciones de anticuerpos se esterilizan entonces por filtración y se preparan alícuotas de 0.25 mL bajo condiciones estériles. 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 periodo de incubación, las muestras se analizan mediante cromatografía por exclusión de tamaño y SDS-PAGE.

Las muestras de estabilidad se analizan mediante SDS-PAGE bajo condiciones de reducción y no reducción. El procedimiento utilizado es el mismo que se describe en la presente. Los geles se tiñen toda la noche con tinte de azul coloidal (Invitrogen cat# 46-7015, 46-7016) y se destiñen con agua Milli-Q hasta que el fondo se vuelve claro. Los geles teñidos se escanean entonces utilizando un escáner Epson Expression (model o1680, S/N DASX003641). Para obtener más sensibilidad, los mismos geles se tiñen con plata utilizando el kit de tinción de plata (Owl Scientific) y los procedimientos recomendados dados por el fabricante se utilizan.

Ejemplo 1.2.2.3.C: <u>Eficacia de un Anticuerpo Monoclonal Humanizado En Sí Mismo o En Combinación con Quimioterapia en los Xenoinjertos de Carcinoma Humano</u>

Se hicieron crecer células de carcinoma epidermoide humano A-431 *in vitro* a viabilidad del 99%, 85% de confluencia en matraces de cultivo de tejido. Los ratones hembra SCID (Charles Rivers Labs) de 19-25 gramos, se marcan en las orejas y se rasuran. Los ratones se inyectan entonces subcutáneamente en el costado derecho con 0.2 ml de 2 x 10^6 células tumorales humanas (matrigel 1:1) el día 0 del estudio. La administración (IP, QD, 3x/semana) del vehículo (PBS), anticuerpo humanizado, y/o la quimioterapia se inicia después de que los ratones

se emparejaron por tamaño en jaulas separadas de ratones con volúmenes de tumores medios de aproximadamente 150 a 200 mm^3. Los tumores se miden dos veces a la semana comenzando aproximadamente el día 10 pos-inoculación y los volúmenes tumorales se calculan de acuerdo a la fórmula $V = L \times W^2/2$ (V: volumen, mm^3; L: longitud: mm; W: amplitud, mm). La reducción en el volumen del tumor se ve en animales tratados con mAb solo o en combinación con quimioterapia en relación a los tumores en animales que recibieron solamente el vehículo o un mAb de control de isotipo.

Ejemplo 1.2.2.3.D: <u>Ensayo de Citotoxicidad Redirigido Basado en FACS</u>

Se aíslan células T $CD3^+$ humanas de células mononucleares de sangre periférica aislada previamente congelada (PBMC) mediante una columna de enriquecimiento de selección negativa (R&D Systems, Minneapolis, MN; Cat#HTCC-525). Las células T se estimulan durante 4 días en matraces (tapa con orificio Corning, Acton, MA) revestidos con anti-CD3 10 µg/mL (OKT-3, eBioscience, Inc., San Diego, CA) y anti-CD28 2 g/mL (CD28.2, eBioscience, Inc., San Diego, CA) en D-PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se cultivan en IL-2 30U/mL (Roche) en medios RPMI 1640 completos (Invitrogen, Carlsbad, CA) con L-glutamina, β-ME 55 mM, Pen/Strep, 10% FBS). Las células T se cosechan entonces toda la noche en IL-2 30 U/mL antes de usarse en el ensayo. Las células objetivo DoHH2 o Raji se etiquetan con PKH26 (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utiliza medio RPMI 1640 (sin fenol, Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene L-glutamina y FBS 10% (Hy clone, Logan,

UT) en todo el ensayo rCTL. (Ver Dreier et al. (2002) Int. J. Cancer 100:690). Se colocan en placas células T efectoras (E) y objetivo (T) a una concentración de células final de 105 y 104 células/pozo en placas de 96 pozos (Costar #3799, Acton, MA), respectivamente para dar una proporción de 10:1. Las moléculas de DVD-Ig se diluyen para obtener curvas de titulación dependientes de la concentración. Después de una incubación de toda la noche las células se aglomeran y lavan con D-PBS una vez antes de re-suspenderse en amortiguador FACS que contiene BSA 0.1% (Invitrogen, Carlsbad, CA), azida de sodio 0.1% y 0.5 g/mL yoduro de propidio (BD) en D-PBS. Se recolectan datos de FACS en una máquina FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA) y se analizan en Flowjo (Treestar). Los objetivos de vida porcentual en las muestras tratadas con molécula de DVD-Ig divididas por los objetivos totales porcentajes (control, sin tratamiento) se calculan para determinar la lisis específica porcentual. Los IC50s se calculan en Prism (Graphpad).

Ejemplo 1.4: Generación de una Molécula de DVD-Ig

Se construyen moléculas de DVD-Ig capaces de unir dos antígenos utilizando dos anticuerpos monoclonales parentales, uno contra el antígeno A humano, y el otro antígeno B humano, seleccionado que se describe en la presente.

Ejemplo 1.4.1: Generación de una molécula de DVD-Ig que tiene Dos Longitudes de Enlace

Se utiliza una región constante que contiene µl de Fc con mutaciones a

234, y 235 para eliminar las funciones efectoras ADCC/CDC. Se generan cuatro diferentes constructores DVD-IG anti-A/B: 2 con enlace corto y 2 con enlace largo, cada uno en dos diferentes orientaciones de dominio: V_A-V_B-C and V_B-V_A-C (ver Tabla 13). Las secuencias de enlace, derivadas de la secuencia N-terminal de Cl/Ck o dominio CH1, son como sigue:

Para constructos DVDAB:

cadena ligera (si anti-A tiene λ: Enlace corto: QPKAAP (SEQ ID NO: 15); Enlace largo: QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 16)

cadena ligera (si anti-A tiene κ): enlace corto: TVAAP (SEQ ID NO: 13); enlace largo: TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 14)

cadena pesada (γ1): enlace corto: ASTKGP (SEQ ID NO: 21); enlace largo: ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 22)

Para constructos DVDBA:

cadena ligera (si anti-B tiene λ): enlace corto: QPKAAP (SEQ ID NO: 15); enlace largo: QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 16)

cadena ligera (si anti-B tiene κ):enlace corto: TVAAP (SEQ ID NO: 13); enlace largo: TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 14)

cadena pesada (γ1): enlace corto: ASTKGP (SEQ ID NO: 21); enlace largo: ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 22)

Los constructos de cadena pesada y ligera se sub-clonan en el vector de expresión pBOS, y se expresan en células COS, seguido por purificación mediante cromatografía con Proteína A. Los materiales se someten a SDS-PAGE y análisis SEC.

La Tabla 13 describe los constructos de cadena pesada y cadena ligera

utilizados para expresar cada proteína DVD-Ig anti-A/B.

Tabla 13: Constructos DVD-Ig Anti-A/B

Proteína DVD-Ig	Constructo de cadena pesada	Constructo de cadena ligera
DVDABSL	DVDABHC-SL	DVDABLC-SL
DVDABLL	DVDABHC-LL	DVDABLC-LL
DVDBASL	DVDBAHC-SL	DVDBALC-SL
DVDBALL	DVDBAHC-LL	DVDBALC-LL

Ejemplo 1.4.2: Clonación molecular de constructos de ADN para DVDABSL y DVDABLL

Para generar constructos de cadena pesada DVDABHC-LL y DVDABHC-SL, dominio VH del anticuerpo A se amplifica con PCR utilizando cebadores específicos (los cebadores 3' contienen la secuencia de revestimiento corta/larga para constructos SL/LL, respectivamente; entretanto el dominio VH del anticuerpo B se amplifica utilizando los cebadores específicos (los cebadores 5' contienen la secuencia de revestimiento corta/larga para constructos SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones PCR se realizan de acuerdo a las técnicas y procedimientos PCR estándar. Los dos productos PCR se purifican con gel, y se utilizan conjuntamente como plantilla de sobreposición para la subsecuente reacción de PCR de sobreposición. Los productos de sobreposición PCR se subclonan en el vector de expresión distinto al mamífero pBOS-hCγ1,z digerido doble Srf I y Sal I (Abbott) utilizando la metodología de recombinación homóloga estándar.

Para generar constructos de cadena pesada DVDABLC-LL y DVDABLC-SL, dominio VL del anticuerpo A se amplifica con PCR utilizando cebadores específicos (los cebadores 3' contienen la secuencia de revestimiento corta/larga para constructos SL/LL, respectivamente; entretanto el dominio VL del anticuerpo B se amplifica utilizando los cebadores específicos (los cebadores 5' contienen la secuencia de revestimiento corta/larga para constructos SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones PCR se realizan de acuerdo a las técnicas y procedimientos PCR estándar. Los dos productos PCR se purifican con gel, y se utilizan conjuntamente como plantilla de sobreposición para la subsecuente reacción de PCR de sobreposición. Los productos de sobreposición PCR se subclonan en el vector de expresión de mamífero pBOS-hCk digerido doble Srf I y Not I (Abbott) utilizando la metodología de recombinación homóloga estándar. Se ha utilizado metodología similar para generar DVDBASL y DVDBALL como se describe más adelante:

Ejemplo 1.4.3: Clonación molecular de constructos de ADN para DVDBASL y DVDBALL

Para generar constructos de cadena pesada DVDBAHC-LL y DVDBAHC-SL, dominio VH del anticuerpo A se amplifica con PCR utilizando cebadores específicos (los cebadores 3' contienen la secuencia de revestimiento corta/larga para constructos SL/LL, respectivamente; entretanto el dominio VH del anticuerpo B se amplifica utilizando los cebadores específicos (los cebadores 5' contienen la secuencia de revestimiento corta/larga para constructos SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones PCR se realizan de acuerdo a las técnicas y

procedimientos PCR estándar. Los dos productos PCR se purifican con gel, y se utilizan conjuntamente como plantilla de sobreposición para la subsecuente reacción de PCR de sobreposición. Los productos de sobreposición PCR se subclonan en el vector de expresión distinto al mamífero pBOS-hCγ1,z digerido doble Srf I y Not I (Abbott) utilizando la metodología de recombinación homóloga estándar.

Para generar constructos de cadena pesada DVDBALC-LL y DVDBALC-SL, dominio VL del anticuerpo A se amplifica con PCR utilizando cebadores específicos (los cebadores 3' contienen la secuencia de revestimiento corta/larga para constructos SL/LL, respectivamente; entretanto el dominio VL del anticuerpo B se amplifica utilizando los cebadores específicos (los cebadores 5' contienen la secuencia de revestimiento corta/larga para constructos SL/LL, respectivamente). Ambas reacciones PCR se realizan de acuerdo a las técnicas y procedimientos PCR estándar. Los dos productos PCR se purifican con gel, y se utilizan conjuntamente como plantilla de sobreposición para la subsecuente reacción de PCR de sobreposición. Los productos de sobreposición PCR se subclonan en el vector de expresión de mamífero pBOS-hCk digerido doble Srf I y Not I (Abbott) utilizando la metodología de recombinación homóloga estándar.

Ejemplo 1.4.4: <u>Construcción y Expresión de la molécula de DVD-Ig Adicional</u>

Ejemplo 1.4.4.1: <u>Preparación de Constructos del Vector DVD-Ig</u>

Las secuencias de aminoácidos de anticuerpos parentales para anticuerpos específicos, que reconocen antígenos o epítopes específicos de los mismos, para su incorporación en una molécula de DVD-Ig se puede obtener

mediante la preparación de hibridomas como se describe anteriormente o se puede obtener secuencia proteínas de anticuerpos conocidos o ácidos nucleicos. Además, se pueden obtener secuencias conocidas de la literatura. Las secuencias se pueden utilizar para sintetizar ácidos nucleicos utilizando tecnologías de síntesis o amplificación de ADN estándar y ensamblando los fragmentos de anticuerpos deseados en vectores de expresión, utilizando tecnología de ADN recombinante estándar, para su expresión en células.

Por ejemplo, se determinaron codones de ácido nucleico de secuencias de aminoácidos y el ADN del oligonucleótido se sintetizó mediante Blue Heron Biotechnology, Inc. (www.blueheronbio.com) Bothell, WA EUA. Los oligonucleótidos se ensamblaron en fragmentos de ADN de doble hebra de 300-2,000 pares base, se clonaron en un vector de plásmido y se verificó la secuencia. Los fragmentos clonados se ensamblaron utilizando un proceso enzimático para producir el gen completo y se sub-clonó en un vector de expresión. (Ver 7,306,914; 7,297,541; 7,279,159; 7,150,969; 20080115243; 20080102475; 20080081379; 20080075690; 20080063780; 20080050506; 20080038777; 20080022422; 20070289033; 20070287170; 20070254338; 20070243194; 20070225227; 20070207171; 20070150976; 20070135620; 20070128190; 20070104722; 20070092484; 20070037196; 20070028321; 20060172404; 20060162026; 20060153791; 20030215458; 20030157643).

Un grupo de vectores pHybE (Solicitud de Patente Norteamericana No. de Serie 61/021,282) se utilizaron para la clonación del anticuerpo parental y molécula de DVD-Ig. V1, se deriva de pJP183; pHybE-hCgl,z, sin un V2, se utilizó para clonar un anticuerpo y cadenas pesadas DVD con una región constante de

tipo silvestre. V2, se deriva de pJP191; pHybE-hCk V2, se utilizó para la clonación del anticuerpo y cadenas ligeras DVD con una región constante kappa. V3, se deriva de pJP192; pHybE-hC1 V2, se utilizó para clonar el anticuerpo y cadenas ligeras DVDs con una región constante lambda. V4, se construye con un péptido de señal lambda y una región constante kappa, se utilizó para clonar las cadenas ligeras DVD con un dominio V hibrido lambda-kappa. V5, se construye con un péptido de señal kappa y una región constante lambda, se utilizó para clonar las cadenas ligeras DVD con un dominio V hibrido kappa-lambda. V7, se derivó de pJP183; pHybE-hCg1,z, sin un V2, se utilizó para clonar el anticuerpo y cadenas pesadas DVD con una región constante mutante (234,235 AA).

Refiriéndose a la Tabla 14, se utilizó un número de vectores en la clonación de los anticuerpos parentales y cadenas VH y VL de la molécula de DVD-Ig.

Tabla 14: Vectores Utilizados para Clonar Anticuerpos Parentales y Moléculas de DVD-Ig

ID	Vector de cadena pesada	Vector de cadena ligera
E26.13	V7	V2
E26.35	V7	V2
1B12.1	V7	V2
1B12.3	V7	V2
1B12.6	V7	V2
3D12.8	V7	V2
3D12.16	V7	V2
3D12.10/15	V7	V2
3D12r16	V7	V2
E26.13-LL-3D12.16	V7	V2
E26.13-LL-3D12.8	V7	V2
E26.13-SS-3D12.16	V7	V2

E26.13-SS-3D12.8	V7	V2
E26.13-SS-3D12.10/15	V7	V2
E26.35-SS-3D12.10/15	V7	V2
E26.35-SS-3D12r16	V7	V2
1B12.1-SS-3D12r16	V7	V2
1B12.3-SS-3D12r16	V7	V2
1B12.6-SS-3D12r16	V7	V2

Ejemplo 1.4.4.2: <u>Transfección y Expresión en Células 293</u>

La expresión de los anticuerpos de referencia y moléculas de DVD-Ig se logró co-transfectando temporalmente células HEK293 (EBNA) con plásmidos que contienen los correspondientes ácidos nucleicos de cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC). Las células HEK293 (EBNA) se propagaron en medio Freestyle 293 (Invitrogen, Carlsbad CA) a una escala de 0.5 L en matraces (2 L Corning Cat# 431198) agitando en una incubadora con CO_2 (CO_2 8%, 125 RPM, 37°C). Cuando los cultivos alcanzaron una densidad de 1 x 106 células/ml, las células se transfectaron con complejo de transfección. El complejo de transfección se preparó mezclando primero 150 µg de plásmido LC y 100 µg de plásmido HC conjuntamente en 25 ml de medio Freestyle, seguido por la adición de solución stock PEI 500 µl [solución stock: 1 mg/ml (pH 7.0) PEI Lineal 25 kDa, Polysciences Cat# 23966]. El complejo de transfección se mezcló mediante inversión y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de agregarse al cultivo

de células. Después de la transfección, los cultivos se dejaron continuar creciendo en la incubadora con CO_2 (CO_2 8%, 125 RPM, 37°C). Veinticuatro horas después de la transfección, el cultivo se suplementó con 25 ml de una solución de Triptona N1 10% (Organo Technie, La Courneuve France Cat# 19553). Nueve días después de la transfección, las células se removieron de los cultivos mediante centrifugación (16,000 g, 10 minutos), y el sobrenadante retenido se filtró con esterilidad (Millipore HV Durapore Stericup, 0.45 um) y se colocó a 4°C hasta el inicio de la etapa de purificación.

