



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Nou
RGF

PCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

07-97890

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO "ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENOS DE CANDIDA"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/395

71. SOLICITANTE DOMANTIS LIMITED; CASSONE, ANTONIO Y DE BERNARDIS, FLAVIA

DOMICILIO MIDDLESEX, REINO UNIDO Y ROMA, ITALIA

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

22. BOGOTÁ, D.C. 20 SET. 2007

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-097890-00000-0000

Fecha: 2007-09-20 17:01:07 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 238

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

18/10/2007

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **DOMANTIS LIMITED;
CASSONE, ANTONIO Y DE BERNARDIS,
FLAVIA**

Dirección: 980 Great West Road,
Brentford, Middlesex TW8 9GS, Reino
Unido y Department of Infectious Parasitic
and Immune-mediated Diseases, Instituto
Superiore di Sanita (National Health
Institute), Viale Regina Elena, 299, I-00161
Roma Italia.

Nacionalidad o Domicilio: Middlesex, Reino
Unido y Roma, Italia.

Lugar de Constitución: Inglaterra.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: **CASSONE, Antonio; DE BERNARDIS, Flavia; GRANT, Steven y LIU, Haiqun**

Dirección: Department of Infectious Parasitic and Immune-mediated Diseases, Instituto
Superiore di Sanita (National Health Institute), Viale Regina Elena, 299, I-00161 Roma y
315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG.

Nacionalidad o Domicilio: Reino Unido e Italia.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2006/000843

Fecha: 10/03/06

Publicación Internacional No. WO 2006/097689 A3

Fecha: 21/09/06

⑥

Título (54) "ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS DE CANDIDA"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

GB
GB

18/03/05
29/09/05

0505489.5
0519883.3

⑨

Comprobante de Pago No. 07- 73,583

Fecha: Septiembre 12 de 2007

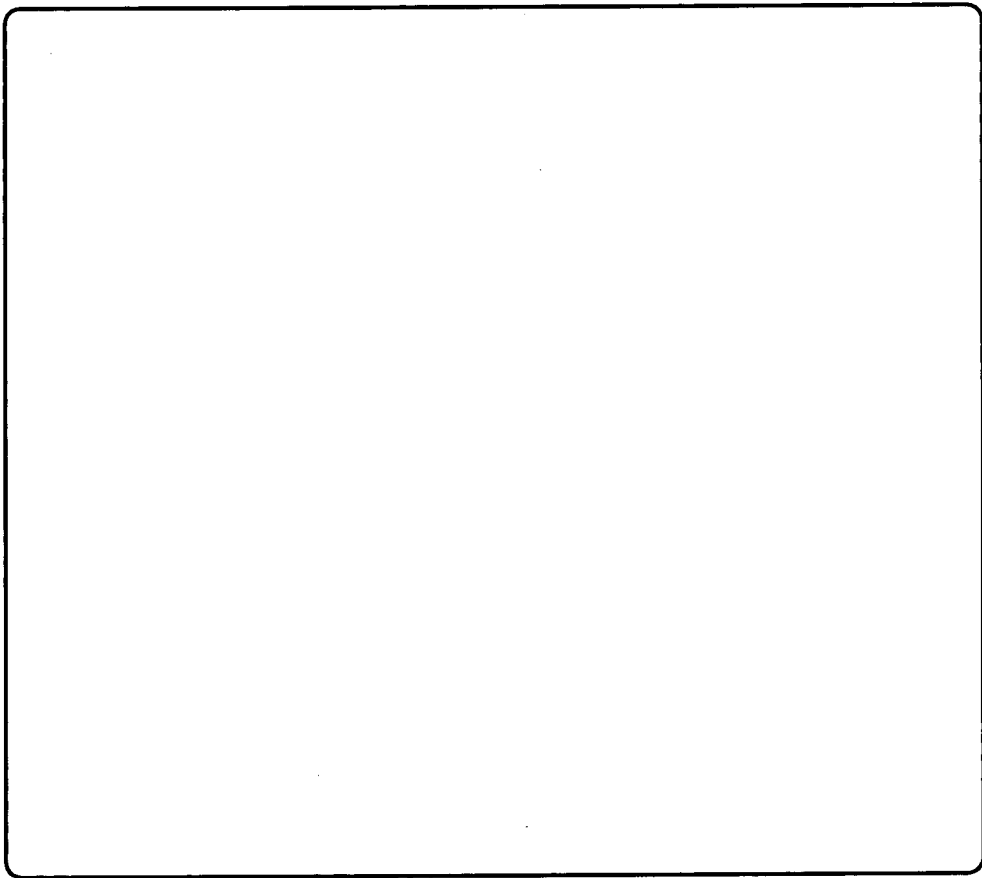
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Declaraciones (Declaración bajo las Reglas PCT 4.17(ii) y 51 bis.1(a)(ii) que acreditan el traspaso de los inventores al solicitante).
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, Notificaciones de adición de solicitantes e inventores (Forma PCT/IB/306) con su traducción, Opinión Escrita con su traducción, documento que acredita el cambio de dirección del Solicitante (DOMANTIS LIMITED) y Listado de Secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-097890- -00000-0000

Fecha: 2007-09-20 17:01:07 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 238

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 73,583
FECHA : SEPTIEMBRE 12 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	47999527	12/09/2007	12,708,800.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN 482,000.00
			TOTAL : \$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLORED**A y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta 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 LLORED A RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2007-06-16-455
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Certificado Notarial, documento también escrito en español.

APOSTILLA

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

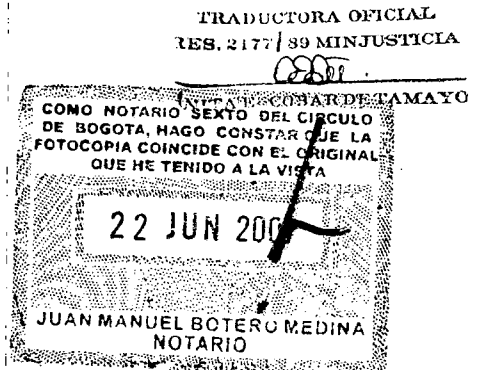
Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento público
2. ha sido firmado por James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

Certificado

5. en Londres
6. el 10 de mayo de 2007
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y de la Comunidad de Naciones
8. Número: **H381888**
9. Sello/estampilla:
Sello de la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth
10. Firma: (ilegible)
R. Shilton
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean

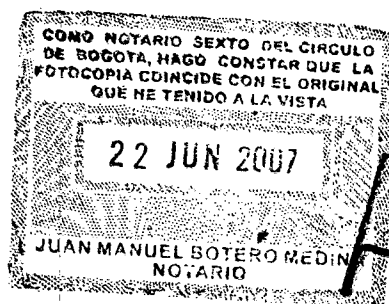


correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 19 de junio de 2007, 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
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **James Kerr MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

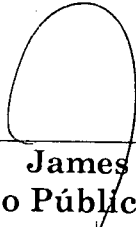
C E R T I F I C O:

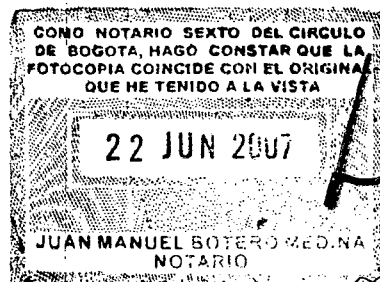
QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **Peter John GIDDINGS**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad inglesa denominada "**DOMANTIS LIMITED**", sociedad privada de responsabilidad limitada debidamente constituida, organizada y existente de acuerdo con la ley inglesa, en actual funcionamiento, e inscrita en la Oficina de Registro de Sociedades de Inglaterra y Gales bajo el número **3907643**, con domicilio social en 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS, Inglaterra;

QUE el citado Señor Don **Peter John GIDDINGS** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 13 de marzo de 2007, una copia del cual he tenido a la vista;

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuere necesario expido el presente Certificado que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy nueve de mayo del año dos mil siete.


James Kerr MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

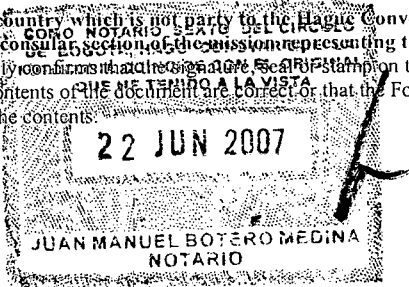
UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord
- This public document / Le présent acte public
2. Has been signed by **James Kerr Milligan**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de
5. at London/à Londres
6. Certified/Attesté the/le **10 May 2007**
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.
8. Number/sous No **H381888**
9. Stamp:
timbre:
10. Signature: **R Shilton**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.



Los abajo firmados,

Domantis Limited
Gruposociedad organizada y
existente bajo las leyes de
Inglaterra.

con domicilio en

980 Great West Road, Brentford,
Middlesex TW8 9GS, GB.

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

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, 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 creyeran 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 GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado 8 mayo, 2007

Domantis Limited

domiciled at

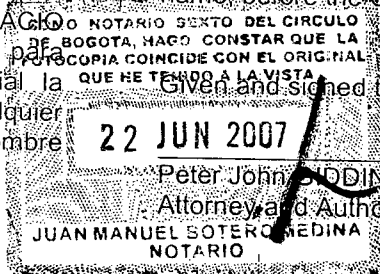
980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB
(formerly of 315 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0WG, GB)

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or 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 and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or 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 and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or 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.

- 8 MAY 2007



NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

TRADUCCIÓN OFICIAL

DE UNOS DOCUMENTOS ESCRITOS EN INGLÉS

**CERTIFICADOS DE LA OFICINA DE REGISTRO DE SOCIEDADES Y
FORMULARIOS**

Certificados de Constitución, de Constitución sobre Cambio de Denominación y Formularios Número 287 relacionados con el Cambio de Dirección del Domicilio Social, expedidos por la Oficina de Registro de Sociedades de Inglaterra y Gales con relación a la sociedad **DOMANTIS LIMITED**, documentos escritos en inglés.

Apostilla de Inglaterra (**DOMANTIS LIMITED**), documento escrito también en inglés.

EJECUCIÓN

Certificado Verificado y Autenticado
en la ciudad de Londres, Inglaterra
este día 13 de junio de 2007
(firma: James Kerr MILLIGAN)
Notario Público

Esta traducción se realizó a solicitud del interesado a los 19 días del mes de julio de 2007.

G. A. Forster

Gerhard Alexander Forster Moreno
C.C. No. 79.392.484 de Bogotá
Traductor e Intérprete Oficial
Alemán e Inglés

GERHARD ALEXANDER
FORSTER MORENO
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución 0622 - Minjusticia 1995

-- 0 --

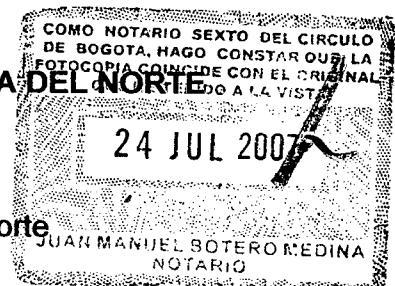
APOSTILLA

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

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Este documento público



G
GERHARD ALEXANDER
FORSTER MORENO
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución 0622 - Minjusticia 1995

2. Ha sido firmado por **James Kerr Milligan**

3. Actuando en su condición de **Notario Público**

4. Está provisto con el sello/estampilla de **Dicho Notario Público**

Certificado

5. en Londres

6. el 19 de junio de 2007

7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y de la Mancomunidad.

8. No. **H425847**

9. Estampilla: Sello redondo oficial: Oficina de Extranjería y Mancomunidad Londres (con escudo) y sello redondo oficial en altorrelieve

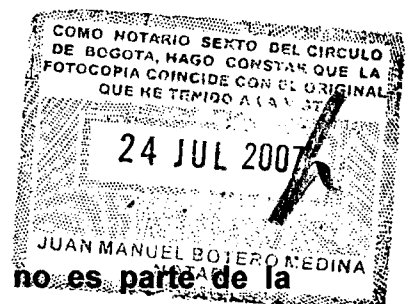
10. Firma: (fdo.) **R Shilton**

(fdo.) *ilegible*

Por el Secretario de Estado

Si este documento ha de ser usado en un país que no es parte de la

Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961, debiera ser presentado a



Gerhard Alexander Forster
GERHARD ALEXANDER FORSTER MORENO
Traductor e Interprete Oficial
Resolución 0622 - Minjusticia 1995

la sección consular de la misión que representa ese país. Una apostilla o certificado de legalización solamente confirma que la firma, sello o estampilla en el documento es genuina. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Extranjería & Mancomunidad apruebe los contenidos.

-- 0 --

COPIA DEL EXPEDIENTE

(Escudo Oficial)

**CERTIFICADO DE CONSTITUCIÓN
DE UNA SOCIEDAD LIMITADA PRIVADA**

Sociedad No. 3907643

El Registrador de Sociedades para Inglaterra y Gales certifica por este medio que MELLOWGIFT LIMITED

es constituida este día conforme a la Ley de Sociedades de 1985 como una sociedad privada y que la sociedad es limitada.

Dado en la Casa de Sociedades, Cardiff el 17 de enero de 2000

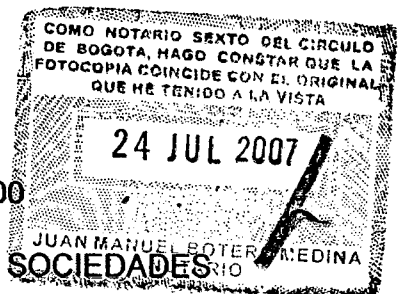
(Código de barras)

Sello ovalado: REGISTRADOR DE SOCIEDADES

N03907643J

PARA INGLATERRA Y GALES

EL SELLO OFICIAL DEL



GERHARD ALEXANDER
FORSTER MORENO
Traductor e Interpretre Oficial
Resolución 0622 - Minjusticia 1995

REGISTRADOR DE SOCIEDADES
CASA DE SOCIEDADES

-- 0 --

COPIA DEL EXPEDIENTE
(Escudo Oficial)
CERTIFICADO DE CONSTITUCIÓN
SOBRE CAMBIO DE DENOMINACIÓN

Sociedad No. 3907643

El Registrador de Sociedades para Inglaterra y Gales certifica por este medio
que MELLOWGIFT LIMITED

habiendo cambiado su denominación mediante resolución especial, está
constituida ahora bajo la denominación de
DIVERSYS LIMITED

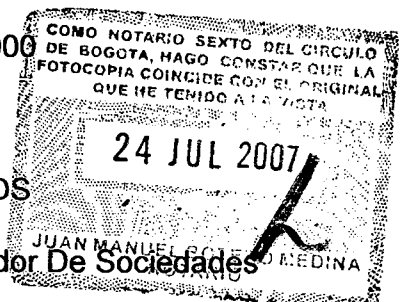
Dado en la Casa de Sociedades, Londres, el 21 de junio de 2006

(Código de barras) (fdo.) sello mecánico *N. Richards*

*C03907643K

Sr. N. RICHARDS

Por El Registrador De Sociedades



CASA DE SOCIEDADES

GERHARD ALEXANDER
FORSTER MORENO
Traductor e Interpretre Oficial
Resolución 0622 - Minjusticia 1995

COPIA DEL EXPEDIENTE
(Escudo Oficial)
CERTIFICADO DE CONSTITUCIÓN
SOBRE CAMBIO DE DENOMINACIÓN

Sociedad No. 3907643

El Registrador de Sociedades para Inglaterra y Gales certifica por este medio
que DIVERSYS LIMITED

habiendo cambiado su denominación mediante resolución especial, está
constituida ahora bajo la denominación de
DOMANTIS LIMITED

Dado en la Casa de Sociedades, Cardiff, el 29 de abril de 2002

(Código de barras)

Sello ovalado: REGISTRADOR DE SOCIEDADES

C03907643S

PARA INGLATERRA Y GALES

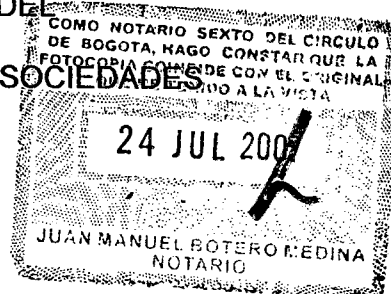
EL SELLO OFICIAL DEL

REGISTRADOR DE SOCIEDADES

CASA DE SOCIEDADES

-- para el registro --

-- 0 --



9
**GERHARD ALEXANDER
FORSTER MORENO**
Traductor e Interprete Oficial
Resolución 0622 - Minjusticia 1995

Casa de Sociedades

287

— para el registro —

Cambio en la situación o dirección del Domicilio Social Registrado

Número de la Sociedad 03907643

Denominación Completa de la Sociedad DOMANTIS LIMITED

Nueva situación del domicilio social registrado

NOTA: El cambio en la situación del domicilio social registrado no tiene efecto hasta que el Registrador hay registrado esta notificación.