Cada anticuerpo o molécula de DVD-Ig se purificó individualmente utilizando una columna empacada de 1 ml desechable (empacada por Orochem Technologies) que contienen resina MabSelect SuRe (GE Healthcare). Las columnas se pre-equilibraron en PBS y se cargaron con las muestras de 0.55 L cosechadas toda la noche (15 horas) a 1 ml/minuto con el flujo directo que circula de regreso al contenedor de alimentación. Siguiendo la etapa de carga, las columnas se lavaron con PBS 20 ml y la proteína se diluyo alimentando el amortiguador de elución [ácido cítrico 50 mM pH 3.5] a 4 ml/min y recolectando fracciones (1 ml) en tubos que ya contienen 0.2 ml de Tris 1.5 M pH 8.2 (llevando el pH final aproximadamente a 6.0). Las fracciones que contienen el anticuerpo se reunieron en base a los cromatogramas y se dializaron en el amortiguador de almacenamiento final [ácido cítrico 10 mM, Na_2HPO_4 10 mM, pH 6.0]. Después de la diálisis, las muestras se filtraron a través de un Steriflip 0.22 µm (Millipore) y la concentración de la proteína se determinó mediante absorbancia [espectrofotómetro de arreglo de diodos Hewlett Packard 8453]. Se realizó un análisis SDS-PAGE en muestras analíticas (tanto reducidas como no reducidas)

para evaluar la pureza final, verificar la presencia de bandas de cadena pesada y ligera de tamaño apropiado, y confirmar la ausencia de cantidades significativas de cadena ligera libre (por ejemplo, sin complejo) (en las muestras no reducidas).

La Tabla 15 contiene los datos producidos de los anticuerpos parentales o constructos de DVD-Ig expresados como miligramos por litro en células 293.

Tabla 15: Expresión Temporal en Rendimientos de Anticuerpos Parentales y Constructos de DVD-Ig en Células 293

Anticuerpo Parental o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-Terminal (VD)	Dominio Variable C-Terminal (VD)	Rendimiento de Expresión (mg/L)
3D12.8	IL-1alfa (sec. 1)		40
3D12.16	IL-1alfa (sec. 2)		40
3D12.10/15	IL-1alfa (sec. 3)		40
3D12r16	IL-1alfa (sec. 4)		9
E26.13	IL-1beta (sec. 1)		72
E26.35	IL-1beta (sec. 2)		40
E26.13-LL-3D12.16	IL-1beta (sec. 1)	IL-1alfa (sec. 2)	0
E26.13-LL-3D12.8	IL-1beta (sec. 1)	IL-1alfa (sec. 1)	0

Anticuerpo Parental o DVD-Ig ID	Dominio Variable N-Terminal (VD)	Dominio Variable C-Terminal (VD)	Rendimiento de Expresión (mg/L)
E26.13-SS-3D12.10/15	IL-1beta (sec. 1)	IL-1alfa (sec. 3)	15
E26.13-SS-3D12.16	IL-1beta (sec. 1)	IL-1alfa (sec. 2)	0
E26.13-SS-3D12.8	IL-1beta (sec. 1)	IL-1alfa (sec. 1)	0
E26.35-SS-3D12.10/15	IL-1beta (sec. 2)	IL-1alfa (sec. 3)	10
E26.35-SS-3D12r16	IL-1beta (sec. 2)	IL-1alfa (sec. 4)	50
1B12.1	IL-1beta (sec. 3)		40.5
1B12.1-SS-3D12r16	IL-1beta (sec. 3)	IL-1alfa (sec. 4)	9.8
1B12.3	IL-1beta (sec. 4)		56
1B12.3-SS-3D12r16	IL-1beta (sec. 4)	IL-1alfa (sec. 4)	22.2
1B12.6	IL-1beta (sec. 5)		55.5
1B12.6-SS-3D12r16	IL-1beta (sec. 6)	IL-1alfa (sec. 4)	9.8

Todas las DVDs se expresan bien en las células 293. las DVDs podrían purificarse fácilmente en una columna de proteína A. En la mayoría de los casos > 5 mg/L de molécula de DVD-Ig purificada podrían obtenerse fácilmente de sobrenadantes de células 293.

Ejemplo 1.4.5: Caracterización y Selección Principal de Moléculas DVD-Ig A/B

Las afinidades de moléculas de DVD-Ig A/B se analizan en Biacore contra la proteína y proteína B. La propiedad tetravalente de la molécula de DVD-Ig se examina mediante estudios de unión múltiple en Biacore. Entretanto, la potencia de neutralización de las moléculas de DVD-Ig para la proteína A y proteína B se evalúan mediante bioensayos, respectivamente, como se describe en la presente. Las moléculas de DVD-Ig que retienen mejor la afinidad y potencia de los mAbs parentales original se seleccionan por sus caracterizaciones fisicoquímicas a profundidad y bio-analíticas (rata PK) como se describe en la presente para cada mAb. En base a la recolección de análisis, la molécula de DVD-Ig principal final se hace avanzar al desarrollo de la línea celular estable CHO, y el material derivado de CHO se emplea en estudios de estabilidad, farmacocinéticos y de eficacia en monos macacos, y actividades de pre-formulación.

Ejemplo 2: Generación y Caracterización de Moléculas de Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual (DVD-Ig)

Se generaron moléculas de inmunoglobulina de dominio variable dual (DVD-Ig) utilizando anticuerpos parentales con secuencias de aminoácidos conocidas sintetizando fragmentos de polinucleótidos que codifican secuencias de cadena ligera variable DVD-Ig y de cadena pesada variable DVD-Ig y clonando los fragmentos en un vector pHybC-D2 de acuerdo al Ejemplo 1.4.4.1. Los constructos DVD-Ig se clonaron en y expresados en células 293 como se describe en el Ejemplo 1.4.4.2. La proteína DVD-Ig se purificó de acuerdo a los métodos

estándar. Las características funcionales se determinaron de acuerdo a los métodos descritos en el Ejemplo 1.1.1 y 1.1.2 que se indican. Las cadenas VH y VL de DVD-Ig para las moléculas de DVD-Ig de la invención se proveen a continuación.

Ejemplo 2.1: <u>Generación de Moléculas de DVD-Ig IL-1alfa(sec. 3) e IL-1beta(sec. 1) con el Conjunto de Enlace 1</u>

Tabla 16

SEQ ID NO				Secuencia 12345678901234567890123456789012345
52	E26.13-SS-3D12 10/15 VH	E26.13	3D12 10/15	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMS WVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARGGVTKGY FDVWGQGTPVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGAEVKKPG VSVKVSCKASGYTFTTYGMHWVRQAPGQGLEWMGW INTYTGESTYADDFQGRVTFTLDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMNYWGQGTTVTV SS
53	E26.13-SS-3D12 10/15 VL	E26.13	3D12 10/15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLTW YQQTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTKLQ ITR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DISNMLNWYQQKPGKTPKLLIYYTSRLYPGVPSRF SGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYFCQQGKTLPYA FGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.2: <u>Generación de Moléculas de DVD-Ig IL-1alfa(sec. 2) e IL-1beta(sec. 1) con los Conjuntos de Enlace 1 y 2</u>

Tabla 17

SEQ ID NO	Variable DVD Nombre de Variable	Variable Externa Nombre de Variable	Variable Interna Nombre de Variable	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
54	E26.13-SS-3D12.16 VH	E26.13	3D12.16	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMS WVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARGGVTKGY FDVWGQGTPVTVSS**ASTKGP**EIQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQDLERMAW INTYTGESTYADDFKGRFTFTLDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMDYWGQGTTVTV SS
55	E26.13-SS-3D12.16 VL	E26.13	3D12.16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLTW YQQTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTKLQ ITR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DISNCLNWYQQKPGKTPKLLIYYTSRLHSGVPSRF SGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYFCQQGKTLPYA FGQGTKLEIKR
56	E26.13-LL-3D12.16 VH	E26.13	3D12.16	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMS WVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARGGVTKGY FDVWGQGTPVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EIQLVQSG AEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQ DLERMAWINTYTGESTYADDFKGRFTFTLDTSTST AYMELSSLRSEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMDYWG QGTTVTVSS
57	E26.13-LL-3D12.16 VL	E26.13	3D12.16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLTW YQQTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTKLQ ITR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNCLNWYQQKPGKTPKLLIYYTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYFCQQ GKTLPYAFGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.3: <u>Generación de Moléculas de DVD-Ig IL-1alfa(sec. 1) e IL-1beta(sec. 1) con el Conjunto de Enlace 1 y 2</u>

Tabla 18

SEQ ID NO	Variable DVD Nombre de Variable	Variable Externa Nombre de Variable	Variable Interna Nombre de Variable	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
58	E26.13-SS-3D12.8 VH	E26.13	3D12.8	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMS WVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARGGVTKGY FDVWGQGTPVTVSS**ASTKGP**EIQLVQSGSELKKPG ASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQDLERMAW INTYTGESTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISS LKAEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMDYWGQGTTVTV SS
59	E26.13-SS-3D12.8 VL	E26.13	3D12.8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLTW YQQTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTKLQ ITR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DISNCLNWYQQKPGKTPKLLIYYTSRLHSGVPSRF SGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYFCQQGKTLPYA FGQGTKLEIKR
60	E26.13-LL-3D12.8 VH	E26.13	3D12.8	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMS WVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARGGVTKGY FDVWGQGTPVTVSS**ASTKGPSVFPLAP**EIQLVQSG SELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQ DLERMAWINTYTGESTYADDFKGRFVFSLDTSVST AYLQISSLKAEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMDYWG QGTTVTVSS
61	E26.13-LL-3D12.8 VL	E26.13	3D12.8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLTW YQQTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTKLQ ITR**TVAAPSVFIFPP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNCLNWYQQKPGKTPKLLIYYTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYFCQQ GKTLPYAFGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.4: <u>Generación de Moléculas de DVD-Ig IL-1alfa(sec. 3) e IL-1beta(sec. 2) con el Conjunto de Enlace 1</u>

Tabla 19

SEQ ID NO	Variable DVD Nombre de Variable	Variable Externa Nombre de Variable	Variable Interna Nombre de Variable	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
62	E26.35-SS-3D12 10/15 VH	E26.35	3D12 10/15	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMS WVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRAEDTAVYYCARGGVYKGY FDVWGQGTPVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGAEVKKPG VSVKVSCKASGYTFTTYGMHWVRQAPGQGLEWMGW INTYTGESTYADDFQGRVTFTLDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYFCARGIYYYGSSYAMNYWGQGTTVTV SS
63	E26.35-SS-3D12 10/15 VL	E26.35	3D12 10/15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLTW YQQTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTKLQ ITR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DISNMLNWYQQKPGKTPKLLIYYTSRLYPGVPSRF SGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYFCQQGKTLPYA FGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.5: Generación de Moléculas de DVD-Ig IL-1alfa(sec. 4) e IL-1beta(sec. 2) con el Conjunto de Enlace 1

Tabla 20

SEQ ID NO	Variable DVD Nombre de Variable	Variable Externa Nombre de Variable	Variable Interna Nombre de Variable	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
64	E26.35-SS-3D12r16 VH	E26.35	3D12r16	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFSRYDMS WVRQAPGKGLEWVAYISHGGAGTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMDSLRAEDTAVYYCARGGVYKGY FDVWGQGTPVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFKYYGMNWVRQAPGQGLERMGW INTYTGQSTYADDFKGRVTFTLDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARDIYYYGSDFAMDYWGQGTTVTV SS
65	E26.35-SS-3D12r16 VL	E26.35	3D12r16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLTW YQQTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDIATYYCQHFWSIPYTFGQGTKLQ ITR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DISNMLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLKPGVPSRF SGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYFCQQGKTAPYT FGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.6: Generación de Moléculas de DVD-Ig IL-1alfa(sec. 4) e IL-1beta(sec. 3) con el Conjunto de Enlace 1

Tabla 21

SEQ ID NO	Variable DVD Nombre de Variable	Variable Externa Nombre de Variable	Variable Interna Nombre de Variable	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
66	1B12.1-SS-3D12r16 VH	1B12.1	3D12r16	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSDYGVS WIRQPPGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRLTIS KDNSKSQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKQRTLWGYD LYGMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFKYYGMNWVRQAPGQGLER MGWINTYTGQSTYADDFKGRVTFTLDTSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARDIYYYGSDFAMDYWGQGTT VTVSS
67	1B12.1-SS-3D12r16 VL	1B12.1	3D12r16	DTQVTQSPSSLSASVGDRVTITCITSTDIDVDMNW YQQKPGKPPKLLISQGNTLRPGVPSRFSSSGSGTD FTFTISSLQPEDFATYYCLQSDNLPLTFGQGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DISNMLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLKPGVPSRF SGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYFCQQGKTAPYT FGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.7: Generación de Moléculas de DVD-Ig IL-1alfa(sec. 4) e IL-1beta(sec. 4) con el Conjunto de Enlace 1

Tabla 22

SEQ ID NO	Variable DVD Nombre de Variable	Variable Externa Nombre de Variable	Variable Interna Nombre de Variable	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
68	1B12.3-SS-3D12r16 VH	1B12.3	3D12r16	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSDYGVS WIRQPPGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRLTIS KDNSKSQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKQRTLWGYD LYGMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFKYYGMNWVRQAPGQGLER MGWINTYTGQSTYADDFKGRVTFTLDTSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARDIYYYGSDFAMDYWGQGTT VTVSS
69	1B12.3-SS-3D12r16 VL	1B12.3	3D12r16	DTVVTQSPAFLSVTPGEKVTITCITSTDIDVDMNW YQQKPDQPPKLLISQGNTLRPGVPSRFSSSGSGTD FTFTISSLEAEDAATYYCLQSDNLPLTFGQGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DISNMLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLKPGVPSRF SGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYFCQQGKTAPYT FGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.8: Generación de Moléculas de DVD-Ig IL-1alfa(sec. 4) e IL-

1beta(sec. 5) con el Conjunto de Enlace 1

Tabla 23

SEQ ID NO	Variable DVD Nombre de Variable	Variable Externa Nombre de Variable	Variable Interna Nombre de Variable	Secuencia 12345678901234567890123456789012345
70	1B12.6-SS-3D12r16 VH	1B12.6	3D12r16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLSDYGVS WIRQAPGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRLTIS KDNSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQRTLWGYD LYGMDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFKYYGMNWVRQAPGQGLER MGWINTYTGQSTYADDFKGRVTFTLDTSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARDIYYYGSDFAMDYWGQGTT VTVSS
71	1B12.6-SS-3D12r16 VL	1B12.6	3D12r16	ETTVTQSPSSLSASVGDRVTITCITSTDIDVDMNW YQQKPGKPPKLLISQGNTLRPGVPSRFSSSGSGTD FTFTISSLQPEDFATYYCLQSDNLPLTFGQGTKLE IKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DISNMLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLKPGVPSRF SGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYFCQQGKTAPYT FGQGTKLEIKR

Ejemplo 2.9: Secuencias del Vector de Clonación Utilizadas para Clonar el Anticuerpo Parental y Secuencias de DVD-Ig

Tabla 24

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
72	V1	GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGC GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGG ATCCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAA TAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGG CAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCC CCGCCCCGGACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCG GGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGC CCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGA

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		CTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTG
		GCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTG
		CCTTTATGTGTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACAT
		GTACCTCCCAGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATC
		AGAGGGGCCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCA
		ATAGTGTTTATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTC
		CCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGT
		TACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTA
5		AGGAACAGCGATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATG
		GGGTCAGGATTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGG
		CTGAAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCT
		TCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAA
		GGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATA
		AAATTTGGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAA
		CCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCT
		GAATATCTTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACT
		GGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGT
		GCAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACA
		GGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGAC
		GCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAA
		CGGGGCTCCACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTT
		TTTTTGAAATTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTG
10		CGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCC
		GCTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCC
		GGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGC
		TGCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAG
		GGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATG
		TTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC
		TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT
		ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCT
		GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA
		TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATG
		CTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGG
		TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATAT
		CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCT
15		AATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA
		TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG
		GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT
		CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGA
		ATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAA
		TGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA
		TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA
		TCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG
		GAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGC
		GGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
		AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCT
		CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAAT
		GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGA
		CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTT
20		GGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT
		AAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA
		CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA
		CAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAA
		TGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGC
		AACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG
		GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT
		GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG
		TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC
		CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA
		ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA
		ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCA
		TTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA AAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG CTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCA AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT ACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA CTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATA GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACA GCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCA CATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCC CGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTG GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTA GGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT TGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC CAAGCTCTAGCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAA GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCA TCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGAC TAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTAT TCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGC TTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATG GACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG GGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGGAGGGGTCGG CAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGA TGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAG AACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTG CGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCG CTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGC TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGG TATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCG CACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACG GGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCC GTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGC GTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATG GAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCG GGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTC TTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGA ATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGT GGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAG ATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTTGGG CTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGC
73	V2	ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTTGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGA CCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTT GGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATT

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		TGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGG ACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGC ATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCA CATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTG ACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATC CTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGT GTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCC AGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCC TGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTT ATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGT AGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACG GGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGC GATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGA TTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATC AAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCC TTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGT GAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGA CGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAA ACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTT TAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCA TCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGA TACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCA TGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGC AGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCC ACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAA TTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGG ACTGTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCAC TGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATAC CTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTG GAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGG TCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGG GTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATA TCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCAT AGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT GGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAA TAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATA CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGC ATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATAT CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCT AATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCG GGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTG AAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGAT AATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTG CCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCAC TTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCA AGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA CTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT ATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCT GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGG GGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTT GCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATT AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC CCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGA CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATT TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCC TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC AAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACC AACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC TGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG TGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA TAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTT GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG GTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG AGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAG CGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTG GCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGG CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCA GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG ATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTA GCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCC TAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTT TTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGT AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAG ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTA GGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCG CACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAAC CGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTA CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGT AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGT AAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCC TTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC CGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGG AGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCG CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAA GTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTG GCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGT TTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTC GGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTC TCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGC CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGA AAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCG GCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTC CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTG GGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCT TTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG TTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGA CCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCACCATGGACATGCGCGTGCCCGCCC AGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGC
74	V3	CAACCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGA GTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGC AGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGC

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901
		TGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACA GAATGTTCATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGACCT CGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGA ATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTGG TCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGGACG AACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGCATG TAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCACAT GTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACA TCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATCCTG GAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGTA ACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCCAGG GGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGT GTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATA AGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGT ATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGA AGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGCGAT ATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGATTC CACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG GAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCCTTC GTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG GTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGACGG GGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAAACC CCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTTTAA CAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCT CACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATAC TGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGT TGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGC GGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCCACG CCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAATTG TGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACT GTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCACTGC GGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTG CATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAG GACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGGTCC TCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTA GCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGG CTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGG TAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAG AGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTA CCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT TTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGC TATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGT AGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTGAAG ACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT AATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC CCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG ACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCT TCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAA GATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTT TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGA GCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGAC AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGA TCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		CAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCT TCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTC TCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCA AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAA AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA ACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAA AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC TCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA GGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGA GCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG CGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGC CTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCC TGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGC TGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCC GATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAG TGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGC TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATA ACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCT AGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCA ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA CTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTA TTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATG GATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGT CTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC ATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGG TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTG GCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTG CGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGA GCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGC CCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCG CGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTC TCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTT TGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGC GAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCA AGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCC GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAG ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCG CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC GTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAG GCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGG GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT TTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGACCT CGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGACTTGGACCCCACTCCTCTTC CTCACCCTCCTCCTCCACTGCACAGGAAGCTTATCG
75	V4	ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		AAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA
		GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
		CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
		AGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC
		TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC
		AGGGGAGAGTGTTGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGA
		CCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTT
		GGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATT
		TGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGG
		ACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGC
		ATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCA
		CATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTG
		ACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATC
		CTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGT
		GTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCC
		AGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCC
		TGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTT
		ATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGT
		AGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACG
		GGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGC
		GATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGA
		TTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATC
		AAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCC
		TTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGT
		GAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGA
		CGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAA
		ACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTT
		TAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCA
		TCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGA
		TACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCA
		TGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGC
		AGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCC
		ACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAA
		TTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGG
		ACTGTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCAC
		TGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATAC
		CTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTG
		GAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGG
		TCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGG
		GTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATA
		TCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCC
		TAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCAT
		AGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT
		GGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAA
		TAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATA
		CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGC
		ATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATAT
		CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCT
		AATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA
		TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCG
		GGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTG
		AAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGAT
		AATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG
		AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT
		GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT
		GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTG
		CCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA
		AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
		TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCAC
		TTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCA
		AGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA
		CTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		ATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCT
		GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGG
		GGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
		ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTT
		GCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATT
		AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC
		CCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG
		GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT
		CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG
		ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGA
		CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATT
		TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCC
		TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA
		AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC
		AAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACC
		AACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC
		TGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
		ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG
		TGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA
		TAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTT
		GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA
		AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG
		CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG
		GTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT
		TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC
		GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT
		TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG
		AGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAG
		CGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTG
		GCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGG
		CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCA
		GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
		ATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTA
		GCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC
		TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCC
		TAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTT
		TTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGT
		AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAG
		ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTA
		GGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCG
		CACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAAC
		CGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTA
		CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGT
		AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGT
		AAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCC
		TTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC
		CGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGG
		AGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCG
		CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAA
		GTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTG
		GCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGT
		TTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTC
		GGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTC
		TCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGC
		CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGA
		AAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCG
		GCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT
		TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTC
		CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTG
		GGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC
		TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCT
		TTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901
		TTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGA CCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCACCATGACTTGGACCCCACTCCTCT TCCTCACCCTCCTCCTCCACTGCACAGGAAGCTTATCG
76	V5	CAACCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGA GTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGC AGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGC TGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACA GAATGTTCATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGACCT CGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGA ATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTGG TCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGGACG AACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGCATG TAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCACAT GTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACA TCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATCCTG GAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGTA ACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCCAGG GGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGT GTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATA AGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGT ATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGA AGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGCGAT ATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGATTC CACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG GAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCCTTC GTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG GTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGACGG GGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAAACC CCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTTTAA CAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCT CACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATAC TGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGT TGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGC GGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCCACG CCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAATTG TGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACT GTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCACTGC GGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTG CATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAG GACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGGTCC TCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTA GCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGG CTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGG TAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAG AGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTA CCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT TTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGC TATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGT AGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTGAAG ACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT AATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC CCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG ACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCT TCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAA

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		GATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTT TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGA GCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGAC AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGA TCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG CAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCT TCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTC TCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCA AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAA AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA ACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAA AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC TCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA GGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGA GCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG CGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGC CTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCC TGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGC TGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCC GATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAG TGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGC TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATA ACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCT AGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCA ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA CTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTA TTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATG GATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGT CTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC ATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGG TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTG GCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTG CGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGA GCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGC CCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCG CGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTC TCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTT TGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGC GAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCA AGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCC GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAG ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCG CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC GTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAG

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		GCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGG
		GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA
		AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT
		TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT
		TTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGACCT
		CGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGACATGCGCGTGCCCGCCCAG
		CTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGC
77	V7	GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC
		ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC
		GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC
		ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
		GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG
		AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT
		TGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCGGGG
		GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC
		TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
		CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
		AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
		GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
		AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
		GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGC
		GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
		TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
		AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC
		TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
		TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC
		CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGG
		ATCCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAA
		TAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGG
		CAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCC
		CCGCCCCGGACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCG
		GGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGC
		CCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGA
		CTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTG
		GCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTG
		CCTTTATGTGTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACAT
		GTACCTCCCAGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATC
		AGAGGGGCCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCA
		ATAGTGTTTATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTC
		CCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGT
		TACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTA
		AGGAACAGCGATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATG
		GGGTCAGGATTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGG
		CTGAAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCT
		TCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAA
		GGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATA
		AAATTTGGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAA
		CCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCT
		GAATATCTTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACT
		GGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGT
		GCAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACA
		GGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGAC
		GCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAA
		CGGGGCTCCACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTT
		TTTTTGAAATTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTG
		CGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCC
		GCTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCC
		GGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGC
		TGCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAG
		GGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATG
		TTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC
		TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCT
		GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA
		TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATG
		CTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGG
		TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATAT
		CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCT
		AATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA
		TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG
		GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT
		CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGA
		ATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAA
		TGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA
		TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA
		TCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG
		GAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGC
		GGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
		AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCT
		CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAAT
		GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGA
		CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTT
		GGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT
		AAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA
		CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA
		CAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAA
		TGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGC
		AACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG
		GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT
		GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG
		TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC
		CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA
		ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA
		ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCA
		TTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC
		CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA
		AAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG
		CTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCA
		AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT
		ACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA
		CTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC
		TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATA
		GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACA
		GCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA
		GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC
		GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG
		AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA
		GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC
		CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCA
		CATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC
		CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA
		GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCC
		CGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTG
		GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTA
		GGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT
		TGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC
		CAAGCTCTAGCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAA
		GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCA
		TCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGAC
		TAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTAT
		TCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGC
		TTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATG
		GACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG
		GGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGG

SEQ ID NO	Nombre del vector	Secuencia de nucleótidos 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		CAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGA TGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAG AACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTG CGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCG CTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGC TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGG TATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCG CACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACG GGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCC GTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGC GTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATG GAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCG GGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTC TTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGA ATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGT GGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAG ATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTTGGG CTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGC

La presente invención incorpora como referencia en su totalidad técnicas bien conocidas en el campo de la biología molecular y suministro farmacéutico. Estas técnicas incluyen, pero no están limitadas, las técnicas se describen 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 and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);

Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New

York, New York, (1999);

Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984);

Hammerling, 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) and (1991);

Kabat, E.A., *et al*. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;

Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); Lu and Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1 -881299-21-X).

Medical Applications of Controlled Release. Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);

Old, R.W. & S.B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).

Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d

Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1 -3. (ISBN 0-87969-309-6).

Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems. J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978

Winnacker, E .L . From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgaufts). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4)

Incorporación por Referencia

El contenido de todas las referencias citadas (incluyendo referencias de literatura, patentes, solicitudes de patente, y sitios web) que puedan citarse a lo largo de esta solicitud se incorpora expresamente como referencia en su totalidad para cualquier propósito, cuando las referencias se citan en la presente. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular y biología celular, que son conocidas en el arte.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de enlace, caracterizada porque comprende una cadena de polipéptidos, en donde la cadena de polipéptidos comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde;

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada;

C es un dominio constante de cadena pesada;

X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1;

X2 es una región Fc; y

n es 0 o 1;

en donde la proteína de enlace es capaz de enlazar un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de IL-1 alfa e IL-1beta.

2. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOs: 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, y 46.

3. Una proteína de enlace, caracterizada porque comprende una cadena de polipéptidos, en donde la cadena de polipéptidos comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde;

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada y ligera;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada y ligera;

C es un dominio constante de cadena ligera;

X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es 0 o 1;

en donde la proteína de enlace es capaz de enlazar un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de IL-1alfa (sec. 3) e IL-1beta (sec. 1); IL-1alfa (sec. 2) e IL-1beta (sec. 1); IL-1 alfa (sec. 1) e IL-1beta (sec. 1); IL-1 alfa (sec. 3) e IL-1beta (sec. 2); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 2); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 3); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 4); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 5).

4. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque los dominios variables de cadena ligera VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOs: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, y 47.

5. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 1 o 3, caracterizada porque n es O.

6. Una proteína de enlace, caracterizada porque comprende primera y segunda cadenas de polipéptidos, en donde la primera cadena de polipéptidos comprende un primer VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada;

C es un dominio constante de cadena pesada;

X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1; y

X2 es una región Fc; y

en donde la segunda cadena de polipéptidos comprende un segundo VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera;

C es un dominio constante de cadena ligera;

X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es 0 o 1, en donde la proteína de enlace es capaz de enlazar un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de IL-1alfa (sec. 3) e IL-1beta (sec. 1); IL-1alfa (sec. 2) e IL-1beta (sec. 1); IL-1alfa (sec. 1) e IL-1beta (sec. 1); IL-1alfa (sec. 3) e IL-1beta (sec. 2); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 2); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 3); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 4); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 5).

7. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque los dominios variables de cadena pesada VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOs: 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, y 46 y en donde los dominios variables de cadena ligera VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOs: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, y 47.

8. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 1, 3, o 6, caracterizada porque X1 o X2 es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOs 1-26.

9. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque la proteína de enlace comprende dos primeras cadenas de polipéptidos y dos segundas cadenas de polipéptidos.

10. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 1, 3, o

6, caracterizada porque la región Fc se selecciona del grupo que consiste de región Fc de secuencia nativa y una región Fc de secuencia variante.

11. La proteína de enlace de conformidad 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 enlace de conformidad con la reivindicación 1, 3, o 6, caracterizada porque la VD1 de la primera cadena de polipéptidos y la VD1 de la segunda cadena de polipéptidos se obtienen de los mismos primero y segundo anticuerpo progenitor, respectivamente, o porción de enlace de antígeno del mismo.

13. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 1, 3, o 6, caracterizada porque la VD1 de la primera cadena de polipéptidos y la VD1 de la segunda cadena de polipéptidos se obtienen de un primero y segundo anticuerpo progenitor diferente, respectivamente, o porción de enlace de antígeno del mismo.

14. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 1, 3, o 6, caracterizada porque la VD2 de la primera cadena de polipéptidos y la VD2 de la segunda cadena de polipéptidos se obtienen del mismo primero y segundo anticuerpo progenitor, respectivamente, o porción de enlace de antígeno del mismo.

15. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 1, 3, o 6, caracterizada porque la VD2 de la primera cadena de polipéptidos y la VD2 de la segunda cadena de polipéptidos se obtienen de primero y segundo anticuerpo progenitor diferente, respectivamente, o porción de enlace de antígeno del mismo.

16. La proteína de enlace de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 13-15, caracterizada porque los primero y segundo anticuerpos progenitores enlazan diferentes epítopes en el antígeno.

17. La proteína de enlace de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, caracterizada porque el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza el primer antígeno con una potencia diferente de la potencia con la cual el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza el segundo antígeno.

18. La proteína de enlace de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, caracterizada porque el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza el primer antígeno con una afinidad diferente de la afinidad con la cual el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza el segundo antígeno.

19. La proteína de enlace de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, caracterizada porque el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, se seleccionan del grupo que consiste de un anticuerpo humano, un anticuerpo injertado a CDR, y un anticuerpo humanizado.

20. La proteína de enlace de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, caracterizada porque el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de 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 enlazados por un puente de disulfuro a la región bisagra; un

fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo; un fragmento dAb; una región determinante de complementariedad aislada (CDR); un anticuerpo de cadena única; y un diacuerpo.

21. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 1, 3, o 6, caracterizada porque la proteína de enlace posee al menos una propiedad deseada exhibida por el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, o el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo.

22. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque la propiedad deseada se selecciona de uno o más parámetros de anticuerpo.

23. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 21, caracterizada porque los parámetros de anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítope, estabilidad, solubilidad, eficiencia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y enlace de antígeno ortólogo.

24. Una proteína de enlace capaz de enlazar dos antígenos que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, caracterizada porque dos cadenas de polipéptidos comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada;

C es un dominio constante de cadena pesada;

X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1; y

X2 es una región Fc; y

en donde dos cadenas de polipéptidos comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera;

C es un dominio constante de cadena ligera;

X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es 0 o 1; en donde los dominios variables de cadena pesada VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOs: 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, y 46 y en donde los dominios variables de cadena ligera VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NOs:. 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, y 47.

25. Una proteína de enlace capaz de enlazar dos antígenos que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, caracterizada porque dos cadenas de polipéptidos comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada;

C es un dominio constante de cadena pesada;

X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1;

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 cadena ligera;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera;

C es un dominio constante de cadena ligera;

X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es 0 o 1; en donde la DVD-Ig enlaza al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste de IL-1alfa (sec. 1); IL-1alfa (sec. 2); IL-1alfa (sec. 3); IL-1alfa (sec. 4); IL-1beta (sec. 1); IL-1beta (sec. 2); IL-1beta (sec. 3); IL-1beta (sec. 4); e IL-1beta (sec. 5).

26. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 1, 3, 6, 24, o 25, caracterizada porque la proteína de enlace tiene una constante de velocidad de asociación (Kon) para uno o más objetivos seleccionados del grupo que consiste de: al menos aproximadamente $10^2M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5M^{-1}s^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6M^{-1}s^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón de superficie.

27. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 1, 3, 6, 24, o 25, caracterizada porque la proteína de enlace tiene una constante de velocidad de disociación (Koff) para uno o más objetivos seleccionados del grupo que consiste de: a lo sumo aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; a lo sumo aproximadamente $10^{-4}S^{-1}$; a lo sumo aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; y a lo sumo aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón de superficie.

28. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 1, 3, 6, 24, o 25, caracterizada porque la proteína de enlace tiene una constante de disociación (KD) para uno o más objetivos seleccionados del grupo que consiste de: a lo sumo aproximadamente 10^{-7} M; a lo sumo aproximadamente 10^{-8} M; a lo sumo aproximadamente 10^{-9} M; a lo sumo aproximadamente 10^{-10} M; a lo sumo aproximadamente 10^{-11} M; a lo sumo aproximadamente 10^{-12} M; y a lo sumo 10^{-13} M.

29. Un conjugado de proteína de enlace, caracterizado porque comprende una proteína de enlace de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 6, 24, o 25, el conjugado de proteína de enlace adicionalmente comprende un agente seleccionado del grupo que consiste de una molécula de inmunoadhesión, un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico, y un agente citotóxico.

30. El conjugado de proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque el agente es un agente de formación de imágenes seleccionado del grupo que consiste de una radioetiqueta, una enzima, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta bioluminiscente, una etiqueta magnética, y biotina.

31. El conjugado de proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque el agente de formación de imágenes es una radioetiqueta seleccionada del grupo que consiste de: ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, y ^{153}Sm.

32. El conjugado de proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque el agente es un agente terapéutico o

citotóxico seleccionado del grupo que consiste de un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente antiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, toxina, y un agente apoptótico.

33. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 1, 3, 6, 24, o 25, caracterizada porque la proteína de enlace es una proteína de enlaza cristalizada.

34. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 33, caracterizada porque el cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico libre de portador.

35. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 33, caracterizada porque la proteína de enlace tiene una vida media mayor in vivo que la contraparte soluble de la proteína de enlace.

36. La proteína de enlace de conformidad con la reivindicación 33, caracterizada porque la proteína de enlace retiene actividad biológica.

37. Un ácido nucleico aislado, caracterizado porque codifica una secuencia de aminoácidos de proteína de enlace de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 6, 24, o 25.

38. Un vector, caracterizado porque comprende un ácido nucleico aislado de conformidad con la reivindicación 37.

39. El vector de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el vector se selecciona del grupo que consiste de pcADN, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pcADN3.1 TOPO, pEF6 TOPO, y pBJ.