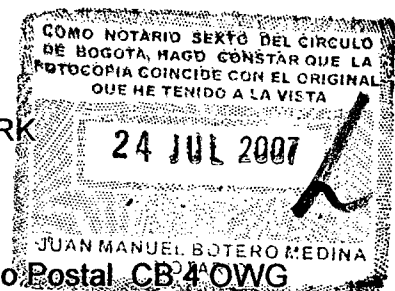
Por 14 días comenzando con la fecha en que es registrado un cambio del domicilio social registrado, una persona podrá notificar válidamente cualquier documento a la sociedad en su domicilio social anterior.

Los números de Apartado Aéreo solamente no son aceptables.

Dirección 315 CAMBRIDGE SCIENCE PARK

Localidad para Correo CAMBRIDGE

Condado / Región CAMBRIDGESHIRE



Código Postal CB40WG

GERHARD ALEXANDER
FORSTER MORENO
Traductor e Interprete Oficial
Resolución 0622 - Minjusticia 1995

Firmado (fdo.) ilegible Fecha 02/01/04
un director

IAN TOMLINSON

Tel. 01223 896705

Número DX Cambio de DX

Usted no tiene que suministrar información de contacto en la casilla enfrente,
pero si usted lo hace, esto le ayudará a la Casa de Sociedades para contactarlo
si hay una pregunta sobre el formato. La información de contacto que usted
suministre será visible para los buscadores del registro público.

(Código de barras)

A2EMDRIY

A55 0482

CASA DE SOCIEDADES 05/01/04

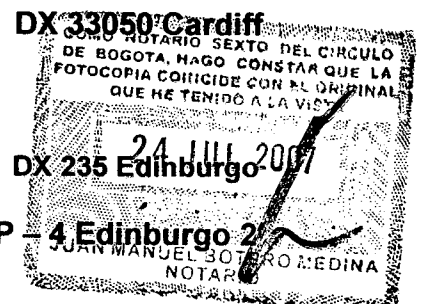
Cuando usted haya completado y firmado el formato envíelo por favor al
Registrador de Sociedades en:

Casa de Sociedades, Crown Way, Cardiff, CF 14 3 UZ

para sociedades registradas en Inglaterra y Gales

Casa de Sociedades, 37 Castle Terrace, Edinburgo, EH1 2EB

para sociedades registradas en Escocia



-- 0 --

Casa de Sociedades

287

GERHARD ALEXANDER
FORSTER MORENO
Traductor e Interprete Oficial
Resolución 0622 - Minjusticia 1995

– para el registro –

Cambio en la situación o dirección del Domicilio Social Registrado

Número de la Sociedad 03907643

Denominación Completa de la Sociedad Domantis Limited

Nueva situación del domicilio social registrado

NOTA: El cambio en la situación del domicilio social registrado no tiene efecto hasta que el Registrador hay registrado esta notificación.

Por 14 días comenzando con la fecha en que es registrado un cambio del domicilio social registrado, una persona podrá notificar válidamente cualquier documento a la sociedad en su domicilio social anterior.

Los números de Apartado Aéreo solamente no son aceptables.

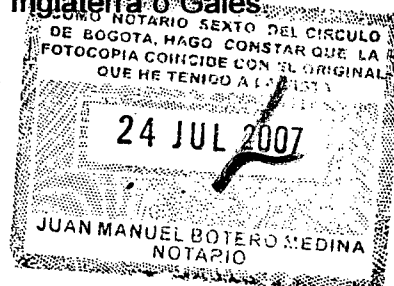
Para sociedades inglesas y galesas, la dirección debe ser en Inglaterra o Gales

Para sociedades escocesas, la dirección debe ser en Escocia

Dirección 980 Great West Road

Localidad para Correo Brentford

Condado / Región Middlesex Código Postal TW8 9GS



**GERHARD ALEXANDER
FORSTER MORENO**
Traductor e Interpreté Oficial
Resolución 0622 - Minjusticia 1995

Firmado (fdo.) ilegible Fecha 09 ENE 2007
un secretario

Secretariado Corporativo, GlaxoSmithKline plc
980 Great West Road, Brentford, Middlesex
TW8 9GS Tel. 01223 896705
Número DX Cambio de DX

Usted no tiene que suministrar información de contacto en la casilla enfrente,
pero si usted lo hace, esto le ayudará a la Casa de Sociedades para contactarlo
si hay una pregunta sobre el formato. La información de contacto que usted
suministre será visible para los buscadores del registro público.

JUEVES

(Código de barras)

ABXN8M43

A 41 11/01/2007 170

CASA DE SOCIEDADES

Cuando usted haya completado y firmado el formato envíelo por favor al

Registrador de Sociedades en:

Casa de Sociedades, Crown Way, Cardiff, CF 14 3 UZ

para sociedades registradas en Inglaterra y Gales

Casa de Sociedades, 37 Castle Terrace, Edinburgo, EH1 2EB

para sociedades registradas en Escocia



o LP - 4 Edinburgo 2

GERHARD ALEXANDER
FORSTER MORENO
Traductor e Interprete Oficial
Resolución 0622 - Minjusticia 1995

YO, el infrascrito, **James Kerr MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, debidamente admitido y juramentado por la Autoridad Real,

CERTIFICO Y DOY FE:

DE QUE he mandado que se hiciera una investigación del expediente mantenido en la Oficina del Registro de Sociedades para Inglaterra y Gales relativo a la Sociedad denominada **"DOMANTIS LIMITED"** y a raíz de la citada investigación, he comprobado:

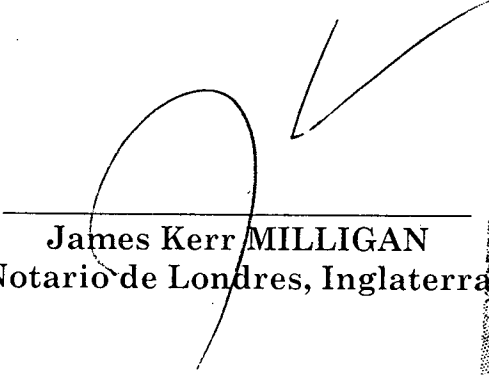
QUE "DOMANTIS LIMITED" es una Sociedad con su responsabilidad limitada, debidamente inscrita en dicho Registro con el número **3907643** y existente de acuerdo con las leyes de Inglaterra;

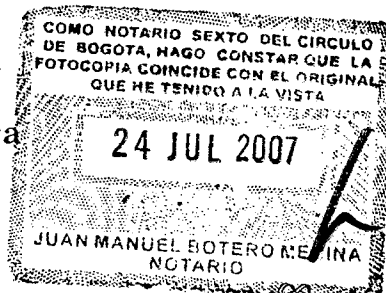
QUE la referida Sociedad fue constituida el día 17 de enero de 2000 bajo la denominación **"MELLOWGIFT LIMITED"**, la cual fue modificada el día 21 de junio de 2000 a **"DIVERSYS LIMITED"**, la cual fue modificada también el día 29 de abril de 2002 a la actual de **"DOMANTIS LIMITED"**;

QUE el Domicilio Social de la mencionada Sociedad se cambió de 315 Cambridge Science Park, Cambridge, Cambridgeshire CB4 0WG, Inglaterra, por el actual de 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS, Inglaterra, el día 11 de enero de 2007;

Y QUE los documentos fotostáticos adjuntos al presente son copias fieles y exactas del Certificado de Constitución, Certificados de Constitución sobre Cambio de Denominación y Formularios Número 287 relacionados con el Cambio de Dirección del Domicilio Social de dicha Sociedad extraídos del citado expediente.

Y PARA QUE CONSTE Y OBRE los efectos conducentes, expido la presente, que firmo y sello en Londres, Inglaterra, el día de hoy trece de junio de dos mil siete.


James Kerr MILLIGAN
Notario de Londres, Inglaterra



SCRIVEN
NOTARIES

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **James Kerr Milligan**
a été signé par

3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

5. at London/à Londres

6. the/le **19 June 2007**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **H425847**

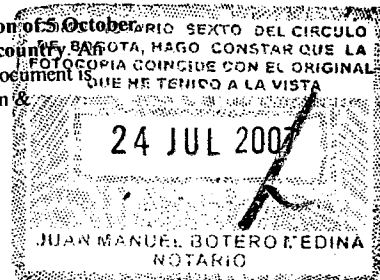
9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **R Shilton**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.



FILE COPY



**CERTIFICATE OF INCORPORATION
OF A PRIVATE LIMITED COMPANY**

Company No. 3907643

The Registrar of Companies for England and Wales hereby certifies that
MELLOWGIFT LIMITED

is this day incorporated under the Companies Act 1985 as a private
company and that the company is limited.

Given at Companies House, Cardiff, the 17th January 2000



N03907643J



COMPANIES HOUSE

FILE COPY



**CERTIFICATE OF INCORPORATION
ON CHANGE OF NAME**

Company No. 3907643

The Registrar of Companies for England and Wales hereby certifies that

MELLOWGIFT LIMITED

having by special resolution changed its name, is now incorporated
under the name of

DIVERSYS LIMITED

Given at Companies House, London, the 21st June 2000



C03907643R

N. Richards.

MR. N. RICHARDS

For The Registrar Of Companies



COMPANIES HOUSE

FILE COPY



**CERTIFICATE OF INCORPORATION
ON CHANGE OF NAME**

Company No. 3907643

The Registrar of Companies for England and Wales hereby certifies that
DIVERSYS LIMITED

having by special resolution changed its name, is now incorporated
under the name of
DOMANTIS LIMITED

Given at Companies House, Cardiff, the 29th April 2002



C03907643S



Companies House
— for the record —



HC006B

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 39/395	
(22) Fecha de solicitud: 20-09-07		(71) Solicitante(s) DOMANTIS LIMITED; CASSONE, ANTONIO Y DE BERNARDIS, FLAVIA	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0505489.5	18-03-05	GB
	0519883.3	29-09-05	GB
		(72) Inventor(es) CASSONE, Antonio; DE BERNARDIS, Flavia; GRANT, Steven y LIU, Haiqun	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 18-10-07		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 21/09/06
	Fecha de presentación de la solicitud: 10/03/06		N° publicación: WO 2006/097689 A3
	No. de solicitud PCT/GB2006/000843		
(54) Titulo: "ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS DE CANDIDA"			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual se enlaza con una proteasa aspártica secretora (Sap) de *Candida spp.*.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente P022623WO	PARA FUTURAS ACCIONES ver (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/GB2006/000843	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 10/03/2006	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 18/03/2005
Solicitante DOMANTIS LIMITED		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 11 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según:

☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó.

☐ una traducción de la solicitud internacional en ----- el cual es el lenguaje de la traducción proporcionada para los propósitos de la Búsqueda Internacional (Reglas 12.3 (a) y 23.1(b)).

b. ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleótido y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Casilla No. 1.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla II).

3. ☒ Falta unidad de invención (ver Casilla III).

4. Respecto al título,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☒ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lea así:

ANTICUERPOS CONTRA ANFÍGENOS DE CANDIDA

5. Respecto al resumen,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☒ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo sugirió la Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo sugirió la Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☒ Ninguna de las figuras se publicará con el resumen.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2006/000843

Casilla No. I. Nucleótido y/o secuencia(s) aminoácida(s) (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Respecto a cualquier **nucleótido y/o secuencia aminoácida** revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador
☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda.

2. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/GB2006/000843

A. CLASIFICACION DE MATERIA INV.. C07K16/14 C07K16/40 A61K39/395 A61P31/10 ADD. C07K16/46 Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI		
B. CAMPOS BUSCADOS Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación) C07K A61K A61P Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados) EPO-Interno, Búsqueda de Secuencias, BIOSIS, WPI Dato		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	DE BERNARDIS F ET AL: "Rol protector de los anticuerpos antimananos y anti-aspártil proteinasa en un modelo experimental de Candida albicans vaginitis en ratas" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, Vol. 65, no. 8, Agosto 1997 (1997-08), Páginas 3399-3405, XP002373565 ISSN: 0019-9567 El documento completo -----	1-67, 72-74
X	WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; HOLT) 8 de Enero de 2004 (2004-01-08) Ejemplo 12; secuencias 2, 9 -/---	9, 10, 13, 21, 22, 25, 27, 52-56, 72-74
☒ En el recuadro C se enumeran más documentos. ☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.		
° Categorías especiales de documentos citados: 'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular 'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional 'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica) 'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada 'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención 'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo 'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica '&' documento miembro de la misma familia de patentes		
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 1 de Diciembre de 2006		Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 15/12/2006
Nombre y dirección de correo de ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Tx 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado Luyten, Kattie

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2006/000843

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
	& DATABASE EPO Proteins [Online] 2 de Marzo de 2004 (2004-03-02), "Secuencia 2 de la patente WO2004003019." Recuperado de la adquisición EBI no. EPOB: CQ761109 Acceso a la base de datos no. CQ761109 & DATABASE Geneseq [Online] 20 de Mayo de 2004 (2004-05-20), "Proteína HEL4 relacionada con el anticuerpo de dominio simple (dAb)" Recuperado de la adquisición EBI no. GSN: ADL92389 Acceso a la base de datos no. ADL92389 & DATABASE EPO Proteins [Online] 2 de Marzo de 2004 (2004-03-02), "Secuencia 9 de la patente WO2004003019." Recuperado de la adquisición EBI no. EPOB: CQ761116 Acceso a la base de datos no. CQ761116 & DATABASE Geneseq [Online] 20 de Mayo de 2004 (2004-05-20), "Proteína TAR2-10 relacionada con el anticuerpo de dominio simple (dAb)" Recuperado de la adquisición EBI no. GSN: ADL92395 Acceso a la base de datos no. ADL92395	
X	----- WO 2004/081026 A (DOMANTIS LIMITED; BASRAN, AMRIK) 23 de September de 2004 (2004-09-23) citado en la solicitud El documento completo & DATABASE Geneseq [Online] 16 de Diciembre de 2004 (2004-12-16), "VH dAB HEL4, SEQ ID 5." Recuperado de la adquisición EBI no. GSN: ADS78332 Acceso a la base de datos no. ADS78332	9, 10, 13, 21, 22, 25, 27, 52-56, 72-74
X	----- HAN YONGMOON ET AL: "Protección contra candidiasis mediante un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina G3 (IgG3) específico para la misma manotriosa como un anticuerpo protector IgM" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, Vol. 68, no. 3, Marzo de 2000 (2000-03), Páginas 1649-1654, XP002196711 ISSN: 0019-9567	47-51, 57
A	El documento completo ----- ---/--	52-56