40. Una célula huésped, caracterizada porque comprende un vector

de conformidad con la reivindicación 38.

41. La célula huésped de conformidad con la reivindicación 40, caracterizada porque la célula huésped es una célula procariota.

42. La célula huésped de conformidad con la reivindicación 41, caracterizada porque la célula huésped es E.Coli.

43. La célula huésped de conformidad con la reivindicación 40, caracterizada porque la célula huésped es una célula eucariota.

44. La célula huésped de conformidad con la reivindicación 43, caracterizada porque la célula eucariota se selecciona del grupo que consiste de célula protista, célula animal, célula de planta y célula fúngica.

45. La célula huésped de conformidad con la reivindicación 43, caracterizada porque la célula eucariota es una célula animal seleccionada del grupo que consiste de una célula de mamífero, una célula de ave, y una célula de insecto.

46. La célula huésped de conformidad con la reivindicación 45, caracterizada porque la célula huésped es una célula CHO.

47. La célula huésped de conformidad con la reivindicación 45, caracterizada porque la célula huésped es COS.

48. La célula huésped de conformidad con la reivindicación 43, caracterizada porque la célula huésped es una célula de levadura.

49. La célula huésped de conformidad con la reivindicación 48, caracterizada porque la célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae.*

50. La célula huésped de conformidad con la reivindicación 45, caracterizada porque la célula huésped es una célula de insecto Sf9.

51. Un método para producir una proteína de enlace, caracterizado porque comprende cultivar una célula huésped descrita de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 40-50 en medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir la proteína de enlace.

52. El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque 50%-75% de la proteína de enlace producida es una proteína de enlace tetravalente específica dual.

53. El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque 75%-90% de la proteína de enlace producida es una proteína de enlace tetravalente específica dual.

54. El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque 90%-95% de la proteína de enlace producida es una proteína de enlace tetravalente específica dual.

55. Una proteína, caracterizada porque se produce de conformidad con el método de la reivindicación 51.

56. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende la proteína de enlace de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-36 y 55, y un portador farmacéuticamente aceptable.

57. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 56, caracterizada porque adicionalmente comprende al menos un agente terapéutico adicional.

58. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 57, caracterizada porque el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste de: agente terapéutico, agente de formación de imágenes, agente

citotóxico, inhibidores de angiogénesis, inhibidores de cinasa, bloqueadores de molécula de co-estimulación, bloqueadores de molécula de adhesión, anticuerpo anti-citocina o fragmento funcional del mismo, metotrexato, ciclosporina, rapamicina, FK506, etiqueta detectable o reportero, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroide (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticoesteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona del crecimiento, un fármaco de remplazo de hormonas, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, una beta agonista, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogos, una citocina, y un antagonista de citocina.

59. Un método para tratar un sujeto para una enfermedad o un trastorno, caracterizado porque administra al sujeto la proteína de enlace de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-36 y 55 de modo que se logra el tratamiento.

60. El método de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque el 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 ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus insulinodependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis escleroderma, enfermedad de injerto versus huésped, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con

trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, Enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, Purpúrea de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasíticas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversal aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, malignidades, insuficiencia cardiaca, infarto al miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular esporádica tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria (aguda) en adultos, alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriática, artropatía colítica ulcerativa, sinovitis enteropática, clamidia, yersinia y artropatía asociada con salmonella, espondiloartropatía, arterioesclerosis/enfermedad ateromatosa, alergia atópica, enfermedad bulosa autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica positiva de Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, enfermedad de Royal Free/encefalitis miálgica, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, Síndrome de Enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida, Enfermedades Relacionadas con Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, insuficiencia de ovarios,

insuficiencia de ovarios prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad de tejido conjuntivo asociada con enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad de tejido conjuntivo mezclada asociada con enfermedad pulmonar, esclerosis sistémica asociada con enfermedad pulmonar intersticial, artritis reumatoide asociada con enfermedad pulmonar intersticial, lupus eritematoso sistémico asociado con enfermedad pulmonar, dermatomiositis/polimiositis asociada con enfermedad pulmonar, Enfermedad de Sjörgren asociada con enfermedad pulmonar, espondilitis anquilosante asociada con enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, hemosiderosis asociada con enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármaco, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrante linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial post-infecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo 1 (hepatitis lupoide o autoinmune clásica), hepatitis autoinmune tipo 2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM), hipoglicemia mediada autoinmune, resistencia a insulina tipo B con acanthosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con trasplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada con trasplante de órganos, osteoartrosis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2, luecopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de lyme, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad de espermas, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpatética, hipertensión pulmonar

secundaria a enfermedad de tejido conjuntivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, Enfermedad de Still, esclerosis sistémica, Síndrome de Sjörgren, Arteritis/enfermedad de Takayasu, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad de tiroides autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitíligo, enfermedad hepática aguda, enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis alcohólicas, lesión hepática inducida por alcohol, coleosatatis, enfermedad hepática idiosincrática, hepatitis inducida por fármaco, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por estreptococos de grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas tipo Th2 y tipo Th1, dolor agudo y crónico (formas diferentes de dolor), y cánceres tales como cáncer de pulmón, mama, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovarios, próstata y rectal y malignidades hematopoyéticas (leucemia y linfoma), Abetalipoproteinemia, Acrocianosis, procesos infecciosos o parasíticos agudos y 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 por SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica por contacto, rinitis alérgica, rechazo de aloinjerto, deficiencia de antitripsina alfa-1, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de células del cuerno anterior, terapia anti-cd3, síndrome antifosfolípidos, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticas

y periféricas, disección aórtica, hipertensión arterial, arterioesclerosis, fistula arteriovenosa, ataxia, fibrilación atrial (sostenida o paroxismal), aleteo atrial, bloque atrioventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto de huesos, rechazo de trasplante de médula ósea (BMT), bloque de ramificación de haces, linfoma de Burkitt, quemaduras, arritmias cardiacas, síndrome de aturdimiento cardiaco, tumores cardiacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación de desvío cardiopulmonar, rechazo de trasplante de cartílago, degeneraciones córticas cerebelares, trastornos cerebelares, taquicardia atrial caótica o multifocal, trastornos asociados con 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 arteria coronaria, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis en cultivo negativo, fibrosis quística, trastornos asociados con terapia de citocina, Demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, fiebre por dengue hemorrágico, dermatitis, afecciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad diabética aterioesclerótica, enfermedad de cuerpo de Lewy difuso, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos de los ganglios basales, síndrome de Down en edad media, trastornos del movimiento inducidos por fármacos inducidos por fármacos los cuales bloquean los receptores de dopamina del SNC, sensibilidad a fármacos, eczema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por virus de epstein-barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y cerebelares, linfohistiocitosis hematofagocítica familiar, rechazo de implante del timo fetal,

Ataxia de Friedreich, trastornos arteriales periféricos funcionales, sepsis fúngica, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, sepsis gram negativa, sepsis gram positiva, granulomas debido a organismos intracelulares, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hallerrorden-Spatz, tiroiditis de hashimoto, fiebre del heno, rechazo de trasplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, púrpura trombocitopénica trombolítica/síndrome urémico hemolítico, hemorragia, hepatitis (A), arritmias de haz His, infección por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimiento hipercinático, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos del movimiento hipocinético, evaluación del eje hipotalámico-pituitaria-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpo, Astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza a, exposición a radiación ionizante, neuritis iridociclitis/uveítis/óptica, lesión por isquemia-reperfusión, apoplejía isquémica, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo de trasplante de riñón, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo de trasplante de hígado, linfedema, malaria, Linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococemia, enfermedades metabólicas/idiopáticas, cefalea por migraña, mitocondrial, trastorno de sistemas múltiples, enfermedad de tejido conjuntivo mezclada, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, mycobacterium avium intracellulare, mycobacterium tuberculosis, síndrome mielodisplásico, infarto al

miocardio, trastornos isquémicos miocárdicos, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofias musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma no de hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos arteriales oclusivos, terapia de okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos inversos de vasectomía/orquitis, organomegalia, osteoporosis, rechazo de trasplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad, rechazo de trasplante de paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad pericardiaca, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía por pneumocystis carinii, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal, y síndrome de cambios de la piel), síndrome de post-perfusión, síndrome de post-bomba, síndrome de cardiotomía post-MI, preeclampsia, parálisis de supranúcleo progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación, Enfermedad y fenómeno de Raynaud, enfermedad de Raynoud, enfermedad de Refsum, taquicardia de QRS estrecha regula, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, Demencia senil de tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, apoplejía, anemia por células falciformes, rechazo de aloinjerto de piel, síndrome de cambios de la piel, rechazo de trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelares, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, Síncope, sífilis del sistema

cardiovascular, anafilaxis sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumatoide juvenil sistémica, células T o FAB ALL, Telangiectasia, tromboangitis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, trauma/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades cardiacas valvulares, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, meningitis aséptica/encefalitis vital, síndrome hemafagocítico vital asociado, síndrome de Wemicke-Korsakoff, Enfermedad de Wilson, rechazo de aloinjerto de cualquier órgano o tejido, síndromes coronarios agudos, polineuritis idiopática aguda, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still en adultos, alopecia areata, anafilaxis, síndrome de anticuerpo anti-fosfolípido, anemia aplásica, arterioesclerosis, eczema atópica, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con infección estreptocócica, enteropatía autoinmune, pérdida de audición autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, insuficiencia de ovarios prematura autoinmune,, blefaritis, bronquiectasis, penfigoide buloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolípido catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, penfigoide cicatricial, síndrome clínicamente aislado (CIS) con riesgo de esclerosis múltiple, conjuntivitis, trastorno siquiátrico de comienzo infantil, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, diabetes mellitus, hernia de disco, prolapso de disco, anemia hemolítica inmune inducida por fármaco, endocarditis, endometriosis, endoftalmitis, episcleritis, eritema multiforme, eritema

multiforme mayor, penfigoide gestacional, síndrome de Guillain-Barré (GBS), fiebre del heno, síndrome de Hughes, enfermedad de Parkinson idiopática, neumonía intersticial idiopática, Alergia mediada por IgE, anemia hemolítica inmune, miositis de cuerpo de inclusión, enfermedad inflamatoria ocular infecciosa, enfermedad desmielinizante inflamatoria, enfermedad cardiaca inflamatoria, enfermedad renal inflamatoria, IPF/UIP, iritis, queratitis, queratojuntivitis sicca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, Histiocitosis de células de Langerhan, livedo reticularis, degeneración macular, poliangeítis microscópica, morbus bechterev, trastornos de neuronas motoras, penfigoide de membrana mucosa, insuficiencia de múltiples órganos, miastenia grave, síndrome mielodisplásica, miocarditis, trastorno de raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis no A no B, neuritis óptica, osteolisis, cáncer de ovarios, JRA pauciarticular, enfermedad oclusiva de arteria periférica (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad de arteria periférica (PAD), flebitis, poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), policondritis, polimialgia reumática, poliosis, JRA poliarticular, síndrome de deficiencia poliendocrina, polimiositis, polimialgia reumática (PMR), síndrome post-bomba, Parkinsonismo primario, cáncer de próstata y rectal y malignidades hematopoyéticas (leucemia y linfoma), prostatitis, aplasia de glóbulos rojos puros, insuficiencia adrenal primaria, neuromielitis óptica recurrente, restenosis, enfermedad cardiaca reumática, safo (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostotis, y osteítis), escleroderma, amiloidosis secundaria, choque pulmonar, escleritis, ciática, insuficiencia adrenal secundaria, enfermedad de tejido conjuntivo asociada con silicona, dermatosis de sneddon-wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), síndrome de respuesta inflamatoria

sistémica, arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrolisis epidérmica tóxica, mielitis transversal, TRAPS (receptor de factor de necrosis de tumor, reacción alérgica tipo I, diabetes tipo II, urticaria, neumonía intersticial usual (UIP), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, Síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome de VKH), degeneración macular húmeda, curación de heridas, yersinia y artropatía asociada con salmonella.

61. El método de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque la administración al sujeto es por al menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelíaco, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocardico, intraosteal, intrapélvico, intrapericardiaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, y transdérmico.

62. Un método para producir una Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual capaz de enlazar dos antígenos, caracterizado porque comprende las etapas de

a) obtener un primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, capaz de enlazar un primer antígeno;

b) obtener un segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, capaz de enlazar un segundo antígeno;

c) construir primera y tercera cadenas de polipéptidos, que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde,

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido del primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido del segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena pesada;

X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1;

X2 es una región Fc; y

n es 0 o 1; y

d) construir segunda y cuarta cadenas de polipéptidos que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido del primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido del segundo anticuerpo progenitor o enlace de antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena ligera;

X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es 0 o 1; y

e) expresar las primera, segunda, tercera y cuarta cadenas de polipéptidos; de modo que se genera una Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual capaz de enlazar el primer y segundo antígeno, en donde la proteína de enlace es capaz de enlazar un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de IL-1alfa (sec. 3) e IL-1-beta (sec. 1); IL-1 alfa (sec. 2) e IL-1beta (sec. 1); IL-1alfa (sec. 1) e IL-1beta (sec. 1); IL-1alfa (sec. 3) e IL-1beta (sec. 2); IL-1alfa

(sec. 4) e IL-1beta (sec. 2); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 3); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 4); IL-1-alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 5).

63. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque los dominios variables de cadena pesada de VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SE ID NOs: 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, y 46 y en donde los dominios variables de cadena ligera de VD1 y VD2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID Nos: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 y 47.

64. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, se seleccionan del grupo que consiste de un anticuerpo humano, un anticuerpo injertado a CDR, y un anticuerpo humanizado.

65. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, y el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de 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 enlazados por un puente de disulfuro en la región de bisagra; un fragmento Fd que consiste de los dominios de VH y CH1; un fragmento Fv que consiste de los dominios de VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, un fragmento dAb, una región determinante de complementariedad aislada (CDR), un anticuerpo de cadena única, y diacuerpos.

66. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo

posee al menos una propiedad deseada exhibida por la Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual.

67. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo posee al menos una propiedad deseada exhibida por la Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual.

68. El método de conformidad con 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 conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque la región Fc se selecciona del grupo que consiste de una región Fc a partir de un IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, e IgD.

70. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque la propiedad deseada se selecciona de uno o más parámetros de anticuerpo.

71. El método de conformidad con la reivindicación 67, caracterizado porque la propiedad deseada se selecciona de uno o más parámetros de anticuerpo.

72. El método de conformidad con la reivindicación 70, caracterizado porque los parámetros de anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítope, estabilidad, solubilidad, eficiencia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y enlace de antígeno ortólogo.

73. El método de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque los parámetros de anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento de epítope, estabilidad, solubilidad, eficiencia de producción, inmunogenicidad, farmacocinética, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido, y enlace de antígeno ortólogo.

74. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza el primer antígeno con una afinidad diferente que la afinidad con la cual el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza el segundo antígeno.

75. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque el primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza el primer antígeno con una potencia diferente que la potencia con la que el segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, enlaza el segundo antígeno.

76. Un método para generar una Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual capaz de enlazar dos antígenos con propiedades deseadas, caracterizado porque comprende las etapas de

a) obtener un primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, capaz de enlazar un primer antígeno y que posee al menos una propiedad deseada exhibida por la Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual;

b) obtener un segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo, capaz de enlazar un segundo antígeno y que posee al menos

una propiedad deseada exhibida por la Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual;

c) construir primera y tercera cadenas de polipéptidos que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde,

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido del primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido del segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena pesada;

X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1;

X2 es una región Fc; y

n es 0 o 1;

d) construir segunda y cuarta cadenas de polipéptidos que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido del primer anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido del segundo anticuerpo progenitor o porción de enlace de antígeno del mismo;

C es un dominio constante de cadena ligera;

X1 es un enlazante con la condición que no sea CH1;

X2 no comprende una región Fc; y

n es 0 o 1;

e) expresar las primera, segunda, tercera y cuarta cadenas de polipéptidos; de modo que se genera una Inmunoglobulina de Dominio Variable Dual capaz de enlazar el primer y segundo antígeno, en donde la proteína de

enlace es capaz de enlazar un par de antígenos seleccionados del grupo que consiste de IL-1alfa (sec. 3) e IL-1-beta (sec. 1); IL-1 alfa (sec. 2) e IL-1beta (sec. 1); IL-1alfa (sec. 1) e IL-1beta (sec. 1); IL-1alfa (sec. 3) e IL-1beta (sec. 2); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 2); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 3); IL-1alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 4); IL-1-alfa (sec. 4) e IL-1beta (sec. 5).

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

(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 28-06-13 (30) Prioridad (31) ***No. Prioridad*** 61/425,671 (32) ***Fecha*** 21-12-10 (33) ***País*** US	(51) Int Cl: C07K 16/24 (71) Solicitante(s): **ABBVIE, INC.** (72) Inventor(es): WU, Chengbin. (74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 21-07-13 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: *20-12-11* No. de solicitud: ***PCT/US2011/066130***	(87) Publicación internacional Fecha: ***13-09-12*** No. publicación: ***WO 2012/121775 A9***
(54) Titulo: **"INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL BIESPECÍFICAS DE IL-1 ALFA Y BETA Y SU USO"**	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La presente invención se refiere a proteínas de enlace multivalentes y multiespecíficas diseñadas, métodos de producción, y específicamente a sus usos en la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades.