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/GB2006/000843

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	ELS CONRATH K ET AL: "Anticuerpos de dominio simple de camello como unidades de construcción modular en constructos de anticuerpos biespecíficos y bivalentes" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US Vol. 276, no. 10, 9 de Marzo de 2001 (2001-03-09), páginas 7346-7350, XP002248402 ISSN: 0021-9258 El documento completo -----	52-56
X	NAGLIK JULIAN R ET AL"Aspartil proteinasas secretadas por Candida albicans en virulencia y patogénesis" MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, Vol. 67, no. 3, Septiembre de 2003 (2003-09) Páginas 400-428, XP002399716 ISSN: 1092-2172 Citado en la solicitud El documento completo ----	52-56
P, X	BARTOLINI S, SANDINI S, LA VALLE R, DE BERNARDIS F, CASSONE A, LIU H, GRANT S, O'MAHONY R: "Anticuerpos de dominio humano hipervariable que reconocen rasgos de virulencia de Candida albicans y confieren protección pasiva contra candidiasis vaginal experimental" PROGRESS REPORT QUINTO PROGRAMA NAZIONALE DI RICERCA SULL'AIDS [Online] 2 de Mayo de 2005 (2005-05-02), página 198, XP002399717 Instituto Superiore di Sanità, Rome, Italy ISSN: 0393-5620 Recuperado de internet: URL:www.unicri.it/wwk/publications/dacp/legislation/aids/sis%202005%2012%20iss%20progress%20report.pdf [recuperado el 2006-09-15] página 198 -----	1-67, 72-74
P, X	CASSONE A ET AL: " Un perfil del papel de anticuerpos anti-cándida dentro del contexto de inmunización pasiva y protección de candidiasis" CURRENT MOLECULAR MEDICINE, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, GB, Vol. 5, no. 4, 2005, páginas 377-382, XP008068859 ISSN: 1566-5240 El documento completo ----- ----/--	1-67, 72-74

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/GB2006/000843

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	HOLT L J ET AL: “Anticuerpos de dominio: Proteínas para terapia” TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, Vol. 21, no. 11, Noviembre de 2003 (2003-11), Páginas 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 El documento completo -----	1-67, 72-74
A	GOMEZ M J ET AL: “Purificación y caracterización bioquímica de una manoproteína de 65 kilodaltons (MP65), un objetivo principal de la respuesta inmune en humanos mediada por células anticándida” INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, Vol. 64, no. 7, Julio de 1996 (1996-07), páginas 2577-2584, XP002917387 ISSN: 0019-9567 Página 2578, columna a mano izquierda, párrafo 9 -----	14-67, 72-74
A	CASSONE A ET AL: “Producción y caracterización de un anticuerpo monoclonal a una glucomanoproteína de superficie celular constituyente de candida-albicans y otras especies patogénicas de candida” JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY, HARLOW, GB, Vol. 27, no. 4, 1998, páginas 233-238, XP008061983 ISSN: 0022-2615 El documento completo -----	14-67, 72-74

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/GB2006/000843

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 2 de la primera hoja)	
Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones: 1. ☒ Reivindicaciones Nos.: porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber: Aunque las reivindicaciones 28, 30-41, 46-51 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición. 2. ☒ Reivindicaciones Nos.: 68-71 porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente: Ver INFORMACION ADICIONAL hoja PCT/ISA/210 3. ☐ Reivindicaciones No.: porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).	
Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 3 de la primera hoja)	
Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así: ver hoja adicional 1. ☒ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables. 2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales. 3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.: 4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.: Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante. ☒ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.	

INFORMACION ADICIONAL CONTINUADA DE PCT/ISA/ 210

Continuación de la Casilla Box II.1

Aunque las reivindicaciones 28, 30-41 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, se ha llevado a cabo la búsqueda y con base en los supuestos efectos del compuesto/composición.

Continuación de la Casilla Box II.2

Reivindicaciones Nos.: 68-71

Las presentes reivindicaciones 68-71 se relacionan con secuencias no reveladas en la solicitud según se presentó originalmente (SEQ ID Nos: 345, 420, 423, 430, 432, 438, 441).

Como resultado, la solicitud no cumple con el requerimiento de claridad bajo el Artículo 6 PCT y revelación bajo el Artículo 5 PCT. La falta de claridad y revelación es hasta tal punto que no es posible una búsqueda significativa, por lo tanto, las reivindicaciones 68-71 no se han buscado.

Se atrae la atención del solicitante al hecho de que las reivindicaciones relacionadas con invenciones respecto de las cuales no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional no tienen que ser el objeto de un examen preliminar internacional (Regla 66.1(e) PCT). Se le notifica al solicitante que la política de la EPO al actuar como una Autoridad de Examen Preliminar Internacional normalmente es no llevar a cabo un examen preliminar sobre asuntos que no se han buscado. Este es el caso prescindiendo de si las reivindicaciones se han modificado después del recibo del reporte de búsqueda o durante un procedimiento del Capítulo II. Si la solicitud procede a la fase regional ante la EPO, se le recuerda al solicitante que puede llevarse a cabo una búsqueda durante el examen ante la EPO (ver Lineamiento C-VI, 8.5 de la EPO), si los problemas que llevaron a la declaración del Artículo 17(2) se superan.

INFORMACION ADICIONAL CONTINUADA DE PCT/ISA/ 210

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional, así:

1. reivindicaciones: 1-13 (todas completamente); 25-67, 72-74 (todas parcialmente)

Un anticuerpo de dominio simple (dAb) que se une a una proteasa secretoria (Sap) de *Candida* spp., una composición que comprende un dAb multimérico que comprende un anticuerpo de dominio simple Sap anti-*Candida* unido a un anticuerpo de dominio simple MP anti-*Candida* y el uso de dichos anticuerpos/composiciones en la profilaxis y/o tratamiento de infecciones *Candida* spp.

2. reivindicaciones: 14-24 (todas completamente); 25-67, 72-74 (todas parcialmente)

Un anticuerpo de dominio simple (dAb) que se une a una adhesina de manoproteína (MP) de *Candida* spp., una composición que comprende un dAb multimérico que comprende un anticuerpo de dominio simple MP anti-*Candida* unido a un anticuerpo de dominio simple Sap anti-*Candida* y el uso de dichos anticuerpos/composiciones en la profilaxis y/o tratamiento de infecciones *Candida* spp.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
 Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
 PCT/GB2006/000843

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 2004003019 A	08-01-2004	AT 328906 T	15-06-2006
		CA 2492092 A1	08-01-2004
		CN 1678634 A	05-10-2005
		DK 1517921 T3	09-10-2006
		EP 1517921 A2	30-03-2005
		JP 2006512895 T	20-04-2006
		PT 1517921 T	29-09-2006
WO 2004081026 A	23-09-2004	CA 2529819 A1	23-09-2004
		EP 1639011 A2	29-03-2006

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P022623WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/GB2006/000843	International filing date (day/month/year) 10/03/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 18/03/2005
Applicant DOMANTIS LIMITED		

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 11 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. ☒ 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:

ANTIBODIES AGAINST CANDIDA ANTIGENS

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(b), 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. _____
☐ 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/GB2006/000843

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b 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. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in electronic form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the 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/GB2006/000843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K16/14 C07K16/40 A61K39/395 A61P31/10
 ADD. C07K16/46

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 A61K A61P

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE BERNARDIS F ET AL: "Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of Candida albicans vaginitis in rats" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 65, no. 8, August 1997 (1997-08), pages 3399-3405, XP002373565 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-67, 72-74
X	WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; HOLT) 8 January 2004 (2004-01-08) example 12; sequences 2,9 -/--	9,10,13, 21,22, 25,27, 52-56, 72-74

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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 document 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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 2006

Date of mailing of the international search report

15/12/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luyten, Kattie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2006/000843

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& DATABASE EPO Proteins [Online] 2 March 2004 (2004-03-02), "Sequence 2 from Patent W02004003019." retrieved from EBI accession no. EPOP:CQ761109 Database accession no. CQ761109 & DATABASE Geneseq [Online] 20 May 2004 (2004-05-20), "Single domain antibody (dAb)-related HEL4 protein." retrieved from EBI accession no. GSN:ADL92389 Database accession no. ADL92389 & DATABASE EPO Proteins [Online] 2 March 2004 (2004-03-02), "Sequence 9 from Patent W02004003019." retrieved from EBI accession no. EPOP:CQ761116 Database accession no. CQ761116 & DATABASE Geneseq [Online] 20 May 2004 (2004-05-20), "Single domain antibody (dAb)-related TAR2-10 protein." retrieved from EBI accession no. GSN:ADL92395 Database accession no. ADL92395 ----- X WO 2004/081026 A (DOMANTIS LIMITED; BASRAN, AMRIK) 23 September 2004 (2004-09-23) cited in the application the whole document & DATABASE Geneseq [Online] 16 December 2004 (2004-12-16), "VH dAB HEL4, SEQ ID 5." retrieved from EBI accession no. GSN:ADS78332 Database accession no. ADS78332 ----- X HAN YONGMOON ET AL: "Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 68, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 1649-1654, XP002196711 ISSN: 0019-9567 A the whole document ----- -/--	9,10,13, 21,22, 25,27, 52-56, 72-74 47-51,57 52-56

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2006/000843

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ELS CONRATH K ET AL: "Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 276, no. 10, 9 March 2001 (2001-03-09), pages 7346-7350, XP002248402 ISSN: 0021-9258 the whole document	52-56
X	NAGLIK JULIAN R ET AL: "Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis." MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, vol. 67, no. 3, September 2003 (2003-09), pages 400-428, XP002399716 ISSN: 1092-2172 cited in the application the whole document	52-56
P,X	BARTOLINI S, SANDINI S, LA VALLE R, DE BERNARDIS F, CASSONE A, LIU H, GRANT S, O'MAHONY R: "Human hypervariable antibody domains recognizing virulence traits of Candida albicans confer passive protection against experimental vaginal candidiasis." PROGRESS REPORT QUINTO PROGRAMMA NAZIONALE DI RICERCA SULL'AIDS, [Online] 2 May 2005 (2005-05-02), page 198, XP002399717 Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy ISSN: 0393-5620 Retrieved from the Internet: URL:www.unicri.it/wwk/publications/dacp/legislation/aids/sis%202005%2012%20iss%20progress%20report.pdf> [retrieved on 2006-09-15] page 198	1-67, 72-74
P,X	CASSONE A ET AL: "AN OUTLINE OF THE ROLE OF ANTI-CANDIDA ANTIBODIES WITHIN THE CONTEXT OF PASSIVE IMMUNIZATION AND PROTECTION FROM CANDIDIASIS" CURRENT MOLECULAR MEDICINE, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, GB, vol. 5, no. 4, 2005, pages 377-382, XP008068859 ISSN: 1566-5240 the whole document	1-67, 72-74
	----- -/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 3 of 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2006/000843

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 the whole document	1-67, 72-74
A	----- GOMEZ M J ET AL: "PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A 65-KILODALTON MANNOPROTEIN (MP65), A MAIN TARGET OF ANTI-CANDIDA CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSES IN HUMANS" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 64, no. 7, July 1996 (1996-07), pages 2577-2584, XP002917387 ISSN: 0019-9567 page 2578, left-hand column, paragraph 9	14-67, 72-74
A	----- CASSONE A ET AL: "PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF A MONOCLONAL ANTIBODY TO A CELL-SURFACE GLUCOMANNOPROTEIN CONSTITUENT OF CANDIDA-ALBICANS AND OTHER PATHOGENIC CANDIDA-SPECIES" JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY, HARLOW, GB, vol. 27, no. 4, 1988, pages 233-238, XP008061983 ISSN: 0022-2615 the whole document	14-67, 72-74

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2006/000843

Box 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:

Although claims 28, 30-41 and 46-51 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 68-71
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 28, 30-41 and 46-51 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 68-71

Present claims 68-71 relate to sequences not disclosed in the application as originally filed (SEQ ID NOs: 345, 420, 423, 430, 432, 438, 441).

As a result, the application does not comply with the requirement of clarity under Article 6 PCT and disclosure under Article 5 PCT. The lack of clarity and disclosure is to such an extent that no meaningful search is possible, thus claims 68-71 have not been searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-13 (all completely); 25-67, 72-74 (all partially)

A single domain antibody (dAb) which binds to a secretory protease (Sap) from Candida spp., a composition comprising a multimeric dAb comprising an anti-Candida Sap single domain antibody linked to an anti-Candida MP single domain antibody and the use of said antibodies/compositions in the prophylaxis and/or treatment of Candida spp. infections.

2. claims: 14-24 (all completely); 25-67, 72-74 (all partially)

A single domain antibody (dAb) which binds to mannoprotein adhesin (MP) from Candida spp., a composition comprising a multimeric dAb comprising an anti-Candida MP single domain antibody linked to an anti-Candida Sap single domain antibody and the use of said antibodies/compositions in the prophylaxis and/or treatment of Candida spp. infections.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2006/000843

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004003019 A	08-01-2004	AT 328906 T	15-06-2006
		CA 2492092 A1	08-01-2004
		CN 1678634 A	05-10-2005
		DK 1517921 T3	09-10-2006
		EP 1517921 A2	30-03-2005
		JP 2006512895 T	20-04-2006
		PT 1517921 T	29-09-2006
WO 2004081026 A	23-09-2004	CA 2529819 A1	23-09-2004
		EP 1639011 A2	29-03-2006

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

21 de Septiembre de 2006 (21.09.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2006/097689 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷,
C07K 16/14 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(74) Agentes: SOAMES, Candida, Jane et al.; D Young & Co, 120 Holborn, London EC1N 2DY (GB).

(21) Número de Solicitud Internacional:

PCT/GB2006/000843

(22) Fecha de Registro Internacional: 10 de Marzo de 2006 (10.03.2006)

(81) Estados Designados (A menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección Nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de registro:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(84) Estados Designados (regionales): (A menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección Regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiatica (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Información de Prioridad:

0505489.5 18 de Marzo de 2005 (18.03.2005) GB
0519883.3 29 de Septiembre de 2005 (29.09.2005) GB

Declaraciones según la Regla 4.17:

- relativo a la calidad de inventor (Regla 4.17 (iv))

(71) Solicitante: (Para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): DOMANTIS LIMITED [GB/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB).

Publicado:

- con reporte de búsqueda internacional

(72) Solicitantes e

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda Internacional:

15 de Marzo de 2007

(75) Inventores: CASSONE, Antonio [IT/IT]; Department of Infectious Parasitic and Immune-mediated Diseases, Instituto Superiore di Sanita (National Health Institute), Viale Regina Elena, 299, I-00161 Rome (IT).
DE BERNARDIS, Flavia [IT/IT]; Department of Infectious Parasitic and Immune-mediated Diseases, Instituto Superiore di Sanita (National Health Institute), Viale Regina Elena, 299, I-00161 Rome (IT).

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(72) Inventores e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): GRANT, Steven [GB/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB). LIU, Haiqun [CN/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB).