Sector: Farmacéutico. Proteínas de enlace multivalentes y multiespecificas usados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, cáncer y otras.

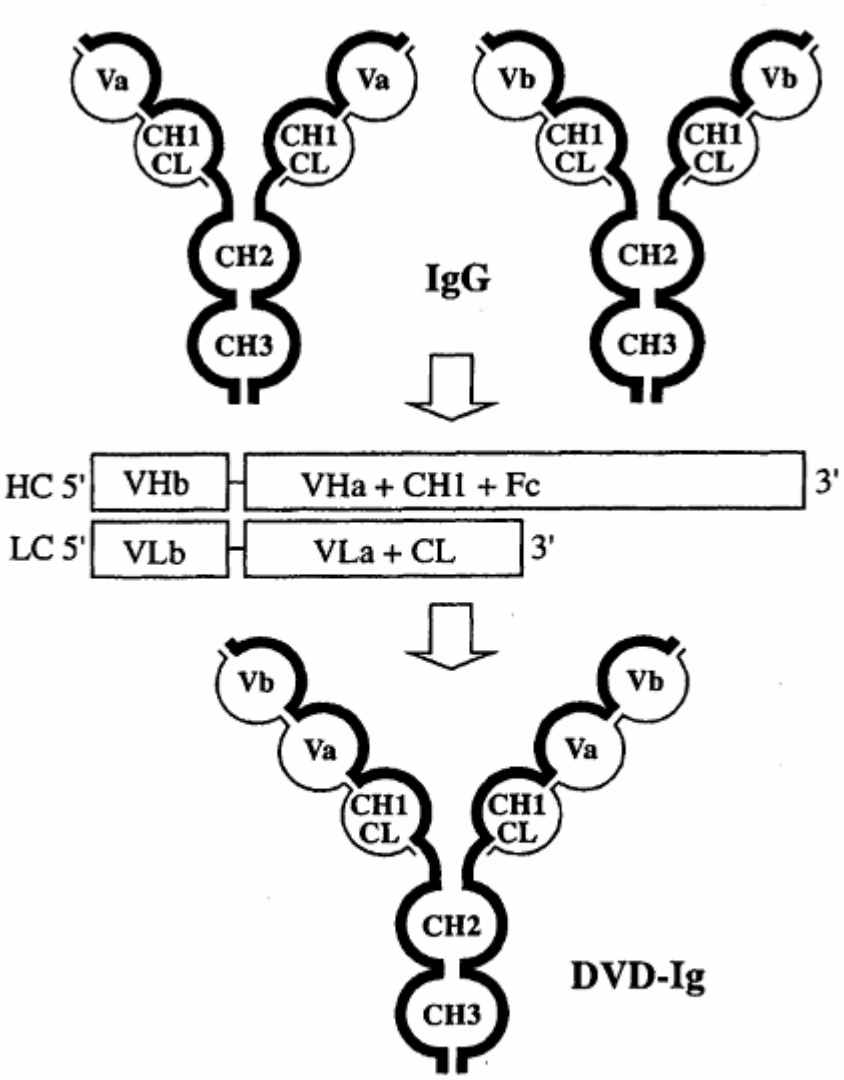
Va
Va
CH1
CL
CH1
CL
CH2
CH3
IgG
Vb
Vb
CH1
CL
CH1
CL
CH2
CH3
HC 5'
VHb
VHa + CH1 + Fc
3'
LC 5'
VLb
VLa + CL
3'
Vb
Vb
Va
Va
CH1
CL
CH1
CL
CH2
CH3
DVD-Ig

Fig. 1A

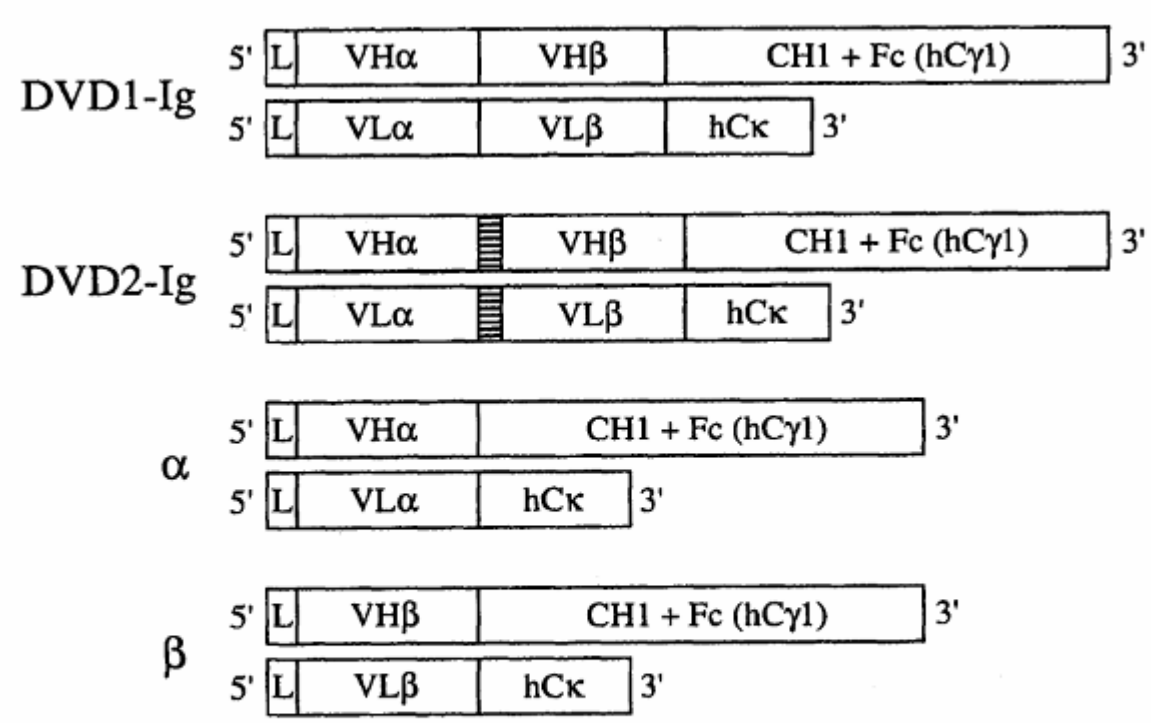
DVD1-Ig
5' L VHα VHβ CH1 + Fc (hCγ1) 3'
5' L VLα VLβ hCκ 3'
DVD2-Ig
5' L VHα VHβ CH1 + Fc (hCγ1) 3'
5' L VLα VLβ hCκ 3'
α
5' L VHα CH1 + Fc (hCγ1) 3'
5' L VLα hCκ 3'
β
5' L VHβ CH1 + Fc (hCγ1) 3'
5' L VLβ hCκ 3'

Fig. 1B

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

VELEMA, James, H.
Lathrop & Gage LLP
28 State Street, Suite 0700
Boston, MA 02109
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
30 January 2013 (30.01.2013)

Applicant's or agent's file reference
527877 BBI-718PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2011/066130

International filing date *(day/month/year)*
20 December 2011 (20.12.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
ABBOTT LABORATORIES
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
ABBVIE INC.
1 North Waukegan Road
North Chicago, IL 60064
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 75

Authorized officer
Gagliardi Ghislaine
e-mail pt05.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 05

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ABBOTT LABORATORIES

<120> INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL Y USOS DE LAS MISMAS

<130> 10718WO01

<140> PCT/US2011/066130
<141> 2011-12-20

<150> 61/425,671
<151> 2010-12-21

<160> 78

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 1
Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg
1 5 10 15

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 2
Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg
1 5 10 15

Val

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 3
Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 4
Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
1 5 10

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
Sintético"

<400> 5
Ser Ala Lys Thr Thr Pro
1 5

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 6
Arg Ala Asp Ala Ala Pro
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 7
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
1 5

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 8
Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 9
Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 10
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 10
Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala
1 5 10 15

Arg Val

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 11
Ala Asp Ala Ala Pro
1 5

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 12
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 13
Thr Val Ala Ala Pro
1 5

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 14
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 15
Gln Pro Lys Ala Ala Pro
1 5

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 16
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 17
Ala Lys Thr Thr Pro Pro
1 5

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 18
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 19
Ala Lys Thr Thr Ala Pro
1 5

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 20
Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 21
Ala Ser Thr Lys Gly Pro
1 5

<210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 22
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 23
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 24
Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 25
Gly Pro Ala Lys Glu Leu Thr Pro Leu Lys Glu Ala Lys Val Ser
1 5 10 15

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 26
Gly His Glu Ala Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser
1 5 10 15

<210> 27
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 27
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Thr Val Ala Ala
1 5 10 15

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
20

<210> 28
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido

sintético"

<400> 28
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 29
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 30
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 31
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
100 105

<210> 32
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 33
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
100 105

<210> 34
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 34
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 35
Asp Thr Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 36
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido

sintético"

<400> 36
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 37
Asp Thr Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 38
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 38
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60

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

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

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 39
Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 40
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 40

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asn Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 41
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Met
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 42
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 42
Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Asp Leu Glu Arg Met
35 40 45

Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 43
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Cys
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 44
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 44
Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Asp Leu Glu Arg Met
35 40 45

Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 45
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Cys
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 46
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 46
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Gln Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Asp Phe Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47
<211> 108

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 47
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Met
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Lys Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 48
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 49
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 50
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 51
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 52
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 52
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln
115 120 125

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Val Ser Val Lys
130 135 140

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Gly Met His
145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile
165 170 175

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Gln Gly Arg
180 185 190

Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
195 200 205

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
210 215 220

Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 53
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 53
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
130 135 140

Met Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro
195 200 205

Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
210 215 220

<210> 54
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"
"

<400> 54
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

35 40 45

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Ile Gln
115 120 125

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
130 135 140

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Asp Leu Glu Arg Met Ala Trp Ile
165 170 175

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg
180 185 190

Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
195 200 205

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
210 215 220

Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 55

<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 55
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
130 135 140

Cys Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro
195 200 205

Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
210 215 220

<210> 56
<211> 254
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 56
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
130 135 140

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
145 150 155 160

Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Asp
165 170 175

Leu Glu Arg Met Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr
180 185 190

Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr
195 200 205

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala
225 230 235 240

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 57
<211> 228
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 57
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
115 120 125

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
130 135 140

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Cys Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
145 150 155 160

Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
165 170 175

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
180 185 190

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys
195 200 205

Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
210 215 220

Glu Ile Lys Arg
225

<210> 58
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 58
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Ile Gln
115 120 125

Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
130 135 140

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Asp Leu Glu Arg Met Ala Trp Ile
165 170 175

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg
180 185 190

Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
195 200 205

Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
210 215 220

Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

225 230 235 240

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 59
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 59
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
130 135 140

Cys Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro
195 200 205

Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
210 215 220

<210> 60
<211> 254
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 60
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Val Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys
130 135 140

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
145 150 155 160

Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Asp
165 170 175

Leu Glu Arg Met Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr
180 185 190

Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val
195 200 205

Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala
225 230 235 240

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 61
<211> 228
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 61
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
115 120 125

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
130 135 140

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Cys Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
145 150 155 160

Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
165 170 175

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
180 185 190

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys
195 200 205

Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
210 215 220

Glu Ile Lys Arg
225

<210> 62
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln
115 120 125

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Val Ser Val Lys
130 135 140

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Gly Met His
145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile
165 170 175

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Gln Gly Arg
180 185 190

Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu

195 200 205

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
210 215 220

Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 63
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 63
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
130 135 140

Met Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro
195 200 205

Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
210 215 220

<210> 64
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 64
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Val Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln
115 120 125

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
130 135 140

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr Gly Met Asn
145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Arg Met Gly Trp Ile
165 170 175

Asn Thr Tyr Thr Gly Gln Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg
180 185 190

Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
195 200 205

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
210 215 220

Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Asp Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 65
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 65

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
130 135 140

Met Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Lys Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Ala Pro
195 200 205

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
210 215 220

<210> 66
<211> 250
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 66
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
130 135 140

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr
145 150 155 160

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Arg Met
165 170 175

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Gln Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

180 185 190

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
195 200 205

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Arg Asp Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Asp Phe Ala Met Asp Tyr Trp
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 67
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 67
Asp Thr Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

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

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
130 135 140

Met Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Lys Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Ala Pro
195 200 205

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
210 215 220

<210> 68
<211> 250
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 68
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
130 135 140

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr
145 150 155 160

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Arg Met
165 170 175

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Gln Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
180 185 190

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
195 200 205

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Arg Asp Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Asp Phe Ala Met Asp Tyr Trp
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 69
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 69
Asp Thr Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

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

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
130 135 140

Met Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Lys Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Ala Pro
195 200 205

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
210 215 220

<210> 70
<211> 250
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 70
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60

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

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

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
130 135 140

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr
145 150 155 160

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Arg Met

165 170 175

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Gln Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
180 185 190

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
195 200 205

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Arg Asp Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Asp Phe Ala Met Asp Tyr Trp
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 71
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 71
Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

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

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
130 135 140

Met Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Lys Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Ala Pro
195 200 205

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
210 215 220

<210> 72
<211> 7185
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 72
gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgcgaggag 720

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgagcggccg ctcgaggccg gcaaggccgg 1020

atcccccgac ctcgacctct ggctaataaa ggaaatttat tttcattgca atagtgtgtt 1080

ggaatttttt gtgtctctca ctcggaagga catatgggag ggcaaatcat ttggtcgaga 1140

tccctcggag atctctagct agaggatcga tccccgcccc ggacgaacta aacctgacta 1200

cgacatctct gccccttctt cgcggggcag tgcatgtaat cccttcagtt ggttggtaca 1260

acttgccaac tgggccctgt tccacatgtg acacgggggg ggaccaaaca caaaggggtt 1320

ctctgactgt agttgacatc cttataaatg gatgtgcaca tttgccaaca ctgagtggct 1380

ttcatcctgg agcagacttt gcagtctgtg gactgcaaca caacattgcc tttatgtgta 1440

actcttggct gaagctctta caccaatgct gggggacatg tacctcccag gggcccagga 1500

agactacggg aggctacacc aacgtcaatc agaggggcct gtgtagctac cgataagcgg 1560

accctcaaga gggcattagc aatagtgttt ataaggcccc cttgttaacc ctaaacgggt 1620

agcatatgct tcccgggtag tagtatatac tatccagact aaccctaatt caatagcata 1680

tgttacccaa cgggaagcat atgctatcga attagggtta gtaaaagggt cctaaggaac 1740

agcgatatct cccaccccat gagctgtcac ggttttattt acatggggtc aggattccac 1800

gagggtagtg aaccatttta gtcacaaggg cagtggctga agatcaagga gcgggcagtg 1860

aactctcctg aatcttcgcc tgcttcttca ttctccttcg tttagctaat agaataactg 1920

ctgagttgtg aacagtaagg tgtatgtgag gtgctcgaaa acaaggtttc aggtgacgcc 1980

cccagaataa aatttggacg gggggttcag tggtggcatt gtgctatgac accaatataa 2040

ccctcacaaa ccccttgggc aataaatact agtgtaggaa tgaaacattc tgaatatctt 2100

taacaataga aatccatggg gtggggacaa gccgtaaaga ctggatgtcc atctcacacg 2160

aatttatggc tatgggcaac acataatcct agtgcaatat gatactgggg ttattaagat 2220

gtgtcccagg cagggaccaa gacaggtgaa ccatgttgtt acactctatt tgtaacaagg 2280

ggaaagagag tggacgccga cagcagcgga ctccactggt tgtctctaac acccccgaaa 2340

attaaacggg gctccacgcc aatggggccc ataaacaaag acaagtggcc actctttttt 2400

ttgaaattgt ggagtggggg cacgcgtcag cccccacacg ccgccctgcg gttttggact 2460

gtaaaataag ggtgtaataa cttggctgat tgtaaccccg ctaaccactg cggtcaaacc 2520

acttgcccac aaaaccacta atggcacccc ggggaatacc tgcataagta ggtgggcggg 2580

ccaagatagg ggcgcgattg ctgcgatctg gaggacaaat tacacacact tgcgcctgag 2640

cgccaagcac agggttgttg gtcctcatat tcacgaggtc gctgagagca cggtgggcta 2700

atgttgccat gggtagcata tactacccaa atatctggat agcatatgct atcctaatct 2760

atatctgggt agcataggct atcctaatct atatctgggt agcatatgct atcctaatct 2820

atatctgggt agtatatgct atcctaattt atatctgggt agcataggct atcctaatct 2880

atatctgggt agcatatgct atcctaatct atatctgggt agtatatgct atcctaatct 2940

gtatccgggt agcatatgct atcctaatag agattagggt agtatatgct atcctaattt 3000

atatctgggt agcatatact acccaaatat ctggatagca tatgctatcc taatctatat 3060

ctgggtagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagca taggctatcc taatctatat 3120

ctgggtagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagta tatgctatcc taatttatat 3180

ctgggtagca taggctatcc taatctatat ctgggtagca tatgctatcc taatctatat 3240

ctgggtagta tatgctatcc taatctgtat ccgggtagca tatgctatcc tcatgataag 3300

ctgtcaaaca tgagaatttt cttgaagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata 3360

ggttaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt 3420

gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag 3480

acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca 3540

tttccgtgtc gcccttattc cctttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcaccc 3600

agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat 3660

cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc 3720

aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtg ttgacgccgg 3780

gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc 3840

agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat 3900

aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga 3960

gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc 4020

ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg cagcaatggc 4080

aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt 4140

aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc 4200

tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggtctcgcg gtatcattgc 4260

agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca 4320

ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca 4380

ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt 4440

ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta 4500

acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg 4560

agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc 4620

ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag 4680

cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa 4740

gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag tggctgctgc 4800

cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc 4860

gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta 4920

caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag 4980

aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct 5040

tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga 5100

gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc 5160

ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttcctgcgtt 5220

atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg 5280

cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg 5340

caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc 5400

cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcattaggc 5460

accccaggct ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata 5520

acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagctctagc tagaggtcga 5580

gtccctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccatag 5640

tcccgcccct aactccgccc atcccgcccc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc 5700

cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc 5760

tattccagaa gtagtgagga ggctttttg gaggcctagg cttttgcaaa aagctttgca 5820

aagatggata aagttttaaa cagagaggaa tctttgcagc taatggacct tctaggtctt 5880

gaaaggagtg ggaattggct ccggtgcccg tcagtgggca gagcgcacat cgcccacagt 5940

ccccgagaag ttgggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgcgg 6000

ggtaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccgagg gtgggggaga 6060

accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaacgggt ttgccgccag 6120

aacacaggta agtgccgtgt gtggttcccg cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc 6180

ttgcgtgcct tgaattactt ccacctggct gcagtacgtg attcttgatc ccgagcttcg 6240

ggttggaagt gggtgggaga gttcgaggcc ttgcgcttaa ggagcccctt cgcctcgtgc 6300

ttgagttgag gcctggcctg ggcgctgggg ccgccgcgtg cgaatctggt ggcaccttcg 6360

cgcctgtctc gctgctttcg ataagtctct agccatttaa aatttttgat gacctgctgc 6420

gacgcttttt ttctggcaag atagtcttgt aaatgcgggc caagatctgc acactggtat 6480

ttcggttttt ggggccgcgg gcggcgacgg ggcccgtgcg tcccagcgca catgttcggc 6540

gaggcggggc ctgcgagcgc ggccaccgag aatcggacgg gggtagtctc aagctggccg 6600

gcctgctctg gtgcctggcc tcgcgccgcc gtgtatcgcc ccgccctggg cggcaaggct 6660

ggcccggtcg gcaccagttg cgtgagcgga aagatggccg cttcccggcc ctgctgcagg 6720

gagctcaaaa tggaggacgc ggcgctcggg agagcgggcg ggtgagtcac ccacacaaag 6780

gaaaagggcc tttccgtcct cagccgtcgc ttcatgtgac tccacggagt accgggcgcc 6840

gtccaggcac ctcgattagt tctcgagctt ttggagtacg tcgtctttag gttgggggga 6900

ggggttttat gcgatggagt ttccccacac tgagtgggtg gagactgaag ttaggccagc 6960

ttggcacttg atgtaattct ccttggaatt tgccctttt gagtttggat cttggttcat 7020

tctcaagcct cagacagtgg ttcaaagttt ttttcttcca tttcaggtgt cgtgaggaat 7080

tctctagaga tccctcgacc tcgagatcca ttgtgcccgg gcgccaccat ggagtttggg 7140

ctgagctggc tttttcttgt cgcgatttta aaaggtgtcc agtgc 7185

<210> 73
<211> 6521
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 73
acggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60

actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120

aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180

aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240

cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300

ttcaacaggg gagagtgttg agcggccgct cgaggccggc aaggccggat cccccgacct 360

cgacctctgg ctaataaagg aaatttattt tcattgcaat agtgtgttgg aatttttgt 420

gtctctcact cggaaggaca tatgggaggg caaatcattt ggtcgagatc cctcggagat 480

ctctagctag aggatcgatc cccgccccgg acgaactaaa cctgactacg acatctctgc 540

cccttcttcg cggggcagtg catgtaatcc cttcagttgg ttggtacaac ttgccaactg 600

ggccctgttc cacatgtgac acgggggggg accaaacaca aaggggttct ctgactgtag 660

ttgacatcct tataaatgga tgtgcacatt tgccaacact gagtggcttt catcctggag 720

cagactttgc agtctgtgga ctgcaacaca acattgcctt tatgtgtaac tcttggctga 780

agctcttaca ccaatgctgg gggacatgta cctcccaggg gcccaggaag actacgggag 840

gctacaccaa cgtcaatcag aggggcctgt gtagctaccg ataagcggac cctcaagagg 900

gcattagcaa tagtgtttat aaggcccccc tgttaaccct aaacgggtag catatgcttc 960

ccgggtagta gtatatacta tccagactaa ccctaattca atagcatatg ttacccaacg 1020

ggaagcatat gctatcgaat tagggttagt aaaagggtcc taaggaacag cgatatctcc 1080

caccccatga gctgtcacgg ttttatttac atggggtcag gattccacga gggtagtgaa 1140

ccattttagt cacaagggca gtggctgaag atcaaggagc gggcagtgaa ctctcctgaa 1200

tcttcgcctg cttcttcatt ctccttcgtt tagctaatag aataactgct gagttgtgaa 1260

cagtaaggtg tatgtgaggt gctcgaaaac aaggtttcag gtgacgcccc cagaataaaa 1320

tttggacggg gggttcagtg gtggcattgt gctatgacac caatataacc ctcacaaacc 1380

ccttgggcaa taaatactag tgtaggaatg aaacattctg aatatcttta acaatagaaa 1440

tccatggggt ggggacaagc cgtaaagact ggatgtccat ctcacacgaa tttatggcta 1500

tgggcaacac ataatcctag tgcaatatga tactggggtt attaagatgt gtcccaggca 1560

gggaccaaga caggtgaacc atgttgttac actctatttg taacaagggg aaagagagtg 1620

gacgccgaca gcagcggact ccactggttg tctctaacac ccccgaaaat taaacggggc 1680

tccacgccaa tggggcccat aaacaaagac aagtggccac tctttttttt gaaattgtgg 1740

agtgggggca cgcgtcagcc cccacacgcc gccctgcggt tttggactgt aaaataaggg 1800

tgtaataact tggctgattg taaccccgct aaccactgcg gtcaaaccac ttgcccacaa 1860

aaccactaat ggcaccccgg ggaatacctg cataagtagg tgggcgggcc aagatagggg 1920

cgcgattgct gcgatctgga ggacaaatta cacacacttg cgcctgagcg ccaagcacag 1980

ggttgttggt cctcatattc acgaggtcgc tgagagcacg gtgggctaat gttgccatgg 2040

gtagcatata ctacccaaat atctggatag catatgctat cctaatctat atctgggtag 2100

cataggctat cctaatctat atctgggtag catatgctat cctaatctat atctgggtag 2160

tatatgctat cctaatttat atctgggtag cataggctat cctaatctat atctgggtag 2220

catatgctat cctaatctat atctgggtag tatatgctat cctaatctgt atccgggtag 2280

catatgctat cctaatagag attagggtag tatatgctat cctaatttat atctgggtag 2340

catatactac ccaaatatct ggatagcata tgctatccta atctatatct gggtagcata 2400

tgctatccta atctatatct gggtagcata ggctatccta atctatatct gggtagcata 2460

tgctatccta atctatatct gggtagtata tgctatccta atttatatct gggtagcata 2520

ggctatccta atctatatct gggtagcata tgctatccta atctatatct gggtagtata 2580

tgctatccta atctgtatcc gggtagcata tgctatcctc atgataagct gtcaaacatg 2640

agaattttct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat 2700

gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc 2760

tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg 2820

ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc 2880

ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcacccag aaacgctggt 2940

gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct 3000

caacagcggt aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac 3060

ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtgtt gacgccgggc aagagcaact 3120

cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa 3180

gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga 3240

taacactgcg gccaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt 3300

tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga 3360

agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgca gcaatggcaa caacgttgcg 3420

caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat 3480

ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat 3540

tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc 3600

agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga 3660

tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc 3720

agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag 3780

gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc 3840

gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atccttttt 3900

tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt 3960

gccggatcaa gagctaccaa ctcttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat 4020

accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc 4080

accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa 4140

gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg 4200

ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag 4260

atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag 4320

gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa 4380

cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt 4440

gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg 4500

gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc 4560

tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac 4620

cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct 4680

ccccgcgcgt tggccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc 4740

gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac cccaggcttt 4800

acactttatg cttccggctc gtatgttgtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac 4860

aggaaacagc tatgaccatg attacgccaa gctctagcta gaggtcgagt ccctccccag 4920

caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa 4980

ctccgcccat cccgccccta actccgccca gttccgccca ttctccgccc catggctgac 5040

taatttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt 5100

agtgaggagg ctttttgga ggcctaggct tttgcaaaaa gctttgcaaa gatggataaa 5160

gttttaaaca gagaggaatc tttgcagcta atggaccttc taggtcttga aaggagtggg 5220

aattggctcc ggtgcccgtc agtgggcaga gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt 5280

ggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgc ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga 5340

aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt tcccgagggt gggggagaac cgtatataag 5400

tgcagtagtc gccgtgaacg ttctttttcg caacgggttt gccgccagaa cacaggtaag 5460

tgccgtgtgt ggttcccgcg ggcctggcct ctttacgggt tatggccctt gcgtgccttg 5520

aattacttcc acctggctgc agtacgtgat tcttgatccc gagcttcggg ttggaagtgg 5580

gtgggagagt tcgaggcctt gcgcttaagg agccccttcg cctcgtgctt gagttgaggc 5640

ctggcctggg cgctggggcc gccgcgtgcg aatctggtgg caccttcgcg cctgtctcgc 5700

tgctttcgat aagtctctag ccatttaaaa tttttgatga cctgctgcga cgcttttttt 5760

ctggcaagat agtcttgtaa atgcgggcca agatctgcac actggtattt cggtttttgg 5820

ggccgcgggc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgcaca tgttcggcga ggcggggcct 5880

gcgagcgcgg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa gctggccggc ctgctctggt 5940

gcctggcctc gcgccgccgt gtatcgcccc gccctgggcg gcaaggctgg cccggtcggc 6000

accagttgcg tgagcggaaa gatggccgct tcccggccct gctgcaggga gctcaaaatg 6060

gaggacgcgg cgctcgggag agcgggcggg tgagtcaccc acacaaagga aaagggcctt 6120

tccgtcctca gccgtcgctt catgtgactc cacggagtac cgggcgccgt ccaggcacct 6180

cgattagttc tcgagctttt ggagtacgtc gtctttaggt tgggggggagg ggttttatgc 6240

gatggagttt ccccacactg agtgggtgga gactgaagtt aggccagctt ggcacttgat 6300

gtaattctcc ttggaatttg ccctttttga gtttggatct tggttcattc tcaagcctca 6360

gacagtggtt caaagttttt ttcttccatt tcaggtgtcg tgaggaattc tctagagatc 6420

cctcgacctc gagatccatt gtgcccgggc gcaccatgga catgcgcgtg cccgcccagc 6480

tgctgggcct gctgctgctg tggttccccg gctcgcgatg c 6521

<210> 74
<211> 6513
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 74
caacccaagg ctgccccctc ggtcactctg ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc 60

aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc 120

tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa 180

agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc 240

cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc 300

cctacagaat gttcatgagc ggccgctcga ggccggcaag gccggatccc ccgacctcga 360

cctctggcta ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc 420

tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa atcatttggt cgagatccct cggagatctc 480

tagctagagg atcgatcccc gccccggacg aactaaacct gactacgaca tctctgcccc 540

ttcttcgcgg ggcagtgcat gtaatccctt cagttggttg gtacaacttg ccaactgggc 600

cctgttccac atgtgacacg gggggggacc aaacacaaag gggttctctg actgtagttg 660

acatccttat aaatggatgt gcacatttgc caacactgag tggctttcat cctggagcag 720

actttgcagt ctgtggactg caacacaaca ttgcctttat gtgtaactct tggctgaagc 780

tcttacacca atgctggggg acatgtacct cccaggggcc caggaagact acgggaggct 840

acaccaacgt caatcagagg ggcctgtgta gctaccgata agcggaccct caagagggca 900

ttagcaatag tgtttataag gccccttgt taaccctaaa cgggtagcat atgcttcccg 960

ggtagtagta tatactatcc agactaaccc taattcaata gcatatgtta cccaacggga 1020

agcatatgct atcgaattag ggttagtaaa agggtcctaa ggaacagcga tatctcccac 1080

cccatgagct gtcacggttt tatttacatg gggtcaggat tccacgaggg tagtgaacca 1140

ttttagtcac aagggcagtg gctgaagatc aaggagcggg cagtgaactc tcctgaatct 1200

tcgcctgctt cttcattctc cttcgtttag ctaatagaat aactgctgag ttgtgaacag 1260

taaggtgtat gtgaggtgct cgaaaacaag gtttcaggtg acgcccccag aataaaattt 1320

ggacgggggg ttcagtggtg gcattgtgct atgacaccaa tataaccctc acaaacccct 1380

tgggcaataa atactagtgt aggaatgaaa cattctgaat atctttaaca atagaaatcc 1440

atggggtggg gacaagccgt aaagactgga tgtccatctc acacgaattt atggctatgg 1500

gcaacacata atcctagtgc aatatgatac tggggttatt aagatgtgtc ccaggcaggg 1560

accaagacag gtgaaccatg ttgttacact ctatttgtaa caaggggaaa gagagtggac 1620

gccgacagca gcggactcca ctggttgtct ctaacacccc cgaaaattaa acggggctcc 1680

acgccaatgg ggcccataaa caaagacaag tggccactct ttttttgaa attgtggagt 1740

gggggcacgc gtcagccccc acacgccgcc ctgcggtttt ggactgtaaa ataagggtgt 1800

aataacttgg ctgattgtaa ccccgctaac cactgcggtc aaaccacttg cccacaaaac 1860

cactaatggc accccgggga atacctgcat aagtaggtgg gcgggccaag ataggggcgc 1920

gattgctgcg atctggagga caaattacac acacttgcgc ctgagcgcca agcacagggt 1980

tgttggtcct catattcacg aggtcgctga gagcacggtg ggctaatgtt gccatgggta 2040

gcatatacta cccaaatatc tggatagcat atgctatcct aatctatatc tgggtagcat 2100

aggctatcct aatctatatc tgggtagcat atgctatcct aatctatatc tgggtagtat 2160

atgctatcct aatttatatc tgggtagcat aggctatcct aatctatatc tgggtagcat 2220

atgctatcct aatctatatc tgggtagtat atgctatcct aatctgtatc cgggtagcat 2280

atgctatcct aatagagatt agggtagtat atgctatcct aatttatatc tgggtagcat 2340

atactaccca aatatctgga tagcatatgc tatcctaatc tatatctggg tagcatatgc 2400

tatcctaatc tatatctggg tagcataggc tatcctaatc tatatctggg tagcatatgc 2460

tatcctaatc tatatctggg tagtatatgc tatcctaatt tatatctggg tagcataggc 2520

tatcctaatc tatatctggg tagcatatgc tatcctaatc tatatctggg tagtatatgc 2580

tatcctaatc tgtatccggg tagcatatgc tatcctcatg ataagctgtc aaacatgaga 2640

attttcttga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt ttataggtta atgtcatgat 2700

aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaacccctat 2760

ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata 2820

aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct 2880

tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct cacccagaaa cgctggtgaa 2940

agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa 3000

cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt 3060

taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc ccgtgttgac gccgggcaag agcaactcgg 3120

tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca 3180

tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa 3240

cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgcttttt 3300

gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc 3360

cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgcagca atggcaacaa cgttgcgcaa 3420

actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 3480

ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc 3540

tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 3600

tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 3660

acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga 3720

ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt cattttaat ttaaaaggat 3780

ctaggtgaag atccttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt 3840

ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct 3900

gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc 3960

ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc 4020

aaatactgtt cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 4080

gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 4140

gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 4200

aacgggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 4260

cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta 4320

tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 4380

ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg 4440

atgctcgtca gggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 4500

cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 4560

ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga 4620

gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc 4680

cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg 4740

cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca 4800

ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg 4860

aaacagctat gaccatgatt acgccaagct ctagctagag gtcgagtccc tccccagcag 4920

gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc 4980

cgcccatccc gcccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat ggctgactaa 5040

ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt 5100

gaggaggctt ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct ttgcaaagat ggataaagtt 5160

ttaaacagag aggaatcttt gcagctaatg gaccttctag gtcttgaaag gagtgggaat 5220

tggctccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg 5280

gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag 5340

tgatgtcgtg tactggctcc gccttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc 5400

agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc 5460

cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat 5520

tacttccacc tggctgcagt acgtgattct tgatcccgag cttcgggttg gaagtgggtg 5580

ggagagttcg aggccttgcg cttaaggagc cccttcgcct cgtgcttgag ttgaggcctg 5640

gcctgggcgc tggggccgcc gcgtgcgaat ctggtggcac cttcgcgcct gtctcgctgc 5700

tttcgataag tctctagcca tttaaaattt ttgatgacct gctgcgacgc ttttttctg 5760

gcaagatagt cttgtaaatg cgggccaaga tctgcacact ggtatttcgg tttttggggc 5820

cgcgggcggc gacggggccc gtgcgtccca gcgcacatgt tcggcgaggc ggggcctgcg 5880

agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggta gtctcaagct ggccggcctg ctctggtgcc 5940

tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc ctgggcggca aggctggccc ggtcggcacc 6000

agttgcgtga gcggaaagat ggccgcttcc cggccctgct gcagggagct caaaatggag 6060

gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga gtcacccaca caaaggaaaa gggcctttcc 6120

gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga 6180

ttagttctcg agcttttgga gtacgtcgtc tttaggttgg ggggaggggt tttatgcgat 6240

ggagtttccc cacactgagt gggtggagac tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta 6300

attctccttg gaatttgccc tttttgagtt tggatcttgg ttcattctca agcctcagac 6360

agtggttcaa agtttttttc ttccatttca ggtgtcgtga ggaattctct agagatccct 6420

cgacctcgag atccattgtg cccgggcgcc accatgactt ggaccccact cctcttcctc 6480

accctcctcc tccactgcac aggaagctta tcg 6513

<210> 75
<211> 6515
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 75
acggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60

actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120

aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180

aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240

cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300

ttcaacaggg gagagtgttg agcggccgct cgaggccggc aaggccggat cccccgacct 360

cgacctctgg ctaataaagg aaatttattt tcattgcaat agtgtgttgg aatttttgt 420

gtctctcact cggaaggaca tatgggaggg caaatcattt ggtcgagatc cctcggagat 480

ctctagctag aggatcgatc cccgccccgg acgaactaaa cctgactacg acatctctgc 540

cccttcttcg cggggcagtg catgtaatcc cttcagttgg ttggtacaac ttgccaactg 600

ggccctgttc cacatgtgac acgggggggg accaaacaca aaggggttct ctgactgtag 660

ttgacatcct tataaatgga tgtgcacatt tgccaacact gagtggcttt catcctggag 720

cagactttgc agtctgtgga ctgcaacaca acattgcctt tatgtgtaac tcttggctga 780

agctcttaca ccaatgctgg gggacatgta cctcccaggg gcccaggaag actacgggag 840

gctacaccaa cgtcaatcag aggggcctgt gtagctaccg ataagcggac cctcaagagg 900

gcattagcaa tagtgtttat aaggcccccc tgttaaccct aaacgggtag catatgcttc 960

ccgggtagta gtatatacta tccagactaa ccctaattca atagcatatg ttacccaacg 1020

ggaagcatat gctatcgaat tagggttagt aaaagggtcc taaggaacag cgatatctcc 1080

caccccatga gctgtcacgg ttttatttac atggggtcag gattccacga gggtagtgaa 1140

ccattttagt cacaagggca gtggctgaag atcaaggagc gggcagtgaa ctctcctgaa 1200

tcttcgcctg cttcttcatt ctccttcgtt tagctaatag aataactgct gagttgtgaa 1260

cagtaaggtg tatgtgaggt gctcgaaaac aaggtttcag gtgacgcccc cagaataaaa 1320

tttggacggg gggttcagtg gtggcattgt gctatgacac caatataacc ctcacaaacc 1380

ccttgggcaa taaatactag tgtaggaatg aaacattctg aatatcttta acaatagaaa 1440

tccatggggt ggggacaagc cgtaaagact ggatgtccat ctcacacgaa tttatggcta 1500

tgggcaacac ataatcctag tgcaatatga tactggggtt attaagatgt gtcccaggca 1560

gggaccaaga caggtgaacc atgttgttac actctatttg taacaagggg aaagagagtg 1620

gacgccgaca gcagcggact ccactggttg tctctaacac ccccgaaaat taaacggggc 1680

tccacgccaa tggggcccat aaacaaagac aagtggccac tctttttttt gaaattgtgg 1740

agtgggggca cgcgtcagcc cccacacgcc gccctgcggt tttggactgt aaaataaggg 1800

tgtaataact tggctgattg taaccccgct aaccactgcg gtcaaaccac ttgcccacaa 1860

aaccactaat ggcaccccgg ggaatacctg cataagtagg tgggcgggcc aagatagggg 1920

cgcgattgct gcgatctgga ggacaaatta cacacacttg cgcctgagcg ccaagcacag 1980

ggttgttggt cctcatattc acgaggtcgc tgagagcacg gtgggctaat gttgccatgg 2040

gtagcatata ctacccaaat atctggatag catatgctat cctaatctat atctgggtag 2100

cataggctat cctaatctat atctgggtag catatgctat cctaatctat atctgggtag 2160

tatatgctat cctaatttat atctgggtag cataggctat cctaatctat atctgggtag 2220

catatgctat cctaatctat atctgggtag tatatgctat cctaatctgt atccgggtag 2280

catatgctat cctaatagag attagggtag tatatgctat cctaatttat atctgggtag 2340

catatactac ccaaatatct ggatagcata tgctatccta atctatatct gggtagcata 2400

tgctatccta atctatatct gggtagcata ggctatccta atctatatct gggtagcata 2460

tgctatccta atctatatct gggtagtata tgctatccta atttatatct gggtagcata 2520

ggctatccta atctatatct gggtagcata tgctatccta atctatatct gggtagtata 2580

tgctatccta atctgtatcc gggtagcata tgctatcctc atgataagct gtcaaacatg 2640

agaattttct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat 2700

gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc 2760

tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg 2820

ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc 2880

ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcacccag aaacgctggt 2940

gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct 3000

caacagcggt aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac 3060

ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtgtt gacgccgggc aagagcaact 3120

cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa 3180

gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga 3240

taacactgcg gccaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt 3300

tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga 3360

agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgca gcaatggcaa caacgttgcg 3420

caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat 3480

ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat 3540

tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc 3600

agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga 3660

tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc 3720

agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag 3780

gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc 3840

gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atccttttt 3900

tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt 3960

gccggatcaa gagctaccaa ctcttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat 4020

accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc 4080

accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa 4140

gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg 4200

ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag 4260

atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag 4320

gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc caggggggaaa 4380

cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgatttttt 4440

gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg 4500

gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc 4560

tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac 4620

cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct 4680

ccccgcgcgt tggccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc 4740

gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac cccaggcttt 4800

acactttatg cttccggctc gtatgttgtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac 4860

aggaaacagc tatgaccatg attacgccaa gctctagcta gaggtcgagt ccctccccag 4920

caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa 4980

ctccgcccat cccgccccta actccgccca gttccgccca ttctccgccc catggctgac 5040

taatttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt 5100

agtgaggagg ctttttgga ggcctaggct tttgcaaaaa gctttgcaaa gatggataaa 5160

gttttaaaca gagaggaatc tttgcagcta atggaccttc taggtcttga aaggagtggg 5220

aattggctcc ggtgcccgtc agtgggcaga gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt 5280

ggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgc ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga 5340

aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt tcccgagggt gggggagaac cgtatataag 5400

tgcagtagtc gccgtgaacg ttcttttttcg caacgggttt gccgccagaa cacaggtaag 5460

tgccgtgtgt ggttcccgcg ggcctggcct ctttacgggt tatggccctt gcgtgccttg 5520

aattacttcc acctggctgc agtacgtgat tcttgatccc gagcttcggg ttggaagtgg 5580

gtgggagagt tcgaggcctt gcgcttaagg agcccccttcg cctcgtgctt gagttgaggc 5640

ctggcctggg cgctggggcc gccgcgtgcg aatctggtgg caccttcgcg cctgtctcgc 5700

tgctttcgat aagtctctag ccatttaaaa tttttgatga cctgctgcga cgcttttttt 5760

ctggcaagat agtcttgtaa atgcgggcca agatctgcac actggtattt cggtttttgg 5820

ggccgcgggc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgcaca tgttcggcga ggcggggcct 5880

gcgagcgcgg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa gctggccggc ctgctctggt 5940

gcctggcctc gcgccgccgt gtatcgcccc gccctgggcg gcaaggctgg cccggtcggc 6000

accagttgcg tgagcggaaa gatggccgct tcccggccct gctgcaggga gctcaaaatg 6060

gaggacgcgg cgctcgggag agcgggcggg tgagtcaccc acacaaagga aaagggcctt 6120

tccgtcctca gccgtcgctt catgtgactc cacggagtac cgggcgccgt ccaggcacct 6180

cgattagttc tcgagctttt ggagtacgtc gtctttaggt tgggggggagg ggttttatgc 6240

gatggagttt ccccacactg agtgggtgga gactgaagtt aggccagctt ggcacttgat 6300

gtaattctcc ttggaatttg ccctttttga gtttggatct tggttcattc tcaagcctca 6360

gacagtggtt caaagttttt ttcttccatt tcaggtgtcg tgaggaattc tctagagatc 6420

cctcgacctc gagatccatt gtgcccgggc gcaccatgac ttggacccca ctcctcttcc 6480

tcaccctcct cctccactgc acaggaagct tatcg 6515

<210> 76
<211> 6519
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 76
caacccaagg ctgccccctc ggtcactctg ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc 60

aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc 120

tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa 180

agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc 240

cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc 300

cctacagaat gttcatgagc ggccgctcga ggccggcaag gccggatccc ccgacctcga 360

cctctggcta ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc 420

tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa atcatttggt cgagatccct cggagatctc 480

tagctagagg atcgatcccc gccccggacg aactaaacct gactacgaca tctctgcccc 540

ttcttcgcgg ggcagtgcat gtaatccctt cagttggttg gtacaacttg ccaactgggc 600

cctgttccac atgtgacacg ggggggggacc aaacacaaag gggttctctg actgtagttg 660

acatccttat aaatggatgt gcacatttgc caacactgag tggctttcat cctggagcag 720

actttgcagt ctgtggactg caacacaaca ttgcctttat gtgtaactct tggctgaagc 780

tcttacacca atgctggggg acatgtacct cccaggggcc caggaagact acgggaggct 840

acaccaacgt caatcagagg ggcctgtgta gctaccgata agcggaccct caagagggca 900

ttagcaatag tgtttataag gccccccttgt taaccctaaa cgggtagcat atgcttcccg 960

ggtagtagta tatactatcc agactaaccc taattcaata gcatatgtta cccaacggga 1020

agcatatgct atcgaattag ggttagtaaa agggtcctaa ggaacagcga tatctcccac 1080

cccatgagct gtcacggttt tatttacatg gggtcaggat tccacgaggg tagtgaacca 1140

ttttagtcac aagggcagtg gctgaagatc aaggagcggg cagtgaactc tcctgaatct 1200

tcgcctgctt cttcattctc cttcgtttag ctaatagaat aactgctgag ttgtgaacag 1260

taaggtgtat gtgaggtgct cgaaaacaag gtttcaggtg acgcccccag aataaaattt 1320

ggacgggggg ttcagtggtg gcattgtgct atgacaccaa tataaccctc acaaacccct 1380

tgggcaataa atactagtgt aggaatgaaa cattctgaat atctttaaca atagaaatcc 1440

atggggtggg gacaagccgt aaagactgga tgtccatctc acacgaattt atggctatgg 1500

gcaacacata atcctagtgc aatatgatac tggggttatt aagatgtgtc ccaggcaggg 1560

accaagacag gtgaaccatg ttgttacact ctatttgtaa caaggggaaa gagagtggac 1620

gccgacagca gcggactcca ctggttgtct ctaacacccc cgaaaattaa acggggctcc 1680

acgccaatgg ggcccataaa caaagacaag tggccactct ttttttttgaa attgtggagt 1740

gggggcacgc gtcagccccc acacgccgcc ctgcggtttt ggactgtaaa ataagggtgt 1800

aataacttgg ctgattgtaa ccccgctaac cactgcggtc aaaccacttg cccacaaaac 1860

cactaatggc accccgggga atacctgcat aagtaggtgg gcgggccaag ataggggcgc 1920

gattgctgcg atctggagga caaattacac acacttgcgc ctgagcgcca agcacagggt 1980

tgttggtcct catattcacg aggtcgctga gagcacggtg ggctaatgtt gccatgggta 2040

gcatatacta cccaaatatc tggatagcat atgctatcct aatctatatc tgggtagcat 2100

aggctatcct aatctatatc tgggtagcat atgctatcct aatctatatc tgggtagtat 2160

atgctatcct aatttatatc tgggtagcat aggctatcct aatctatatc tgggtagcat 2220

atgctatcct aatctatatc tgggtagtat atgctatcct aatctgtatc cgggtagcat 2280

atgctatcct aatagagatt agggtagtat atgctatcct aatttatatc tgggtagcat 2340

atactaccca aatatctgga tagcatatgc tatcctaatc tatatctggg tagcatatgc 2400

tatcctaatc tatatctggg tagcataggc tatcctaatc tatatctggg tagcatatgc 2460

tatcctaatc tatatctggg tagtatatgc tatcctaatt tatatctggg tagcataggc 2520

tatcctaatc tatatctggg tagcatatgc tatcctaatc tatatctggg tagtatatgc 2580

tatcctaatc tgtatccggg tagcatatgc tatcctcatg ataagctgtc aaacatgaga 2640

attttcttga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt ttataggtta atgtcatgat 2700

aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaacccctat 2760

ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata 2820

aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct 2880

tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct cacccagaaa cgctggtgaa 2940

agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa 3000

cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt 3060

taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc ccgtgttgac gccgggcaag agcaactcgg 3120

tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca 3180

tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa 3240

cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgcttttt 3300

gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc 3360

cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgcagca atggcaacaa cgttgcgcaa 3420

actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 3480

ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc 3540

tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 3600

tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 3660

acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga 3720

ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt cattttaat ttaaaaggat 3780

ctaggtgaag atccttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt 3840

ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct 3900

gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc 3960

ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc 4020

aaatactgtt cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 4080

gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 4140

gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 4200

aacgggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 4260

cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta 4320

tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 4380

ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg 4440

atgctcgtca gggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 4500

cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 4560

ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga 4620

gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc 4680

cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg 4740

cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca 4800

ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg 4860

aaacagctat gaccatgatt acgccaagct ctagctagag gtcgagtccc tccccagcag 4920

gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc 4980

cgcccatccc gcccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat ggctgactaa 5040

ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt 5100

gaggaggctt ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct ttgcaaagat ggataaagtt 5160

ttaaacagag aggaatcttt gcagctaatg gaccttctag gtcttgaaag gagtgggaat 5220

tggctccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg 5280

gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag 5340

tgatgtcgtg tactggctcc gccttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc 5400

agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc 5460

cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat 5520

tacttccacc tggctgcagt acgtgattct tgatcccgag cttcgggttg gaagtgggtg 5580

ggagagttcg aggccttgcg cttaaggagc cccttcgcct cgtgcttgag ttgaggcctg 5640

gcctgggcgc tggggccgcc gcgtgcgaat ctggtggcac cttcgcgcct gtctcgctgc 5700

tttcgataag tctctagcca tttaaaattt ttgatgacct gctgcgacgc tttttttctg 5760

gcaagatagt cttgtaaatg cgggccaaga tctgcacact ggtatttcgg tttttggggc 5820

cgcgggcggc gacggggccc gtgcgtccca gcgcacatgt tcggcgaggc ggggcctgcg 5880

agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggta gtctcaagct ggccggcctg ctctggtgcc 5940

tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc ctgggcggca aggctggccc ggtcggcacc 6000

agttgcgtga gcggaaagat ggccgcttcc cggccctgct gcagggagct caaaatggag 6060

gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga gtcacccaca caaaggaaaa gggcctttcc 6120

gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga 6180

ttagttctcg agcttttgga gtacgtcgtc tttaggttgg ggggaggggt tttatgcgat 6240

ggagtttccc cacactgagt gggtggagac tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta 6300

attctccttg gaatttgccc tttttgagtt tggatcttgg ttcattctca agcctcagac 6360

agtggttcaa agttttttc ttccatttca ggtgtcgtga ggaattctct agagatccct 6420

cgacctcgag atccattgtg cccgggcgcc accatggaca tgcgcgtgcc cgcccagctg 6480

ctgggcctgc tgctgctgtg gttccccggc tcgcgatgc 6519

<210> 77
<211> 7185
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 77
gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc cgcgggggga 360