(54) Título: "ANTICUERPOS CONTRA ANFÍGENOS DE CANDIDA"

(57) Resumen: Se proporcionan anticuerpos de dominio. En particular, anticuerpos de dominio (dAbs) que reconocen rasgos de virulencia de *Candida spp.* y que confieren una protección pasiva contra candidiasis.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 September 2006 (21.09.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/097689 A3

(51) International Patent Classification:

C07K 16/14 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
→ A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/GB2006/000843

(22) International Filing Date: 10 March 2006 (10.03.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

0505489.5 18 March 2005 (18.03.2005) GB
0519883.3 29 September 2005 (29.09.2005) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): **DOMANTIS LIMITED** [GB/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB).

(72) Applicants and

(72) Inventors: **CASSONE, Antonio** [IT/IT]; Department of Infectious Parasitic and Immune-mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanita (National Health Institute), Viale Regina Elena, 299, I-00161 Rome (IT). **DE BERNARDIS, Flavia** [IT/IT]; Department of Infectious Parasitic and Immune-mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanita (National Health Institute), Viale Regina Elena, 299, I-00161 Rome (IT).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **GRANT, Steven** [GB/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB). **LIU, Haiqun** [CN/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB).

(74) Agents: **SOAMES, Candida, Jane et al.**; D Young & Co, 120 Holborn, London EC1N 2DY (GB).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
15 March 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: **ANTIBODIES AGAINST CANDIDA ANTIGENS**

(57) Abstract: Provision of domain antibodies. In particular, domain antibodies (dAbs) that recognize virulence traits of *Candida* spp. and confer passive protection against candidiasis.

WO 2006/097689 A3

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

NOTIFICACION DEL REGISTRO
DE UN CAMBIO

(Regla 92 bis. 1 del PCT e
Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Fecha de envío por correo (día/mes/año)
25 de Agosto de 2006 (25.08.2006)

Archivo de referencia del solicitante o agente
P022623WO

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2006/000843

Para:

SOAMES, Candida, Jane
D Young & Co
120 Holborn
London EC1N 2DY
ROYAUME-UNI

NOTIFICACION IMPORTANTE

Fecha de registro internacional (día/mes/año)
10 de Marzo de 2006 (10.03.2006)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante ☒ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y Dirección
CASSONE, Antonio
DE BERNARDIS, Flavia

País de Nacionalidad

País de Residencia

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☐ la persona ☐ el nombre ☐ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y Dirección

País de Nacionalidad

País de Residencia

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☐ la Oficina que recibe ☐ las Oficinas designadas relacionadas
☒ la Autoridad de Búsqueda Internacional ☐ las Oficinas seleccionadas relacionadas
☐ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ☐ otros:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsímile No.: +41 22 338 82 70

Funcionario autorizado

Martin Jean-Luc

Facsímile No. +41 22 338 87 40

Teléfono No. +41 22 338 98 87

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SOAMES, Candida, Jane
D Young & Co
120 Holborn
London EC1N 2DY
ROYAUME-UNI

Date of mailing (day/month/year) 25 August 2006 (25.08.2006)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P022623WO	
International application No. PCT/GB2006/000843	International filing date (day/month/year) 10 March 2006 (10.03.2006)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address CASSONE, Antonio DE BERNARDIS, Flavia	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
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	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: The status of the persons listed in Box 1 has been changed to applicant and inventor for all designated States.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☐ the receiving Office	☐ the designated Offices concerned	
☒ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned	
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Martin Jean-Luc
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Facsimile No. +41 22 338 87 40 Telephone No. +41 22 338 98 87

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

**NOTIFICACION DEL REGISTRO
DE UN CAMBIO**

(Regla 92 bis. 1 del PCT e
Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Fecha de envío por correo (día/mes/año)
19 de Mayo de 2006 (19.05.2006)

Archivo de referencia del solicitante o agente
P022623WO

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2006/000843

Para:

SOAMES, Candida, Jane
D Young & Co
120 Holborn
London EC1N 2DY
REINO UNIDO

NOTIFICACION IMPORTANTE

Fecha de registro internacional (día/mes/año)
10 de Marzo de 2006 (10.03.2006)

2. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante ☒ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y Dirección

País de Nacionalidad
IT

País de Residencia
IT

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☐ la persona ☐ el nombre ☐ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y Dirección

DE BERNARDIS, Flavia
Department Of Infectious Paracitic
And immune-
Mediated Diseases
Istituto Superiore di Sanita
(National Health Institute)
Viale Regina Elena, 299, 00161
Roma
Italia

País de Nacionalidad
IT

País de Residencia
IT

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

La persona que se muestra en la casilla II ha sido adicionada como solicitante e inventor para Estados Unidos de América solamente,

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina que recibe ☐ las Oficinas designadas relacionadas
☒ la Autoridad de Búsqueda Interncional ☐ las Oficinas seleccionadas relacionadas
☐ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ☐ otros:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsímile No.: +41 22 338 87 40

Funcionario autorizado

Kishan SINGH RAM

Teléfono No. (41-22) 338 8460

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

30 MAY 2006

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:	MONEY
	ORDER
	DIARY
SOAMES, BEYDida, Jane	30 MAY 2006
D Young & SON	Records Noted
120 Holborn	
London EC1A 1HT	
United Kingdom	
ENTRY	
FOR	DS CJS

Date of mailing (day/month/year) 19 May 2006 (19.05.2006)	IMPORTANT NOTIFICATION	
Applicant's or agent's file reference P022623WO	International filing date (day/month/year) 10 March 2006 (10.03.2006)	
1. The following indications appeared on record concerning: ☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality IT	State of Residence IT
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
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	State of Nationality IT	State of Residence IT
DE BERNARDIS, Flavia Department Of Infectious Parasitic and Immune- mediated Diseases Istituto Superiore di Sanita (National Health Institute) Viale Regina Elena, 299, 00161 Rome Italy	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: The person shown in Box II has been added as applicant and inventor for US only.		
4. A copy of this notification has been sent to: ☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned ☒ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned ☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:		
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.87.40		Authorized officer Kishan SINGH RAM Telephone No. (41-22) 338 8450

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para:

Ver forma PCT/ISA/220

PCT

OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Regla 43bis.1)

Fecha de envío por correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)																										
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220	PARA FUTURAS ACCIONES Ver párrafo 2 a continuación																									
Solicitud Internacional No. PCT/GB2006/000843	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 10.03.2006	Fecha de prioridad (día/mes/año) 18.03.2005																								
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC INV. C07K16/14 C07K16/40 A61K39/395 A61P31/10 ADD. C07K16/46																										
Solicitante DOMANTIS LIMITED																										
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table><tr><td>☒</td><td>Casilla No. I</td><td>Bases de la opinión</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. II</td><td>Prioridad</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. III</td><td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. IV</td><td>Falta de unidad de invención</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. V</td><td>Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. VI</td><td>Ciertos documentos citados</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. VII</td><td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. VIII</td><td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td></tr></table> 2. ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional. Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220. 3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.			☒	Casilla No. I	Bases de la opinión	☒	Casilla No. II	Prioridad	☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial	☒	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación	☒	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☒	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☒	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
☒	Casilla No. I	Bases de la opinión																								
☒	Casilla No. II	Prioridad																								
☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial																								
☒	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																								
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación																								
☒	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																								
☒	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																								
☒	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																								
Nombre y dirección de correo de la ISA European Patent Office- P.B. 5818 patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk- Pays Bas Tel. +31 70 340-2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340-3016	Fecha de Terminación de esta opinión Ver forma PCT/ISA/210	Funcionario Autorizado Luyten, Kattie Teléfono +31 70 340-8924																								

Casilla No. I. Bases de la opinión

1. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según:

- ☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó.
- ☐ una traducción de la solicitud internacional en ----- el cual es el lenguaje de la traducción proporcionada para los propósitos de la Búsqueda Internacional (Reglas 12.3 (a) y 23.1(b)).

2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencia
- ☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☒ en formato escrito
- ☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró.
- ☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
- ☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..

3. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

4. Comentarios adicionales:

Casilla No. II Prioridad

1. ☒ La validez de la reivindicación de prioridad no se ha considerado porque la Autoridad de búsqueda Internacional no tiene en su posesión una copia de la solicitud anterior cuya prioridad ha sido reivindicada, ó cuando se requiera , una traducción de la solicitud anterior. Sin embargo, esta opinión se ha establecido en el supuesto que la fecha relevante (Reglas 43bis 1 y 64.1) es la fecha de prioridad reivindicada.

2. ☐ Se ha establecido esta opinión como si no se hubiese reivindicado ninguna prioridad debido al hecho de que se ha encontrado que la reivindicación de prioridad es inválida (Reglas 43bis.1 y 64.1). Por consiguiente, para los fines de esta opinión, se considera que la fecha de registro internacional indicada anteriormente es la fecha relevante.

3. Observaciones adicionales, si es necesario:

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un paso inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 68-71 (todas completamente); 9-10,13, 21-22, 24-25, 27-45, 47-67 y 72-74 (todas parcialmente); 28, 30-41 y 46-51 (con respecto a la aplicabilidad industrial)

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 28, 30-41 y 46-51 (con respecto a la aplicabilidad industrial) se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere una búsqueda internacional (*especifique*):
ver hoja separada

- ☒ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. 9-10, 13, 21-22, 24-25, 27-45, 47-67 y 72-74 (todas parcialmente) son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*)
ver hoja separada

- ☒ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. 9-10, 13, 21-22, 24-25, 27-45, 47-67 y 72-74 (todas parcialmente) son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*)
ver hoja separada

- ☒ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos. 68-71 (todas completamente)

- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin el listado de secuencia, el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:

☐ suministró un listado de secuencias en papel para cumplir con el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicho listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.

☐ suministró un listado de secuencias en formato electrónico para cumplir en el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas y tal listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de búsqueda de forma y manera aceptable para ésta.

☐ pagó la tarifa de suministro tardío para el suministro de un listado de secuencia en respuesta a una invitación de acuerdo con las Reglas 13ter.1(a) o (b).

- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con los listados de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no suministró dichas tablas en formato electrónico para cumplir con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas y dichas tablas no estuvieron disponibles para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.

- ☐ las tablas que se relacionan con el listado de secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos, si están solamente en formato electrónico, no cumplen con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

- ☐ Ver hoja separada para detalles adicionales

Casilla No. IV Falta de unidad de invención

1. ☒ En respuesta a la invitación (Forma PCT/ISA/206) para pagar derechos adicionales, el solicitante ha:
- ☒ pagado derechos adicionales.
 - ☐ pagado derechos adicionales bajo protesta y donde se aplique, los derechos de protesta
 - ☐ pagado derechos adicionales bajo protesta pero los derechos de protesta aplicables no se pagaron
 - ☐ no pagado derechos adicionales.
2. ☐ Esta Autoridad encontró que el requisito de unidad de invención no se ha cumplido y escogió no invitar al solicitante para que pague derechos adicionales.
3. Esta Autoridad considera que el requisito de unidad de invención de acuerdo con las Reglas 13.1, 13.2 y 13.3 es
- ☐ se ha cumplido.
 - ☒ no se ha cumplido por las siguientes razones:
ver hoja separada
4. Por consiguiente, esta opinión ha sido establecida con respecto a las siguientes partes de la solicitud internacional:
- ☒ todas las partes.
 - ☐ las partes que se relacionan con las reivindicaciones Nos.

Casilla No. V. Afirmación razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración
- | | |
|-------------------------------|---|
| Novedad (N) | Si: Reivindicaciones 1-8, 11-12, 14-20, 23-24, 26, 28-45, 57-67 |
| | No: Reivindicaciones 9-10, 13, 21-22, 25, 27, 46-56, 72-74 |
| Nivel Inventivo (IS) | Si: Reivindicaciones |
| | No: Reivindicaciones 1-67, 72-74 |
| Aplicabilidad Industrial (IA) | Si: Reivindicaciones 1-27, 29, 42-45, 52-67, 72-74 |
| | No: Reivindicaciones |
2. Citaciones y explicaciones
- ver hoja separada

Casilla No. VI Ciertos documentos citados

1. Ciertos documentos publicados (Reglas 43bis.1 y 70.10)
y/o
2. Revelaciones no escritas (Reglas 43bis.1 y 70.9)
ver forma 210

Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional

Se notaron los siguientes defectos en la forma o contenido de la solicitud internacional:
ver hoja separada

Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

Se hicieron las siguientes observaciones sobre la claridad de las reivindicaciones, descripción, y dibujos o sobre la cuestión si las reivindicaciones están completamente soportadas por la descripción:
ver hoja separada

SECCION III

Las presentes reivindicaciones 68-71 (todas completamente) y 72-74 (parcialmente) se relacionan con secuencias no reveladas en la solicitud según se presentó originalmente (SEQ ID NOs: 345, 420, 423, 430, 432, 438, 441). Como resultado, la solicitud no cumple con el requerimiento de claridad bajo el Artículo 6 PCT y revelación bajo el Artículo 5 PCT. La falta de claridad y revelación es hasta tal punto que no es posible ninguna búsqueda significativa, así las reivindicaciones 68-71 no han sido buscadas. La reivindicación 72 fue buscada en cuanto se refiere a las reivindicaciones 1-27, 29 52-56 y 58-67. Se ha interpretado que las reivindicaciones 73 y 74 se refieren a la reivindicación 72 en lugar de a la reivindicación 71, y por lo tanto fueron buscadas parcialmente.

Las presentes reivindicaciones 9-10, 13, 21-22, 24-25, 27-45, 47-57 y 72-74 se relacionan con anticuerpos que tienen una propiedad o efecto deseado dado, es decir "inhibe la actividad funcional de una proteasa aspártica secretoria/Sap2" y/o "inhibe la actividad funcional de la adhesina de la manoproteína/MP65". Sin embargo, no hay ningún indicio en cuanto a qué une el anticuerpo. Las actividades reivindicadas pueden lograrse por otros medios fuera de unión directa del anticuerpo a la proteasa aspártica secretoria (Sap) o adhesina de la manoproteína (MP), así que es posible comparar los anticuerpos reivindicados con anticuerpos de la técnica anterior. Por lo tanto, a dichas reivindicaciones les falta claridad de conformidad con el Artículo 6 PCT. La búsqueda de dichas reivindicaciones fue por consiguiente restringida a anticuerpos Sap y/o MP-ligantes que tienen la propiedad o efecto deseado.

Los anticuerpos de dominio de las reivindicaciones 58-67 son en parte definidos por la identidad de la secuencia de uno de sus CDRs a uno de los CDRs de las secuencias dadas. Sin embargo, en ninguna parte de la descripción se definen las secuencias de los CDR; por lo tanto, a dichas reivindicaciones les falta revelación (Art. 5 PCT) y claridad (Art. 6 PCT) hasta tal punto que no es posible ninguna búsqueda significativa. Por lo tanto, no se han tomado en cuenta las características relacionadas con los CDRs para la búsqueda, y las reivindicaciones fueron buscadas sólo parcialmente.

Las reivindicaciones 28, 30-41 y 46-51 se relacionan con la que esta Autoridad considera que está cubierta por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) PCT).

SECCION IV

1 UNIDAD (Regla 13 PCT)

1.1 La División Examinadora ha encontrado que a la solicitud le falta unidad (Regla 13 PCT) por las siguientes razones:

1.2 El concepto general simple que puede ser identificado como la unión de las diferentes invenciones es "un anticuerpo de dominio simple contra un antígeno *Candida* spp." La técnica anterior más cercana, documento D1, revela anticuerpos contra la proteasa aspártica Sap2 de *Candida albicans* y anticuerpos contra la adhesina de la manoproteína MP de *C. albicans*. Sin embargo, estos no son anticuerpos de dominio simple, así la diferencia sobre la técnica anterior más cercana es que el anti-*Candida* Sap y los anticuerpos anti-*Candida* MP de la presente solicitud son anticuerpos de dominio simple. No hay ningún efecto particular asociado a esta diferencia. Por lo tanto, los dos problemas técnicos que hay que solucionar por medio de la presente solicitud son proporcionar anticuerpos anti-*Candida* Sap y anti-*Candida* MP alternativos.

1.3 Las soluciones propuestas son:

I Las reivindicaciones 1-13 (todas completamente); 25-67, 72-74 (todas parcialmente): un anticuerpo de dominio simple (dAb) que se une a una proteasa secretoria (Sap) de *Candida* spp., una composición que comprende un dAb multimérico que comprende un anticuerpo de dominio simple anti-*Candida* Sap unido a un anticuerpo de dominio simple anti-*Candida* MP y el uso de dichos anticuerpos/composiciones en la profilaxis y/o tratamiento de infecciones *Candida* spp.

II Las reivindicaciones 14-24 (todas completamente); 25-67, 72-74 (todas parcialmente): un anticuerpo de dominio simple (dAb) que se une a una adhesina de manoproteína (MP) de *Candida* spp., una composición que comprende un dAb multimérico que comprende un anticuerpo de dominio simple anti-*Candida* MP unido a un anticuerpo de dominio simple anti-*Candida* Sap y el uso de dichos anticuerpos/composiciones en la profilaxis y/o tratamiento de infecciones *Candida* spp.

1.4 El concepto general simple, un anticuerpo de dominio simple contra un

anfígeno *Candida* spp. es novedoso sobre D1. Sin embargo, anticuerpos de dominio simple y su producción son conocidos de D2, y la producción de anticuerpos en cualquier formato conocido, incluyendo anticuerpos de dominio simple, contra un anfígeno conocido, cae bajo las habilidades de rutina de la persona versada y les falta nivel inventivo. Por lo tanto, un anticuerpo de dominio simple contra el anfígeno *Candida* spp. no es inventivo y no puede considerarse como una característica técnica especial. Las reivindicaciones no tienen ninguna otra característica técnica especial en común. Por lo tanto, la División Examinadora considera que las invenciones separadas o grupos de invenciones enumerados anteriormente no están así unidos para formar un concepto inventivo simple y la solicitud no cumple con los requerimientos de unidad de la Regla 13 PCT.

SECCION V

1 TECNICA ANTERIOR

1.1 Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: DE BERNARDIS F ET AL: "Rol protector de los anticuerpos antimananos y anti-aspártil proteinasa en un modelo experimental de *Candida albicans* vaginitis en ratas" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 65, no. 8, agosto de 1997 (1997-08), páginas 3399-3405, XP002373565 ISSN: 0019-9567
- D2: HOLT L J ET AL: "Anticuerpos de dominio: Proteínas para terapia" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, noviembre de 2003 (2003-11), páginas 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799
- D3: WO 2004/003019 A: "DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; HOLT) 8 de enero de 2004 (2004-01-08)
- D4: HAN YONGMOON ET AL: "Protección contra candidiasis mediante un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina G3 (IgG3) específico para la misma manotriosa como un anticuerpo protector IgM" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 68, no. 3, marzo de 2000 (2000-03), páginas 1649-1654, XP002196711 ISSN: 0019-9567
- D5: ELS CONRATH K ET AL: "Anticuerpos de dominio simple de camello como unidades de construcción modular en constructos de anticuerpos biespecíficos y bivalentes" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 276, no. 10, 9 de marzo de 2001 (2001-03-09), páginas 7346-7350,

OPINION ESCRITA DE LA

AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
(HOJA SEPARADA)

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2006/000843

XP002248402 ISSN: 0021-9258

- 1.2 El documento D1 revela anticuerpos contra la proteasa aspártica Sap2 de *Candida albicans*, anticuerpos contra la adhesina de la manoproteína MP de *C. Albicans* y el uso de estos anticuerpos en el tratamiento de infecciones intravaginales *C. Albicans* en ratas (todo el documento).
- 1.3 El documento D2 revisa anticuerpos de dominio y revela un método para la generación de dAbs de alta afinidad por selección in vitro (todo el documento).
- 1.4 El documento D3 revela dos anticuerpos de dominio simple, VH dAb HEL4 y TAR2-10 (SEQ ID NOs 2 y 9), que muestran identidad de más del 80% de la secuencia aminoácida con SEQ ID NO 18 de la presente solicitud. D3 además revela un dAb multimérico (heterodimérico) que comprende dAb MSA1 y dAB TAR-1-5-18 unido por medio de enlace disulfido (Ejemplo 12).
- 1.5 El documento D4 revela un método para la profilaxis y/o tratamiento de la infección sistémica *Candida* por medio de un anticuerpo que une una proteína *Candida* MP (anticuerpos monoclonales C3.1 y B6.1), los anticuerpos fueron dados intraperitonealmente cuatro horas antes de la infección *Candida* intravenosa (todo el documento).
- 1.6 El documento D5 revela un dAb multimérico (heterodimérico) que comprende un anticuerpo de dominio simple de camello cAbLys3 unido a dAb cAbAMD9. Los dos fragmentos de anticuerpo de dominio simple estaban unidos por la bisagra estructural superior de la llama IgG2a. Las composiciones que contienen dichos dAb multiméricos fueron usadas en ensayos in vitro (todo el documento).

2 NOVEDAD (Art. 33(2) PCT)

- 2.1 D1 no revela anticuerpos anti-Sap (Invención I) o anti-MP (Invención II) que sean anticuerpos de dominio simple, así las reivindicaciones 1-8, 14-20, 26 y 58-67 son novedosas sobre D1.
- 2.2 Debido a la definición no clara de los anticuerpos de dominio simple de las reivindicaciones 9-10, 13, 21-22, 25 y 27 (ver la SECCION VIII) no es posible distinguir dichos anticuerpos de dominio simple de los anticuerpos de dominio simple de D3 con SEQ ID NO 2 o 9, que muestran identidad de

OPINION ESCRITA DE LA

**AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
(HOJA SEPARADA)**

Solicitud Internacional No.

PCT/GB2006/000843

más del 80% con la secuencia aminoácido SEQ ID NO: 18 de la presente solicitud. Por lo tanto, las reivindicaciones 9-10, 13, 21, 22, 25 y 27 no son novedosas sobre D3. El término "opcionalmente" no se limita al alcance de las reivindicaciones; por lo tanto, las reivindicaciones 72-74 tampoco son novedosas sobre D3.

2.3 La SEQ ID NOs 14-35 (Invención I) y 5-13 (Invención II) no se revela en la técnica anterior citada, ni son ningún anticuerpo de dominio simple que muestra identidad del 80% con la SEQ ID NOs 5 – 13 revelada; por lo tanto, las reivindicaciones 11-12 y 23-24 son novedosas sobre la técnica anterior citada.

2.4 D1 no revela el uso de anticuerpos de dominio para profilaxis o tratamiento de *Candida* spp., almidón o infecciones del VIH o el tratamiento de pacientes inmunocomprometidos o pacientes que sufren de SIDA; por lo tanto, las reivindicaciones 28-45 son novedosas sobre D1.

2.5 El documento D1 no revela el uso de anticuerpos anti-Sap2 en tratamiento sistémico de la infección *Candida*; por lo tanto, la reivindicación 46, en cuanto se relaciona con el anticuerpo anti-Sap/invención I es novedosa sobre D1. Sin embargo, el documento D4 revela el tratamiento de la infección sistémica *Candida* con anticuerpos anti-MP (Invención II); por lo tanto, la reivindicación 46 no es novedosa sobre D4. Puesto que los anticuerpos de la reivindicación 47 son definidos por el resultado que pretende ser logrado y no están limitados a anticuerpos de dominio, la reivindicación 47 y las reivindicaciones dependientes 48-51 tampoco son novedosas sobre D4.

2.6 Las especificidades ligantes del antígeno de los anticuerpos de dominio multiméricos de las reivindicaciones 52-56 no son claras puesto que los anticuerpos de las reivindicaciones 9-10 y 21-22 no están definidos claramente. Por lo tanto, la composición de anticuerpos de dominio multimérico del documento D5 anticipa la novedad de las reivindicaciones 52-53 y 55-56. El documento D5 no revela dAbs que están unidos directamente; por lo tanto, la reivindicación 54 es novedosa sobre D5. Aunque D3 revela la unión directa de dAbs por medio de la unión del disulfuro para formar multímeros, y por lo tanto la reivindicación 54 no es novedosa sobre D3.

2.7 La técnica anterior citada no revela un método para la profilaxis o tratamiento de la infección *Candida* spp. de un dispositivo médico; por lo tanto, la reivindicación 57 es novedosa sobre la técnica anterior citada.

2.8 Aunque las reivindicaciones 1-8, 11-12, 14-20, 23-24, 26, 28-45 y 57-67 son

novedosas. La presente solicitud no cumple con los criterios del Artículo 33(1) PCT porque la materia objeto de las reivindicaciones 9-10, 13, 21-22, 25, 27, 46-56 y 72-74 no es novedosa en el sentido del Artículo 33(2) PCT.

3. NIVEL INVENTIVO (Art. 33(3) PCT)

3.1 El documento D1 es considerado como la técnica anterior más cercana a la materia objeto de las reivindicaciones 1-8, 11-12, 14-20, 23-24, 26, 28-45 y 57-67.

3.2 La invención I, reivindicaciones 1-8, 11-12 (todas completamente), 26 y 57-67 (todas parcialmente):

Las reivindicaciones difieren del documento D1 en que el anticuerpo anti-Sap es un anticuerpo de dominio simple. El anticuerpo anti-Sap2 de D1 reduce el *C. Albicans* vaginal CFU en un modelo de ratas similar al usado en la presente solicitud a 2×10^3 CFU/ml dentro de los 10 días de infección, mientras que el mejor anticuerpo de dominio simple anti-Sap2 de la presente solicitud únicamente reduce a 15×10^3 CFU/ml después de 10 días. Por lo tanto, no hay un efecto significativo de los anticuerpos de dominio simple de la presente solicitud sobre los anticuerpos de D1. El problema que la presente solicitud tiene que resolver puede por lo tanto ser considerado como proporcionar anticuerpos alternativos contra *Candida* Sap2 para profilaxis o tratamiento de infecciones *Candida*.

Las reivindicaciones 4 y 12 solucionan el problema planteado. Sin embargo, los anticuerpos de dominio simple de las reivindicaciones 4 y 12 son simplemente soluciones arbitrarias. Sin un efecto sorprendente, la provisión de estas soluciones no comprende un paso inventivo.

Las reivindicaciones 1-3, 5-8, 11, 26 y 58-67 no solucionan el problema planteado porque incluyen anticuerpos que no inhiben a Sap, v.g. ADR4-5 (SEQ ID NO 17) y ADR4-8 (SEQ ID NO 20) (Tabla 2) y que por lo tanto tampoco serán funcionales en la profilaxis o tratamiento de infecciones *Candida*.

3.3 La invención II, reivindicaciones 14-20, 23-24 (todas completamente), 26 y 57-67 (todas parcialmente):

Las reivindicaciones difieren del documento D1 en que el anticuerpo anti-MP65 es un anticuerpo de dominio simple. Los anticuerpos anti-MP y anti-MP65 reducen la *C. albicans* vaginal CFU en un modelo de ratas similar al usado en la presente solicitud a 10 y $18-22 \times 10^3$ CFU/ml dentro de los 10

días de la infección, mientras que el mejor anticuerpo de dominio anti-MP65 de la presente solicitud únicamente la reduce a cerca de 25×10^3 CFU/ml después de 10 días. Por lo tanto, no hay un efecto significativo de los anticuerpos de dominio simple de la presente solicitud sobre los anticuerpos de D1. El problema que la presente solicitud tiene que resolver puede por lo tanto ser considerado como proporcionar anticuerpos alternativos contra Candida MP65 para profilaxis o tratamiento de infecciones Candida.

Las reivindicaciones 15-19, 23 y 26 solucionan el problema planteado. Sin embargo, los anticuerpos de dominio simple de las reivindicaciones 15-19, 23 y 26 son simplemente soluciones arbitrarias. Sin un efecto sorprendente, la provisión de estas soluciones no comprende un paso inventivo.

Las reivindicaciones 14-20 y 58-67 no solucionan el problema planteado porque los anticuerpos anti-M P de los ejemplos fueron planteados contra MP65. No hay evidencia de que los anticuerpos planteados contra otras manoproteínas Candida tendrán las mismas propiedades que los anticuerpos anti-MP65 de los ejemplos. Esto es especialmente dudoso en vista de la revelación del documento 4, donde únicamente el anticuerpo B6.1, que reconoce un epítopo de manoproteína mostrado de manera homogénea sobre toda la superficie de la célula, protege a los ratones contra la candidiasis diseminada, mientras que el anticuerpo B6, que reconoce un epítopo de manoproteína con una distribución poco uniforme, no protege contra la candidiasis diseminada.

- 3.4 El uso médico de las reivindicaciones 28-45 y el método de la reivindicación 57 (todas Invenciones I y II parcialmente) son más amplios que lo que la descripción sustenta, y por lo tanto las reivindicaciones 28-45 y 57 no solucionan el problema planteado. La descripción únicamente proporciona soporte para el uso de anticuerpos de dominio simple ADR4-6 (SEQ ID NO. 18), ADR4-13 (SEQ ID NO 25), ADR3-1 (SEQ ID NO 5), ADR3-2 (SEQ ID NO 6) y ADR3-6 (SEQ ID NO 10) y los anticuerpos de dominio simple ADR3-6/ADR4-6 y ADR4-6/ADR3-2 para la fabricación de una composición para la profilaxis o tratamiento de infecciones Candida. Las reivindicaciones que se limitan a dichos anticuerpos tampoco comprenderían un paso inventivo puesto que dichos anticuerpos no muestran un efecto sorprendente porque son tan eficientes como o menos eficientes que los anticuerpos de D1.
- 3.5 La presente solicitud no cumple con los criterios del Artículo 33(1) PCT porque la materia objeto de las reivindicaciones 1-8, 11-12, 14-20, 23-24, 26, 28-45 y 57-67 no comprende un paso inventivo en el sentido del Artículo 33(3) PCT.