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgcgaggag 720

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgagcggccg ctcgaggccg gcaaggccgg 1020

atcccccgac ctcgacctct ggctaataaa ggaaatttat tttcattgca atagtgtgtt 1080

ggaatttttt gtgtctctca ctcggaagga catatgggag ggcaaatcat ttggtcgaga 1140

tccctcggag atctctagct agaggatcga tccccgcccc ggacgaacta aacctgacta 1200

cgacatctct gccccttctt cgcggggcag tgcatgtaat cccttcagtt ggttggtaca 1260

acttgccaac tgggccctgt tccacatgtg acacgggggg ggaccaaaca caaaggggtt 1320

ctctgactgt agttgacatc cttataaatg gatgtgcaca tttgccaaca ctgagtggct 1380

ttcatcctgg agcagacttt gcagtctgtg gactgcaaca caacattgcc tttatgtgta 1440

actcttggct gaagctctta caccaatgct gggggacatg tacctcccag gggcccagga 1500

agactacggg aggctacacc aacgtcaatc agaggggcct gtgtagctac cgataagcgg 1560

accctcaaga gggcattagc aatagtgttt ataaggcccc cttgttaacc ctaaacgggt 1620

agcatatgct tcccgggtag tagtatatac tatccagact aaccctaatt caatagcata 1680

tgttacccaa cgggaagcat atgctatcga attagggtta gtaaaagggt cctaaggaac 1740

agcgatatct cccaccccat gagctgtcac ggttttattt acatggggtc aggattccac 1800

gagggtagtg aaccatttta gtcacaaggg cagtggctga agatcaagga gcgggcagtg 1860

aactctcctg aatcttcgcc tgcttcttca ttctccttcg tttagctaat agaataactg 1920

ctgagttgtg aacagtaagg tgtatgtgag gtgctcgaaa acaaggtttc aggtgacgcc 1980

cccagaataa aatttggacg gggggttcag tggtggcatt gtgctatgac accaatataa 2040

ccctcacaaa ccccttgggc aataaatact agtgtaggaa tgaaacattc tgaatatctt 2100

taacaataga aatccatggg gtggggacaa gccgtaaaga ctggatgtcc atctcacacg 2160

aatttatggc tatgggcaac acataatcct agtgcaatat gatactgggg ttattaagat 2220

gtgtcccagg cagggaccaa gacaggtgaa ccatgttgtt acactctatt tgtaacaagg 2280

ggaaagagag tggacgccga cagcagcgga ctccactggt tgtctctaac acccccgaaa 2340

attaaacggg gctccacgcc aatggggccc ataaacaaag acaagtggcc actctttttt 2400

ttgaaattgt ggagtggggg cacgcgtcag cccccacacg ccgccctgcg gttttggact 2460

gtaaaataag ggtgtaataa cttggctgat tgtaaccccg ctaaccactg cggtcaaacc 2520

acttgcccac aaaaccacta atggcacccc ggggaatacc tgcataagta ggtgggcggg 2580

ccaagatagg ggcgcgattg ctgcgatctg gaggacaaat tacacacact tgcgcctgag 2640

cgccaagcac agggttgttg gtcctcatat tcacgaggtc gctgagagca cggtgggcta 2700

atgttgccat gggtagcata tactacccaa atatctggat agcatatgct atcctaatct 2760

atatctgggt agcataggct atcctaatct atatctgggt agcatatgct atcctaatct 2820

atatctgggt agtatatgct atcctaattt atatctgggt agcataggct atcctaatct 2880

atatctgggt agcatatgct atcctaatct atatctgggt agtatatgct atcctaatct 2940

gtatccgggt agcatatgct atcctaatag agattagggt agtatatgct atcctaattt 3000

atatctgggt agcatatact acccaaatat ctggatagca tatgctatcc taatctatat 3060

ctgggtagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagca taggctatcc taatctatat 3120

ctgggtagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagta tatgctatcc taatttatat 3180

ctgggtagca taggctatcc taatctatat ctgggtagca tatgctatcc taatctatat 3240

ctgggtagta tatgctatcc taatctgtat ccgggtagca tatgctatcc tcatgataag 3300

ctgtcaaaca tgagaatttt cttgaagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata 3360

ggttaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt 3420

gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag 3480

acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca 3540

tttccgtgtc gcccttattc cctttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcaccc 3600

agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat 3660

cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc 3720

aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtg ttgacgccgg 3780

gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc 3840

agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat 3900

aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga 3960

gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc 4020

ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg cagcaatggc 4080

aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt 4140

aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc 4200

tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggtctcgcg gtatcattgc 4260

agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca 4320

ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca 4380

ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt 4440

ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta 4500

acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg 4560

agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc 4620

ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag 4680

cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa 4740

gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag tggctgctgc 4800

cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc 4860

gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta 4920

caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag 4980

aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct 5040

tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga 5100

gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc 5160

ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttcctgcgtt 5220

atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg 5280

cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg 5340

caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc 5400

cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcattaggc 5460

accccaggct ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata 5520

acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagctctagc tagaggtcga 5580

gtccctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccatag 5640

tcccgcccct aactccgccc atcccgcccc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc 5700

cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc 5760

tattccagaa gtagtgagga ggctttttg gaggcctagg cttttgcaaa aagctttgca 5820

aagatggata aagttttaaa cagagaggaa tctttgcagc taatggacct tctaggtctt 5880

gaaaggagtg ggaattggct ccggtgcccg tcagtgggca gagcgcacat cgcccacagt 5940

ccccgagaag ttgggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgcgg 6000

ggtaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccgagg gtgggggaga 6060

accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaacgggt ttgccgccag 6120

aacacaggta agtgccgtgt gtggttcccg cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc 6180

ttgcgtgcct tgaattactt ccacctggct gcagtacgtg attcttgatc ccgagcttcg 6240

ggttggaagt gggtgggaga gttcgaggcc ttgcgcttaa ggagcccctt cgcctcgtgc 6300

ttgagttgag gcctggcctg ggcgctgggg ccgccgcgtg cgaatctggt ggcaccttcg 6360

cgcctgtctc gctgctttcg ataagtctct agccatttaa aatttttgat gacctgctgc 6420

gacgcttttt ttctggcaag atagtcttgt aaatgcgggc caagatctgc acactggtat 6480

ttcggttttt ggggccgcgg gcggcgacgg ggcccgtgcg tcccagcgca catgttcggc 6540

gaggcggggc ctgcgagcgc ggccaccgag aatcggacgg gggtagtctc aagctggccg 6600

gcctgctctg gtgcctggcc tcgcgccgcc gtgtatcgcc ccgccctggg cggcaaggct 6660

ggcccggtcg gcaccagttg cgtgagcgga aagatggccg cttcccggcc ctgctgcagg 6720

gagctcaaaa tggaggacgc ggcgctcggg agagcgggcg ggtgagtcac ccacacaaag 6780

gaaaagggcc tttccgtcct cagccgtcgc ttcatgtgac tccacggagt accgggcgcc 6840

gtccaggcac ctcgattagt tctcgagctt ttggagtacg tcgtctttag gttgggggga 6900

ggggttttat gcgatggagt ttccccacac tgagtgggtg gagactgaag ttaggccagc 6960

ttggcacttg atgtaattct ccttggaatt tgccctttt gagtttggat cttggttcat 7020

tctcaagcct cagacagtgg ttcaaagttt ttttcttcca tttcaggtgt cgtgaggaat 7080

tctctagaga tccctcgacc tcgagatcca ttgtgcccgg gcgccaccat ggagtttggg 7140

ctgagctggc tttttcttgt cgcgatttta aaaggtgtcc agtgc 7185

<210> 78
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 78
Asp Glu Val Asp
1

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **ANA MARIA CASTRO WEY** 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

TRADUCCION OFICIAL No. 2012-10-11-679

DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Estado de Illinois

Secretario de Estado

País de Destino: COLOMBIA

APOSTILLA

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

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

Certificado

5. en Chicago, Illinois
6. el 5 de octubre de 2012
7. por el Secretario de Estado, Estado de Illinois
8. No. C12SR24081
9. Sello/Estampilla
   Sello del Estado de Illinois
10. Firma: (ilegible)
    Jesse White
    Secretario de Estado
    Estado de Illinois

Esta Apostilla certifica exclusivamente la firma y el sello o estampilla que lleva. No certifica el contenido del documento para el cual se expidió.
ESTA APOSTILLA NO ES VALIDA DENTRO DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

[illegible]
[illegible]ITA ESCOBAR DE TAMAYO

{JLLCCO: 387015.DOC v.1}

Dado y firmado este

(firma: ilegible)

Thomas C. Freyman

Vicepresidente Ejecutivo, Director Financiero

AbbVie Inc.

Fecha: 9 / 21 / 12

Estado de Illinois

Condado de Lake

Firmado y testificado ante mí el 9 / 27 / 12 por Thomas C. Freyman

Firma (ilegible)

Sello Oficial
Jillian A. Pare
Notario Público - Estado de Illinois
Mi nombramiento expira: 01/25/13

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 11 de octubre de 2012, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

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

AbbVie, Inc, una compañia organizada y existente bajo las leyes del Estado de Delaware.

con domicilio en
1 North Waukegan Road, North Chicago, Illinois 60064, Estados Unidos de América

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO 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 ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO 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, 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 en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir 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 ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO 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

The undersigned,

AbbVie Inc., a company organized and existing under the laws of Delaware

domiciled at

1 North Waukegan Road, North Chicago, Illinois 60064, U.S.A

hereby appoint, ALICIA LLOREDA y/o ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO 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 ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO 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, 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 in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, 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 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 ANA MARIA CASTRO y/o GUSTAVO TAMAYO 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.

STATE OF ILLINOIS

SECRETARY OF STATE

COUNTRY OF DESTINATION: COLOMBIA

APOSTILLE

Convention de La Haye du 5 Octobre 1961

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by JILLIAN A. PARE

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

4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

5. Chicago, Illinois

6. OCTOBER 5, 2012

7. by the Secretary of State, State of Illinois

8. No. C12SR24081

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS

SEAL OF THE STATE OF ILLINOIS
AUG. 26TH 1818

This Apostille only certifies the signature and the seal or stamp it bears. It does not certify content of the document for which it was issued.
THIS APOSTILLE IS NOT VALID WITHIN THE UNITED STATES OF AMERICA.

♻ Printed on recycled paper. Printed by authority of the State of Illinois. April 2012 — 110M — I 168.3

Given and signed this

Thomas C. Freyman

Executive Vice President, Finance and Chief Financial Officer

AbbVie Inc.

Date: 9/27/12

State of Illinois
County of Lake
Signed and attested before me on 9/27/12 by Thomas C. Freyman

Signature

OFFICIAL SEAL
JILLIAN A PARE
NOTARY PUBLIC - STATE OF ILLINOIS
MY COMMISSION EXPIRES:01/25/13

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

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
13 September 2012 (13.09.2012)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/121775 A9

(51) International Patent Classification:
C07K 16/24 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/066130

(22) International Filing Date:
20 December 2011 (20.12.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/425,671 21 December 2010 (21.12.2010) US

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

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant *(for US only)*: **WU, Chengbin** [CN/CN]; 300 Jin Xiu Road, #14, Apt. 602, Shanghai (CN).

(74) Agents: **VELEMA, James, H.** et al.; Lathrop & Gage LLP, 28 State Street, Suite 0700, Boston, MA 02109 (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,

[Continued on next page]

(54) Title: IL-1 -ALPHA AND -BETA BISPECIFIC DUAL VARIABLE DOMAIN IMMUNOGLOBULINS AND THEIR USE

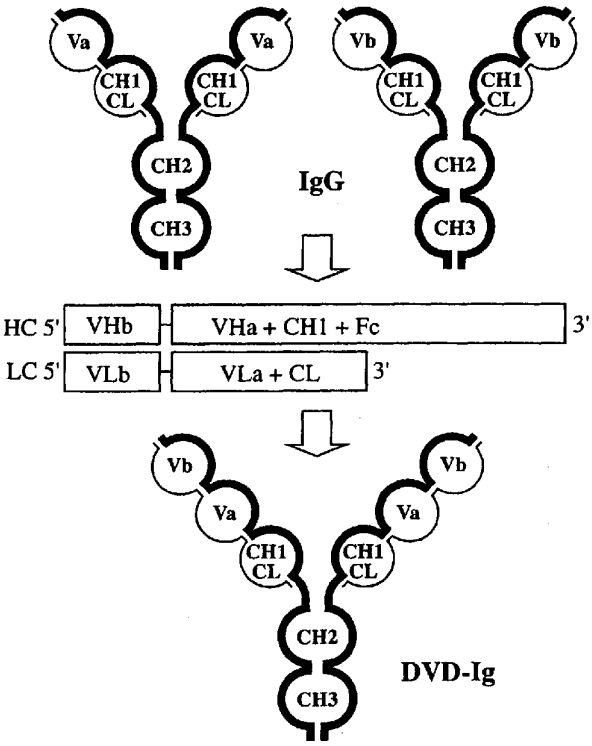

Fig. 1A

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

WO 2012/121775 A9

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, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, 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))*

— *with information concerning authorization of rectification of an obvious mistake under Rule 91.3 (b) (Rule 48.2(i))*

(88) Date of publication of the international search report:
1 November 2012

(48) Date of publication of this corrected version:
17 January 2013

(15) Information about Correction:
see Notice of 17 January 2013

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
527877 BBI-718PC		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2011/066130	20/12/2011	21/12/2010
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 8 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:

   IL-1-ALPHA AND -BETA BISPECIFIC DUAL VARIABLE DOMAIN IMMUNOGLOBULINS AND THEIR USE

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/US2011/066130

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 and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. (means)

   [ ] on paper

   [X] in electronic form

   b. (time)

   [ ] in the international application as filed

   [ ] together with the international application in electronic form

   [X] subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table 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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/066130

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

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

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

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 2, 5-76(all partially)

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/US2011/066130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/24
ADD.

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)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/149189 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; ISAKSON PETER C [US]; OLSON LISA M) 10 December 2009 (2009-12-10)	5,6, 9-23, 26-62, 64-76
Y	claims 1-76; sequence 71	1,2,5-76
X	WU CHENGBIN ET AL: "Molecular construction and optimization of anti-human IL-1 alpha/beta dual variable domain immunoglobulin (DVD-Ig (TM)) molecules", MABS, LANDES BIOSCIENCE, US, vol. 1, no. 4, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 339-347, XP002657321, ISSN: 1942-0862	1,2,5-76
Y	the whole document	1,2,5-76

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* 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
29 June 2012	07/09/2012

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Lechner, Oskar

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WU CHENGBIN; YING HUA; GRINNELL CHRISTINE; BRYANT SHAUGHN; MILLER RENEE; CLABBERS ANCA; BOSE SAHANA; MCCARTHY DONNA; ZHU RONG-RONG: "Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin", NATURE BIOTECHNOLOGY., vol. 25, no. 11, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 1290-1297, XP009110104, US ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt1345 the whole document	1-76
A,P	WO 2011/143562 A2 (ABBOTT LAB [US]; WU CHENGBIN [CN]; AMBROSI DOMINIC J [US]; HSIEH CHUNG) 17 November 2011 (2011-11-17) sequences 66, 208, 238	1-3,5-76

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2011/066130

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009149189 A2	10-12-2009	AR 072001 A1	28-07-2010
		AU 2009256250 A1	10-12-2009
		CA 2726087 A1	10-12-2009
		CN 102112495 A	29-06-2011
		CO 6331347 A2	20-10-2011
		DO P2010000368 A	15-02-2011
		EC SP10010644 A	28-02-2011
		EP 2297209 A2	23-03-2011
		JP 2011523853 A	25-08-2011
		KR 20110016958 A	18-02-2011
		PE 00922010 A1	12-03-2010
		TW 201008580 A	01-03-2010
		US 2009311253 A1	17-12-2009
		UY 31862 A	05-01-2010
		WO 2009149189 A2	10-12-2009
WO 2011143562 A2	17-11-2011	AR 081246 A1	18-07-2012
		US 2011280800 A1	17-11-2011
		UY 33386 A	30-12-2011
		WO 2011143562 A2	17-11-2011

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2, 5-76(all partially)

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;
wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens selected from the group consisting of IL-1alpha and IL-lbeta, wherein VD1 and VD2 comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 30, wherein the binding protein does not comprise any of SeqID 31-47

---

2. claims: 1, 2, 5-76(all partially)

-"- SeqID No 32, wherein the binding protein does not comprise any of SeqID 30, 31, 33-47

3-9. claims: 1, 2, 5-76(all partially)

-"- SeqID No 34, 36, 38, 40, 42, 44 or 46, wherein the binding protein does not comprise any of the sequences of the other inventions listed.

---

10. claims: 3-76(partially)

A binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein;VD1 is a first light heavy chain variable domain; VD2 is a second light heavy 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; andn is 0 or 1; wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens selected from the group consisting of IL-1 alpha and IL-1 beta, wherein the VD1 and VD2 light chain variable domains comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 31, wherein the binding protein does not comprise any of the sequences of the other inventions listed

---

11-18. claims: 3-76(partially)

-"- SEQ ID NOs: 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 or 47, wherein

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

the binding protein does not comprise any of the sequences of the other inventions listed

---

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: 28-06-13
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/24

(71) Solicitante(s): **ABBVIE, INC.**

(72) Inventor(es): WU, Chengbin.

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

(30) Prioridad	(31) ***No. Prioridad***	(32) ***Fecha***	(33) ***País***
	61/425,671	21-12-10	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 21-07-13
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: *20-12-11*
No. de solicitud: ***PCT/US2011/066130***

(87) Publicación internacional:
Fecha: ***13-09-12***
No. Publicación: ***WO 2012/121775 A9***

(54) Titulo: **INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL BIESPECÍFICAS DE IL-1 ALFA Y BETA Y SU USO.**

(57) Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La presente invención se refiere a proteínas de enlace multivalentes y multiespecíficas diseñadas, métodos de producción, y específicamente a sus usos en la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades.

Sector: Farmacéutico. Proteínas de enlace multivalentes y multiespecíficas usados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, cáncer y otras.

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: 28-06-13
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/24

(71) Solicitante(s): **ABBVIE, INC.**

(72) Inventor (es): WU, Chengbin.

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

(30) Prioridad	(31) ***No. Prioridad***	(32) ***Fecha***	(33) ***País***
	61/425,671	21-12-10	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 21-07-13
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: *20-12-11*
No. de solicitud: ***PCT/US2011/066130***

(87) Publicación internacional
Fecha: ***13-09-12***
No. publicación: ***WO 2012/121775 A9***

(54) Titulo: **INMUNOGLOBULINAS DE DOMINIO VARIABLE DUAL BIESPECÍFICAS DE IL-1 ALFA Y BETA Y SU USO.**