OPINION ESCRITA DE LA

AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
(HOJA SEPARADA)

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2006/000843

4 APLICABILIDAD INDUSTRIAL (Art. 33(4) PCT)

4.1 Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 28-51 sobre la pregunta de si son aplicables industrialmente, no existen criterios unificados en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como aplicable industrialmente la materia objeto de las reivindicaciones en cuanto al uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para primer uso en el tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

SECCION VI

El examen se ha basado en el supuesto de que la prioridad reivindicada es válida para todas las reivindicaciones. Sin embargo, si este no es el caso, entonces los siguientes documentos serían relevantes para las reivindicaciones 1-67 y 72-74:

BARTOLINI S, SANDINI S, LA VALLE R, DE BERNARDIS F, CASSONE A, LIU H, GRANT S, O'MAHONY R: "Anticuerpos de dominio humano hipervariable que reconocen rasgos de virulencia de Candida albicans y confieren protección pasiva contra candidiasis vaginal experimental" PROGRESS REPORT QUINTO PROGRAMMA NAZIONALE DI RICERCA SULL'AIDS, [Online] 2 de mayo de 2005 (2005-05-02), página 198, XP002399717 Instituto Superiore di Sanità, Roma, Italia, ISSN-0393-5620 Retrieved from the Internet: URL: www.unicri.it/wwk/publications/dacp/legislation/aids/sis%202005%2012%20iss%20progress%20report.pdf [retrieved en 2006-09-15]

CASSONE A ET ALL: "UN PERFIL DEL PAPEL DE ANTICUERPOS ANTI-CÁNDIDA DENTRO DEL CONTEXTO DE INMUNIZACIÓN PASIVA Y PROTECCIÓN DE CANDIDIASIS" CURRENT MOLECULAR MEDICINE, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, GB, vol. 5, no. 4, 2005, páginas 377-382, XP008068859 ISSN: 1566-5240

SECCION VII

Las reivindicaciones 3, 11 y 58-67 se relacionan con SEQ ID Nos 14 a 25, que corresponde a las designaciones de secuencia interna ADR4-2 a ADR4-23; sin

embargo, ADR4-20 falta en el grupo de secuencias enumerado en las reivindicaciones.

SECCION VIII

1 CLARIDAD Y SOPORTE (Art. 6 PCT)

- 1.1 Las reivindicaciones 9-10, 13, 21-22, 24-25, 27-45, 47-57 y 72-74 no cumplen con los requerimientos del Artículo 6 PCT en que la materia para la cual se busca protección no está claramente definida. Las reivindicaciones intentan definir la materia objeto en términos del resultado que pretende ser logrado, a saber, "inhibir la actividad funcional de una proteasa aspártica secretoria/Sap2" y/o "inhibir la actividad funcional de la adhesina de manoproteína/MP65. Puesto que ni la especificidad que une al antígeno ni la secuencia completa del anticuerpo están definidos en las reivindicaciones, dichas reivindicaciones simplemente ascienden a una afirmación del problema implícito, sin proporcionar las características técnicas necesarias para lograr el resultado.
- 1.2 Puesto que la reivindicación 18 se refiere a la reivindicación 14 (dAB que se une a MP65), la reivindicación 19 tiene el mismo alcance que la reivindicación 18. Para lograr la precisión, la reivindicación 19 debe ser eliminada.
- 1.3 Las reivindicaciones 20 y 24 se relacionan con un anticuerpo de dominio simple "que exhibe una identidad del 80%" con los anticuerpos enumerados. Sin embargo, únicamente es cierto que anticuerpos con identidad del 100% tienen las características como se han ejemplificado. Por lo tanto, a dichas reivindicaciones les falta claridad y soporte de conformidad con el Artículo 6 PCT.
- 1.4 Las reivindicaciones 29, 30, 32, 42 y 57 se refieren a una composición de conformidad con la reivindicación 29; sin embargo, la reivindicación 28 es una reivindicación a un método y no a una composición. La reivindicación 40 se refiere al "uso de conformidad con la reivindicación 39"; sin embargo la reivindicación 40 es una reivindicación a un método y no a un uso. Estas inconsistencias hacen que las reivindicaciones 29, 30, 32, 42 y 57 no sean claras.
- 1.5 Las reivindicaciones 73 y 74 se refieren a la reivindicación 71; sin embargo, la reivindicación 71 no contiene una "mitad de extensión de vida media"; por lo tanto, las reivindicaciones 73 y 74 han sido interpretadas como refiriéndose a la reivindicación 72 en lugar de a la 71 y deben corregirse en concordancia.
- 1.6 Los términos "preferiblemente" (v.g. la reivindicación 3, 16 y 23) y "opcionalmente" (reivindicación 72) no se limitan al alcance de las reivindicaciones; por lo tanto, la reivindicación 72 es redundante respecto a las reivindicaciones a las que se refiere.

OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
(HOJA SEPARADA)

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2006/000843

1.7 El solicitante no cumple con los requerimientos del Artículo 6 PCT porque las reivindicaciones 3, 9-10, 13, 19-22, 24-25, 27-45, 47-57 y 72-74 no son claras.

Se informa que los trabajos citados de la literatura que no es de patentes tal como documentos científicos o técnicos o semejantes pueden estar sujetos a protección de propiedad intelectual y/o otra protección de trabajos escritos según sea apropiado con base en las leyes pertinentes. Los textos de propiedad intelectual no pueden ser copiados o usados en otras publicaciones electrónicas o impresas o redistribuidos sin el permiso expreso del propietario de la propiedad intelectual.

XS CPRTENFRDE

BNSDOCID:<XS----2006100103CF-1->

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

To:		Date of mailing (day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)	
see form PCT/ISA/220			
Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220		FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below	
International application No. PCT/GB2006/000843	International filing date (day/month/year) 10.03.2006	Priority date (day/month/year) 18.03.2005	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. C07K16/14 C07K16/40 A61K39/395 A61P31/10 ADD. C07K16/46			
Applicant DOMANTIS LIMITED			

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

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

2. FURTHER ACTION

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

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

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

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

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
 European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	see form PCT/ISA/210	Luyten, Kattie Telephone No. +31 70 340-8924



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2006/000843

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ 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.
4. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis*.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/GB2006/000843

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 68-71 (all completely); 9-10, 13, 21-22, 24-25, 27-45, 47-67 and 72-74 (all partially); 28, 30-41 and 46-51 (with respect to industrial applicability)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 28, 30-41 and 46-51 (with respect to industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 9-10, 13, 21-22, 24-25, 27-45, 47-67 and 72-74 (all partially) are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

see separate sheet

- ☒ the claims, or said claims Nos. 9-10, 13, 21-22, 24-25, 27-45, 47-67 and 72-74 (all partially) are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

see separate sheet

- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 68-71 (all completely)

- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See Supplemental Box for further details

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/GB2006/000843

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☒ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-8, 11-12, 14-20, 23-24, 26, 28-45, 57-67
	No: Claims	9-10, 13, 21-22, 25, 27, 46-56, 72-74
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-67, 72-74
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-27, 29, 42-45, 52-67, 72-74
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2006/000843

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)
and /or
2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)
see form 210

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:
see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

SECTION III

Present claims 68-71 (all completely) and 72-74 (partially) relate to sequences not disclosed in the application as originally filed (SEQ ID NOs: 345, 420, 423, 430, 432, 438, 441). As a result, the application does not comply with the requirement of clarity under Article 6 PCT and disclosure under Article 5 PCT. The lack of clarity and disclosure is to such an extent that no meaningful search is possible, thus claims 68-71 have not been searched. Claim 72 was searched as far as it refers back to claims 1-27, 29, 52-56 and 58-67. Claims 73 and 74 have been interpreted to refer back to claim 72 instead of claim 71, and were thus also partially searched.

Present claims 9-10, 13, 21-22, 24-25, 27-45, 47-57 and 72-74 relate to antibodies which have a given desired property or effect, namely "inhibits the functional activity of a secretory aspartic protease/Sap2" and/or "inhibits the functional activity of mannoprotein adhesin/MP65". However, there is no indication as to what the antibody binds. The claimed activities may be achieved by means other than direct binding of the antibody to secretory aspartic protease (Sap) or mannoprotein adhesin (MP), so that it is not possible to compare the claimed antibodies with prior art antibodies. Therefore said claims lack clarity according to Art. 6 PCT. The search of said claims was consequently restricted to Sap and/or MP-binding antibodies having the desired property or effect.

The domain antibodies of claims 58-67 are in part defined by the sequence identity of one of their CDRs to one of the CDRs of the given sequences. However, nowhere in the description are the CDR sequences defined, therefore said claims lack disclosure (Art. 5 PCT) and clarity (Art. 6 PCT) to such an extent that no meaningful search is possible. Therefore, the features relating to the CDRs have not been taken into account for the search, and the claims were only searched partially.

Claims 28, 30-41 and 46-51 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

SECTION IV

1 UNITY (Rule 13 PCT)

- 1.1 The Examining Division has found that the application lacks unity (Rule 13 PCT) for the following reasons:
- 1.2 The single general concept which can be identified as linking the different inventions is "a single domain antibody against a Candida spp. antigen". The closest prior art, document D1, discloses antibodies against the aspartic protease Sap2 of Candida albicans and antibodies against mannoprotein adhesin MP of C. albicans. However, these are not single domain antibodies, thus the difference over the closest prior art is that the anti-Candida Sap and anti-Candida MP antibodies of the present application are single domain antibodies. There is no particular effect associated to this difference. Therefore, the two technical problems to be solved by the present application are to provide alternative anti-Candida Sap and anti-Candida MP antibodies.
- 1.3 The proposed solutions are:
 - I Claims 1-13 (all completely); 25-67 and 72-74 (all partially): a single domain antibody (dAb) which binds to a secretory protease (Sap) from Candida spp., a composition comprising a multimeric dAb comprising an anti-Candida Sap single domain antibody linked to an anti-Candida MP single domain antibody and the use of said antibodies/compositions in the prophylaxis and/or treatment of Candida spp. infections.
 - II Claims 14-24 (all completely); 25-67 and 72-74 (all partially): a single domain antibody (dAb) which binds to mannoprotein adhesin (MP) from Candida spp., a composition comprising a multimeric dAb comprising an anti-Candida MP single domain antibody linked to an anti-Candida Sap single domain antibody and the use of said antibodies/compositions in the prophylaxis and/or treatment of Candida spp. infections.
- 1.4 The single general concept, a single domain antibody against a Candida spp.

antigen, is novel over D1. However, single domain antibodies and their production are known from D2, and the production of antibodies in any known format, including single domain antibodies, against a known antigen, falls under the routine skills of the skilled person and lacks an inventive step. Therefore, a single domain antibody against a *Candida* spp. antigen is not inventive and cannot be considered as a special technical feature. The claims do not have another special technical feature in common. Hence, the Examining Division considers that the separate inventions or groups of inventions listed above are not so linked as to form a single inventive concept and the application is not fulfilling the requirements of unity of Rule 13 PCT.

SECTION V

1 PRIOR ART

1.1 Reference is made to the following documents:

- D1: DE BERNARDIS F ET AL: "Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 65, no. 8, August 1997 (1997-08), pages 3399-3405, XP002373565 ISSN: 0019-9567
- D2: HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799
- D3: WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; HOLT) 8 January 2004 (2004-01-08)
- D4: HAN YONGMOON ET AL: "Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 68, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 1649-1654, XP002196711 ISSN: 0019-9567
- D5: ELS CONRATH K ET AL: "Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 276, no. 10, 9 March 2001 (2001-03-09), pages 7346-

7350, XP002248402 ISSN: 0021-9258

- 1.2 Document D1 discloses antibodies against the aspartic protease Sap2 of *Candida albicans*, antibodies against mannoprotein adhesin MP of *C. albicans* and the use of these antibodies in the treatment of intravaginal *C. albicans* infections in rats (whole document).
- 1.3 Document D2 gives a review on domain antibodies and discloses a method for the generation of high-affinity dAbs by in vitro selection (whole document).
- 1.4 Document D3 discloses two single domain antibodies, VH dAb HEL4 and TAR2-10 (SEQ ID NOs 2 and 9), which exhibit more than 80% amino acid sequence identity to SEQ ID NO 18 of the present application. D3 furthermore discloses a multimeric (heterodimeric) dAb comprising dAb MSA1 and dAb TAR1-5-19 coupled via a disulfide bond (Example 12).
- 1.5 Document D4 discloses a method for the prophylaxis and/or treatment of systemic *Candida* infection by means of an antibody which binds a *Candida* MP protein (monoclonal antibodies C3.1 and B6.1), the antibodies were given intraperitoneally four hours before intravenous *Candida* infection (whole document).
- 1.6 Document D5 discloses a multimeric (heterodimeric) dAb comprising camel single domain antibody cAbLys3 linked to dAb cAbAMD9. The two single-domain antibody fragments were linked by the structural upper hinge of the llama IgG2a. Compositions containing said multimeric dAb were used in in vitro assays (whole document).

2 NOVELTY (Art. 33(2) PCT)

- 2.1 D1 does not disclose anti-Sap (Invention I) or anti-MP (Invention II) antibodies that are single domain antibodies, thus claims 1-8, 14-20, 26 and 58-67 are novel over D1.
- 2.2 Due to the unclear definition of the single domain antibodies of claims 9-10, 13, 21-22, 25 and 27 (see SECTION VIII) it is not possible to distinguish said single domain antibodies from the single domain antibodies of D3 with SEQ ID NO 2 or 9, which

exhibit more than 80% identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 18 of the present application. Therefore, claims 9-10, 13, 21, 22, 25 and 27 are not novel over D3. The term "optionally" is not limiting the scope of the claims, therefore, claims 72-74 are also not novel over D3.

- 2.3 The SEQ ID NOs 14-35 (^{SAP2}Invention I) and 5-13 (^{MP2}Invention II) are not disclosed in the cited prior art, not are any single domain antibodies which exhibit 80% identity to SEQ ID NOs 5-13 disclosed, therefore claims 11-12 and 23-24 are novel over the cited prior art.
- 2.4 D1 does not disclose the use of domain antibodies for prophylaxis or treatment of *Candida* spp., yeast or HIV infections or the treatment of immunocompromised patients or patients suffering from AIDS, therefore claims 28-45 are novel over D1.
- 2.5 Document D1 does not disclose the use of anti-Sap2 antibodies in systemic treatment of *Candida* infection, therefore claim 46, as far as it relates to an anti-Sap antibody/Invention I is novel over D1. However, document D4 discloses the treatment of systemic *Candida* infection with anti-MP antibodies (Invention II), therefore, claim 46 is not novel over D4. Since the antibodies of claim 47 are defined by the result to be achieved and are not limited to domain antibodies, claim 47 and the dependent claims 48-51 are also not novel over D4.
- 2.6 The antigen binding specificities of the multimeric domain antibodies of claims 52-56 are unclear since the antibodies of claims 9-10 and 21-22 are not clearly defined. Therefore, the multimeric domain antibody composition of document D5 anticipates the novelty of claims 52-53 and 55-56. Document D5 does not disclose dAbs which are directly linked, therefore claim 54 is novel over D5. Though, D3 discloses the direct linking of dAbs via a disulfide bond to form multimers, and thus claim 54 is not novel over D3.
- 2.7 The cited prior art does not disclose a method for the prophylaxis or treatment of *Candida* spp. infection of a medical device, therefore claim 57 is novel over the cited prior art.
- 2.8 Although claims 1-8, 11-12, 14-20, 23-24, 26, 28-45 and 57-67 are novel. The

present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 9-10, 13, 21-22, 25, 27, 46-56 and 72-74 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

3 INVENTIVE STEP (Art. 33(3) PCT)

3.1 Document D1 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claims 1-8, 11-12, 14-20, 23-24, 26, 28-45 and 57-67.

3.2 Invention I, claims 1-8, 11-12 (all completely), 26 and 57-67 (all partially):

The claims differ from document D1 in that the anti-Sap antibody is a single domain antibody. The anti-Sap2 antibody of D1 reduces the *C. albicans* vaginal CFU in a similar rat model as used in the present application to 2×10^3 CFU/ml within 10 days of infection, whereas the best anti-Sap2 single domain antibody of the present application only reduces to about 15×10^3 CFU/ml after 10 days. Thus, there is no significant effect of the single domain antibodies of the present application over the antibodies of D1. The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as to provide alternative antibodies against *Candida* Sap2 for prophylaxis or treatment of *Candida* infections.

Claims 4 and 12 solve the problem posed. However, the single domain antibodies of claims 4 and 12 are merely arbitrary solutions. Without a surprising effect, the provision of these solutions does not involve an inventive step.

Claims 1-3, 5-8, 11, 26 and 58-67 do not solve the problem posed, because they include antibodies that do not inhibit Sap, e.g. ADR4-5 (SEQ ID NO 17) and ADR4-8 (SEQ ID NO 20) (Table 2) and which therefore will also not be functional in the prophylaxis or treatment of *Candida* infections.

3.3 Invention II, claims 14-20, 23-24 (all completely), 26 and 57-67 (all partially):

The claims differ from document D1 in that the anti-MP65 antibody is a single domain antibody. The anti-MP and anti-MP65 antibodies of D1 reduces the *C. albicans* vaginal CFU in a similar rat model as used in the present application to 10 and 18-22

$\times 10^3$ CFU/ml within 10 days of infection, whereas the best anti-MP65 domain antibody of the present application only reduces to about 25×10^3 CFU/ml after 10 days. Thus, there is no significant effect of the single domain antibodies of the present application over the antibodies of D1. The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as to ~~provide alternative antibodies against Candida MP65 for prophylaxis or treatment of Candida infections.~~

Claims 15-19, 23 and 26 solve the problem posed. However, the single domain antibodies of claims 15-19, 23 and 26 are merely arbitrary solutions. Without a surprising effect, the provision of these solutions does not involve an inventive step.

Claims 14, 20 and 58-67 do not solve the problem posed, because the anti-MP antibodies of the examples were raised against MP65. There is no evidence that antibodies raised against other Candida mannoproteins will have the same properties as the anti-MP65 antibodies of the examples. This is especially doubtful in the view of the disclosure of document D4, wherein only antibody B6.1, which recognizes a mannoprotein epitope homogeneously displayed over the entire cell surface, protects mice against disseminated candidiasis, whereas the antibody B6, which recognizes a mannoprotein epitope with a patchy distribution, does not protect against disseminated candidiasis.

- 3.4 The medical use claims 28-45 and the method of claim 57 (all partially Inventions I and II) are broader than what is supported by the description, and therefore claims 28-45 and 57 do not solve the problem posed. The description only provides support for the use of single domain antibodies ADR4-6 (SEQ ID NO 18), ADR4-13 (SEQ ID NO 25), ADR3-1 (SEQ ID NO 5), ADR3-2 (SEQ ID NO 6) and ADR3-6 (SEQ ID NO 10) and the dimeric domain antibodies ADR3-6/ADR4-6 and ADR4-6/ADR3-6 for the manufacture of a composition for prophylaxis or treatment of Candida infections. Claims limited to said antibodies, would also not involve an inventive step, since said antibodies do not show a surprising effect, because they are as efficient as or less efficient than the antibodies of D1.
- 3.5 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of ~~claims 1-8, 11-12, 14-20, 23-24, 26, 28-45 and 57-67~~ does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

4 INDUSTRIAL APPLICABILITY (Art. 33(4) PCT)

- 4.1 For the assessment of present claims 28-51 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

SECTION VI

The examination has been based on the assumption that the claimed priority is valid for all claims. However, if this is not the case, then the following documents would become relevant for claims 1-67 and 72-74:

BARTOLINI S, SANDINI S, LA VALLE R, DE BERNARDIS F, CASSONE A, LIU H, GRANT S, O'MAHONY R: "Human hypervariable antibody domains recognizing virulence traits of *Candida albicans* confer passive protection against experimental vaginal candidiasis." PROGRESS REPORT QUINTO PROGRAMMA NAZIONALE DI RICERCA SULL'AIDS, [Online] 2 May 2005 (2005-05-02), page 198, XP002399717 Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, ISSN: 0393-5620 Retrieved from the Internet: URL: www.unicri.it/www/publications/dacp/legislation/aids/sis%202005%2012%20iss%20progress%20report.pdf [retrieved on 2006-09-15]

CASSONE A ET AL: "AN OUTLINE OF THE ROLE OF ANTI-CANDIDA ANTIBODIES WITHIN THE CONTEXT OF PASSIVE IMMUNIZATION AND PROTECTION FROM CANDIDIASIS" CURRENT MOLECULAR MEDICINE, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, GB, vol. 5, no. 4, 2005, pages 377-382, XP008068859 ISSN: 1566-5240

SECTION VII

Claims 3, 11 and 58-67 relate to SEQ ID NOs 14 to 25, which correspond to the internal sequence designations ADR4-2 to ADR4-23, however, ADR4-20 is missing from the group

of sequences listed in the claims.

SECTION VIII

1 CLARITY AND SUPPORT (Art. 6 PCT)

1.1 Claims 9-10, 13, 21-22, 24-25, 27-45, 47-57 and 72-74 do not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The claims attempt to define the subject-matter in terms of the result to be achieved, namely "inhibits the functional activity of a secretory aspartic protease/Sap2" and/or "inhibits the functional activity of mannoprotein adhesin/MP65". Since neither the antigen binding specificity nor the full sequence of the antibody are defined in the claims, said claims merely amount to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving the result.

1.2 Since claim 18 refers back to claim 14 (dAB which binds to MP65), claim 19 has the same scope as claim 18. For the sake of conciseness, claim 19 should be removed.

1.3 Claims 20 and 24 relate to a single domain antibody "which exhibits 80% identity" to the listed antibodies. However, only antibodies with 100% identity are certain to have the features as exemplified. Therefore, said claims lack clarity and support according to Article 6 PCT.

1.4 Claims 29, 30, 32, 42 and 57 refer to a composition according to claim 28, however, claim 28 is a claim to a method and not to a composition. Claim 40 refers to the "use according to claim 39", however, claim 40 is a claim to a method and not to a use. These inconsistencies render claims 29, 30, 32, 40, 42 and 57 unclear.

1.5 Claims 73 and 74 refer back to claim 71, however, claim 71 does not contain a "half-life extension moiety", therefore claims 73 and 74 have been interpreted to refer back to claim 72 instead of 71 and should be corrected accordingly.

1.6 The terms "preferably" (e.g. claim 3, 16 and 23) and "optionally" (claim 72) do not limit the scope of the claims, therefore claim 72 is redundant with respect to the claims it refers to.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/GB2006/000843

- 1.7 The application does not meet the requirements of Article 6 PCT, because claims 3, 9-10, 13, 19-22, 24-25, 27-45, 47-57 and 72-74 are not clear.

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

XS CPRTENFRDE

ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS DE CANDIDA

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5 Se proporcionan anticuerpos de dominio. En particular, anticuerpos de dominio (dAbs) que reconocen rasgos de virulencia de *Candida spp.* y que confieren una protección pasiva contra candidiasis.

* * * * *

10

15

20

25

ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS DE CANDIDA

Esta invención se refiere a anticuerpos de dominio. En particular, se refiere a anticuerpos de dominio que reconocen los rasgos de virulencia de *Candida spp.*, y que confieren una protección pasiva contra candidiasis.

La vacunación pasiva, el uso terapéutico o preventivo de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos que reaccionan con antígenos, es un medio notoriamente atractivo para el control de las enfermedades infecciosas en una era de agentes infecciosos que surgen y vuelven a surgir, de la amenaza creciente de la resistencia anti-microbiana, y de la falta de nuevos fármacos y vacunas preventivas. La vacunación pasiva es particularmente atractiva para el control de los agentes de infecciones oportunistas que se apoyan en la disfunción inmune para provocar la enfermedad en un huésped debilitado. La ausencia o la reducción de competencia inmune niega al huésped la cooperación necesaria con anti-microbianos, y hace particularmente difícil generar una vacuna protectora. *Candida albicans* es uno de estos agentes oportunistas para el que la vacunación pasiva parece ser particularmente prometedora. Es un importante patógeno mucoso y sistémico en el establecimiento del huésped inmunocomprometido, en particular en los sujetos con SIDA y en los pacientes hemopáticos neutropénicos que se someten a trasplante de médula ósea. También es un patógeno importante en el establecimiento de candidiasis vaginal y otras patologías

mucocutáneas. De hecho, se ha estimado que tres cuartas partes de todas las mujeres normales en edad fértil experimentan cuando menos un ataque de candidiasis vaginal aguda, y más importante, aproximadamente el 5 por ciento de ellas sufren de recurrencias crónicas posteriormente. La candidiasis vaginal crónica es difícilmente curable con antimicóticos, y existe una preocupación creciente y alguna evidencia clínica de *Candida* puede llegar a ser refractaria al antimicótico bajo un tratamiento repetido.

C. albicans es esencialmente un patógeno extracelular, con algunos rasgos de virulencia definidos. Los estudios con modelos animales experimentales de infección han demostrado que los anticuerpos de la especificidad e isotipos correctos, realmente pueden proteger contra las infecciones experimentales mucosas y sistémicas severas también. Los estudios han resaltado particularmente las características de virulencia de un miembro de las proteasas aspárticas secretoras (SAP2) y una manoproteína adhesina supuesta (MP65) del hongo, y han puesto las bases para una inmunoprotección eficaz por parte de anticuerpos policlonales y monoclonales específicos, y fragmentos peptídicos contra ellos.

En la perspectiva de la inmunoterapia de candidiasis mucosa de seres humanos, la generación de anticuerpos humanizados o humanos es una cuestión crítica que recientemente ha llegado a ser más alcanzable mediante el uso de la tecnología de ADN recombinante. En particular, las bibliotecas de expresión de fagos permiten la selección y producción de fragmentos variables de una

sola cadena humanos (scFv) o anticuerpos de un solo dominio (dAbs) con una especificidad previamente definida, en una cantidad relativamente grande y fácilmente estandarizable.

Los anticuerpos scFv anti-*Candida* terapéuticos han sido
5 previamente generados (Magliani, W. y colaboradores, 1995 *Nat. Biotechnol.* 15:155-158).

Sin embargo, en la técnica sigue existiendo una necesidad de anticuerpos anti-*Candida* alternativos que sean efectivos en el tratamiento de infección por *Candida spp.*.

10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Los presentes inventores han generado un número de anticuerpos de un solo dominio (dAbs), que han mostrado que son efectivos en el tratamiento de infección por *Candida spp.*, en particular en el tratamiento de candidiasis vaginal. Se ha demostrado
15 que estos anticuerpos de un solo dominio se enlazan y/o inhiben la actividad funcional de ciertos factores de virulencia de *Candida spp.*.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo de un solo dominio (dAb) que es capaz de enlazarse con, y/o de inhibir, la actividad funcional de una proteasa
20 aspártica secretora (Sap) de *Candida spp.*.

De acuerdo con la invención descrita en la presente, las secuencias de aminoácidos designadas como ADR4-X en el listado de secuencias proporcionado en la presente, representan las secuencias de aminoácidos del anticuerpo de un solo dominio de
25 enlace de SAP2.

Las proteasas aspárticas secretoras para enlazarse con uno o más dAbs (dAbs) de acuerdo con la presente invención incluyen las proteasas aspárticas secretoras Sap1, Sap2, Sap3, Sap4, Sap5 y Sap6, Sap 7, Sap8, Sap9, y Sap10. En una modalidad preferida del aspecto anterior de la invención, el dAb es un dAb que se enlaza con Sap2 (dAb que se enlaza con Sap2).

De preferencia, es un dAb que se enlaza con Sap2 que comprende, o de preferencia que consiste en, una o más secuencias mostradas en el listado de secuencias proporcionado en la presente, y designadas como ADR4-2 designada como la SEQ ID NO:14 a ADR4-23 designada como la SEQ ID NO:35.

En una modalidad más preferida del aspecto anterior de la invención, el dAb es un dAb que se enlaza con Sap2 que comprende, o de preferencia que consiste en, una o más secuencias mostradas en el listado de secuencias proporcionado en la presente, y designadas como ADR4-6 representada por la SEQ ID NO:18, y ADR4-13 representada por la SEQ ID NO:25 en la presente.

De una manera conveniente, el dAb de acuerdo con la presente invención se enlaza con una o más SAPs como se definen en la presente, con una constante de índice $K_{\text{desactivación}}$ de entre 5×10^{-1} y $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$.

De una manera más conveniente, el dAb de acuerdo con la presente invención se enlaza con Sap2 con una constante de disociación (K_d) de cuando menos $100 \mu\text{M}$ a 1 pM .

Las infecciones por *Candida* de cualquier especie se pueden tratar

utilizando uno o más dAbs de acuerdo con la presente invención. Las infecciones por *Candida spp.* adecuadas para el tratamiento utilizando los dAbs de la presente incluyen cualquiera de aquéllas del grupo que consiste en las siguientes: *Candida ciferrii*, *Candida famata*, *Candida lambica*, *Candida lipolytica*, *Candida norvegensis*,
5 *Candida rugosa*, *Candida viswanathii*, *Candida zeylanoides*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Candida kefyr*, *Candida guilliermondii* y *Candida dubliniensis*.

10 La *Candida spp.* preferida para el tratamiento de acuerdo con la invención incluye cualquiera de aquéllas del grupo que consiste en las siguientes: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida lusitaniae*.

En una modalidad más preferida del aspecto anterior de la
15 invención, la especie de *Candida* es *Candida albicans*.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual es capaz de enlazarse con, y/o de inhibir, la actividad funcional de una proteasa aspártica secretora (Sap) de *Candida spp.*, y que exhibe una identidad del 80
20 por ciento con uno o más dAbs Sap proporcionados en la presente.

En una modalidad preferida del aspecto anterior de la invención, el dAb exhibe una identidad del 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, ó 99 por ciento con uno o más dAbs de Sap2 proporcionados en la presente.

25 En una modalidad preferida del aspecto anterior de la

invención, el dAb de acuerdo con la presente invención es capaz de enlazarse con una o más proteínas Sap, como se definen en la presente, con una constante de índice $K_{\text{desactivación}}$ de entre 5×10^{-1} y $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$.

5 De una manera más conveniente, el dAb de acuerdo con el aspecto anterior de la invención es capaz de enlazarse con Sap2 con una constante de disociación (K_d) de cuando menos $100 \text{ } \mu\text{M}$ a 1 pM y/o una constante de índice $K_{\text{desactivación}}$ de entre 5×10^{-1} y $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual es capaz de enlazarse con, y/o de inhibir, la actividad funcional de la *manoproteína adhesina* (MP) de *Candida spp.*.

15 De conformidad con la presente invención, las secuencias designadas como ADR3-X representan las secuencias de los dAbs que se enlazan con la *manoproteína adhesina* (MP) (MP dAbs).

20 De acuerdo con el aspecto anterior de la invención, convenientemente el dAb es un dAb que se enlaza con MP65 que comprende, o de preferencia que consiste en, una o más secuencias mostradas en el listado de secuencias proporcionado en la presente, y designadas como ADR3-1, ADR3-1, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8, ADR3-9 y representadas por las SEQ ID NO:5 a la SEQ ID NO:13, respectivamente.

25 De acuerdo con el aspecto anterior de la invención, de una manera conveniente, el dAb es un dAb que se enlaza con MP65 que comprende, o de preferencia que consiste en, una o más secuencias

mostradas en el listado de secuencias proporcionado en la presente, y designadas como ADR3-1, ADR3-2, y ADR3-6, y designadas por las SEQ ID NOs:5, 6, y 10, respectivamente.

De una manera conveniente, el dAb de acuerdo con la presente invención es capaz de enlazarse con una o más MPs como se definen en la presente, con una constante de índice $K_{\text{desactivación}}$ de entre 5×10^{-1} y $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$.

De una manera más conveniente, el dAb de acuerdo con la presente invención es capaz de enlazarse con MP65 con una constante de disociación (K_d) de cuando menos $100 \mu\text{M}$ a 1 pM .

Las infecciones por *Candida* de cualquier especie se pueden tratar utilizando uno o más dAbs de acuerdo con la presente invención. La *Candida spp.* preferida para el tratamiento de acuerdo con la invención incluye cualquiera de aquéllas del grupo que consiste en las siguientes: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, y *Candida lusitanae*. En una modalidad más preferida del aspecto anterior de la invención, la especie de *Candida* es *Candida albicans*.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de un solo dominio (dAb) que es capaz de enlazarse con, y/o de inhibir, la actividad funcional de la *manoproteína adhesina* (MP) de *Candida spp.*, y que exhibe una identidad del 80 por ciento con los dAbs identificados como ADR3-1, ADR3-2, y ADR3-6, y designados con las SEQ ID NOs:5, 6, y 10, respectivamente.

En una modalidad preferida del aspecto anterior de la

invención, el dAb exhibe una identidad del 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 99, ó 99 por ciento con uno o más de los dAbs identificados como ADR3-1, ADR3-2, y ADR3-6, y designados con las SEQ ID NOs:5, 6, y 10, respectivamente.

5 En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera o más dAbs de acuerdo con la invención, y un vehículo, diluyente, y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 En una modalidad preferida del aspecto anterior de la invención, la composición farmacéutica comprende, o de preferencia consiste en, dAbs que se enlazan con MP65 y Sap2.

15 En una modalidad alternativa del aspecto anterior de la invención, la composición farmacéutica comprende, o de preferencia consiste en, uno o más dAbs que inhiben la actividad funcional de MP65 y Sap2.

20 En todavía un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la profilaxis y/o el tratamiento de infección por *Candida spp.* en un paciente, mediante la administración al paciente que necesite dicho tratamiento, de uno o más dAbs o una composición de acuerdo con la invención.

 Todavía en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un dAb de acuerdo con la presente invención, para utilizarse en la profilaxis y/o el tratamiento de infección por *Candida spp.*

25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un

método para la profilaxis y/o el tratamiento de infección por *Candida spp.* resistente al azol en un paciente, mediante la administración del paciente que necesite dicho tratamiento, de un dAb de Sap2 y/o MP65, en donde la *Candida* sea resistente a cualquiera o más
5 agentes del grupo que consiste en los siguientes: itraconazol, fluconazol, y voriconazol.

Todavía en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de infección por *Candida spp.* resistente al imidazol en un paciente, mediante la
10 administración al paciente que necesite dicho tratamiento, de un dAb de Sap2 y/o MP65, en donde la infección por *Candida spp.* sea resistente a cualquiera o más agentes del grupo que consiste en los siguientes: clotrimazol, econazol, fenticonazol, sulconazol, y tioconazol.

15 De acuerdo con los aspectos anteriores de la invención, un 'dAb' de Sap2 ó MP65 se refiere a un anticuerpo de un solo dominio como se describe en la presente, que es capaz de enlazarse con, y/o de inhibir, la actividad funcional de Sap2 y/o MP65 descritas en la presente.

20 De conformidad con los métodos y medicamentos de la invención descrita en la presente, las infecciones de *Candida spp.* preferidas para el tratamiento con uno o más dAbs/dAbs descritos en la presente, incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de las infecciones de *Candida spp.* del grupo que consiste en las
25 siguientes: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*,

Candida parapsilosis, *Candida krusei*, y *Candida lusitanae*.

Los expertos en la materia apreciarán que las infecciones por *Candida spp.* pueden ser sistémicas, vaginales, dérmicas, orales, mucosas, bronquiales, y pulmonares. Además, la infección por
5 levadura puede ser aparente como una onicomicosis (infección de la uña), candidiasis orofaríngea, candidiasis esofágica, o vulvovaginitis.

En una modalidad preferida de la invención, se utilizan uno o más dAbs/dAbs de acuerdo con la invención, para la profilaxis y/o el tratamiento de infección por *Candida spp.* vaginal o sistémica.

10 Empleando los métodos y medicamentos de la invención descrita en la presente, el tratamiento efectivo de la infección por *Candida spp.* en un paciente mediante la administración de un dAb/dAb de acuerdo con la invención, da como resultado una liberación acelerada de la infección fúngica; de preferencia, un
15 sanado/resolución de la infección del día 21 al día 28 después del comienzo del tratamiento con un dAb.

La presente invención considera que el tratamiento de *Candida spp.* empleando los métodos, los dAbs, y las composiciones de acuerdo con la presente invención, puede no dar como resultado una
20 erradicación total (100 por ciento) de *Candida spp.* en el sitio de infección o en el área afectada. Más aún, los presentes inventores consideran que puede ser benéfica alguna *Candida spp.* residual en el área afectada para el sujeto. En una modalidad preferida del aspecto anterior de la invención, el tratamiento con uno o más dAbs
25 o composiciones de los mismos de acuerdo con la presente

invención, reduce los niveles de *Candida spp.* hasta los niveles comensales (es decir, los niveles que se encuentran en los individuos sanos normales).

Los presentes inventores consideran que los dAbs y las
5 composiciones de acuerdo con la invención, son particularmente
útiles para la profilaxis y/o el tratamiento de los pacientes
inmunocomprometidos.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente
invención proporciona el uso de un dAb o de una composición de
10 acuerdo con la presente invención, en la preparación de un
medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de una o más
condiciones exhibidas por un individuo inmunocomprometido.

Aquéllos que están particularmente en riesgo de candidiasis
incluyen los pacientes inmunocomprometidos, incluyendo aquéllos
15 con SIDA, o infectados por VIH. Otros factores de riesgo incluyen
granulocitopenia, trasplante de médula ósea, tipo/duración de
quimioterapia, enfermedad del injerto contra el huésped, grado de
mucositis relacionada con la quimioterapia, colonización con
Candida, uso de antibióticos de amplio espectro, hemodiálisis y/o
20 azotemia, catéteres vasculares centrales, adictos a la heroína,
severidad de la enfermedad, hiper-alimentación, perforación
gastrointestinal recurrente o persistente, cirugía previa, trasplante de
órganos sólidos, y neonatos.

El tratamiento de la infección por *Candida spp.* en cualquiera o
25 más de los grupos de pacientes enlistados anteriormente, con uno o

más dAbs de acuerdo con la presente invención, se contempla en la presente.

En una modalidad preferida del aspecto anterior de la invención, el paciente inmunocomprometido está sufriendo de una o más condiciones del grupo que consiste en: SIDA, infección por VIH,
5 e infección por levadura.

Los métodos para la administración de los dAbs de acuerdo con la invención, se describen en la descripción detallada de la invención. De preferencia, el dAb se administra ya sea mediante
10 administración tópica y/o sistémica. En una modalidad preferida del aspecto anterior de la invención, la administración de una composición farmacéutica que comprenda los dAbs para el tratamiento de un paciente que sufra de candidiasis, incluye una infusión continua durante un período de tiempo, o una administración
15 de una sola dosis o bolo. Además, se prevé que en seguida de una administración de una sola dosis o de bolo, se puede administrar una segunda dosis de bolo, o se puede administrar una infusión continua.

En una modalidad preferida de la invención, los dAbs son dominios variables humanos, o comprenden regiones de estructura
20 humanas (FWs) y una o más CDRs heterólogas, que se enlacen específicamente con una o más proteínas Sap y/o MP descritas en la presente. Las CDRs y las regiones de estructura son aquellas regiones de un dominio variable de inmunoglobulina como se define en la base de datos Kabat de Secuencias de Proteínas de Interés
25 Inmunológico.

Las regiones de estructura humanas preferidas son aquéllas codificadas por los segmentos del gen de la línea germinal DP47 y DPK9. De una manera conveniente, FW1, FW2, y FW3 de un dominio V_H ó V_L, tienen la secuencia de FW1, FW2, ó FW3 de DP47 ó DPK9.

5 Las estructuras humanas opcionalmente pueden contener mutaciones, por ejemplo hasta aproximadamente cinco cambios de aminoácidos, o hasta aproximadamente diez cambios de aminoácidos colectivamente en las estructuras humanas utilizadas en los dAbs de la invención.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la profilaxis y/o el tratamiento de infección sistémica por *Candida spp.* en un paciente, en donde el método comprende el paso de administrar al paciente que necesite dicho tratamiento, uno o más de:

15 (i) Un anticuerpo que se enlace con una proteína Sap y/o MP.

(ii) Un fragmento de un anticuerpo que se enlace con una proteína Sap y/o MP.

(iii) Un dAb que se enlace con una proteína Sap y/o MP.

20 En un aspecto final, la presente invención proporciona un método para la profilaxis y/o el tratamiento de infección sistémica por *Candida spp.* en un paciente, en donde el método comprende el paso de administrar al paciente que necesite dicho tratamiento, uno o más de:

25 (i) Un anticuerpo que inhiba la actividad funcional de una

proteína Sap y/o MP.

(ii) Un fragmento de un anticuerpo que inhiba la actividad funcional de una proteína Sap y/o MP.

(iii) Un dAb que inhiba la actividad funcional de una proteína Sap y/o MP.

En una modalidad preferida del aspecto anterior de la invención, de preferencia el anticuerpo o fragmento del mismo es mono-específico. De una manera conveniente, la proteína Sap es Sap2, y la proteína MP es MP65.

En un aspecto adicional de la presente invención, los dAbs se pueden utilizar en un formato multimérico, en donde los dAbs se conjugan o se fusionan entre sí, ya sea directamente o bien mediante un enlazador adecuado (directamente, por ejemplo, mediante formación de enlace químico, tal como un enlace de amida entre los dAbs), o con un enlazador. Los enlazadores adecuados son conocidos en la técnica, y pueden ser cadenas simples de aminoácidos, tales como Ala-Ala-Ala, Gly₄Ser ó múltiplos del mismo, tales como (Gly₄Ser)₅, o se pueden basar químicamente, tales como los enlaces de N-hidroxisuccinimida o maleimida.

Además, los dAbs multiméricos pueden ser homogéneos, es decir, una especie de dAb, o heterogéneos, es decir, más de una especie de dAb, denominado como heteromultímero.

En una modalidad preferida, los dAbs de acuerdo con la invención se pueden formatear en dímeros, los cuales pueden ser homogéneos, es decir, los dAbs de Sap solamente, o heterogéneos,

es decir, los dAbs de Sap y los dAbs de MP.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a la prevención o el tratamiento de infección fúngica o colonización de dispositivos médicos. Por ejemplo, el uso de catéteres o cánulas, por ejemplo cánula vascular, catéteres venosos centrales, catéteres 5 urinarios, catéteres de diálisis peritoneal, y cánula de diálisis, en el tratamiento de enfermedades, están en riesgo de las infecciones fúngicas, particularmente por levadura, tal como la especie de *Candida*. La especie de *Candida* puede producir biopelículas sobre los dispositivos médicos, que con frecuencia son altamente 10 resistentes a los agentes anti-fúngicos, y con frecuencia necesitan de la remoción del dispositivo. Se ha demostrado que los anticuerpos de dominio de acuerdo con la invención, remueven o tratan las infecciones fúngicas del plástico.

En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una 15 secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, 20 ADR4-22, ADR4-23, y designadas como SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como SEQ ID NOs:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o difiere de la 25 secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5,

ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, en no más de 25 posiciones de aminoácidos, y tiene una secuencia de CDR1 que tiene cuando menos una identidad del 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, o ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, o ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o difiere de la

secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5,
 ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12,
 ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-
 19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID
 5 NO:14 a SEQ ID NO:35, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-
 5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ
 ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, en no más de 25
 posiciones de aminoácidos, y tiene una secuencia de CDR2 que tiene
 cuando menos una identidad del 50 por ciento con la secuencia de
 10 CDR2 de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7,
 ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14,
 ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-
 22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35,
 respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5,
 15 ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID
 NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo
 con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una
 secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de
 20 aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-
 7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-
 14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21,
 ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID
 NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4,
 25 ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como

SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o difiere de la
 secuencia de aminoácidos de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5,
 ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12,
 ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-
 5 19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID
 NO:14 a SEQ ID NO:35, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-
 5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ
 ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, en no más de 25
 posiciones de aminoácidos, y tiene una secuencia de CDR3 que tiene
 10 una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de
 CDR3 de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7,
 ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14,
 ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-
 22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35,
 15 respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5,
 ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID
 NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo
 con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una
 20 secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de
 aminoácidos de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6,
 ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13,
 ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-
 21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ
 25 ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4,

ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o difiere de la secuencia de aminoácidos de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, en no más de 25 posiciones de aminoácidos, y tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, y tiene una secuencia de CDR2 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-

3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o difiere de la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, en no más de 25 posiciones de aminoácidos, y tiene una secuencia de CDR2 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-

17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, y tiene una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o difiere de la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12,

ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y

5 designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, en no más de 25 posiciones de aminoácidos, y tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10,

10 ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13,

15 respectivamente, y tiene una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-

20 22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo

25 con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una

secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de
 aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-
 7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-
 14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21,
 5 ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID
 NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4,
 ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las
 SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o difiere de la
 secuencia de aminoácidos de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5,
 10 ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12,
 ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-
 19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID
 NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-
 3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y
 15 designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13,
 respectivamente, en no más de 25 posiciones de aminoácidos, y
 tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando
 menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de ADR4-2, ADR4-
 3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10,
 20 ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-
 17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas
 como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-
 1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y
 ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13,
 25 respectivamente, y tiene una secuencia de CDR2 que tiene una

identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, y tiene una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y

designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una
5 secuencia de CDR2 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las
10 SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo
15 con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las
20 SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

25 En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo

con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441), y una secuencia de CDR2 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441).

En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de CDR2 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441), y una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441).

En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441), y una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441).

En un aspecto adicional de la invención, un dAb de acuerdo con la invención se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441), y una secuencia de CDR2 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438),

y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441), y una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441).

En un aspecto adicional de la invención, la vida media en suero del dAb de acuerdo con la invención, se puede aumentar con una fracción de extensión de vida media. En una modalidad preferida, la fracción de extensión de vida media es polietilengicol (PEG).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Infección vaginal con *C. albicans* en ratas intravaginalmente tratadas con dAbs (triángulos huecos: ADR4-6 + SA40; X: ADR3-2 + SA40; cuadros negros: SA40 (control); círculos negros SA40 + gluconazol; triángulos negros: SA40 + pepstatina).

Figura 2: Infección vaginal con *C. albicans* en ratas tratadas intravaginalmente con los dAbs ADR4-6 (triángulos) ó ADR4-13 (rombos) anti-SAP2. Los controles fueron el dAb Hel4 irrelevante (círculos) o no tratados, o solamente desafiados con *C. albicans* (cuadros).

Figura 3: Infección vaginal con *C. albicans* en ratas intravaginalmente tratadas con los dominios anti-MP65 (triángulos negros ADR3-1; círculos ADR3-2; triángulos huecos ADR3-6; rombos Hel4; cuadros negros SA40 (control)).

Figura 4: Infección vaginal con una cepa resistente al

fluconazol (AIDS 68) de *C. albicans*, y tratada con dAbs anti-SAP2; rombos AIDS68 + ADR4-6; triángulos AIDS68 + ADR4-13; cuadros AIDS68; círculos AIDS68 + fluconazol.

Figura 5: Infección vaginal con *C. albicans* SA40 en ratas intravaginalmente tratadas con dAbs después de la agresión (1, 24, 48 horas) (cuadros negros: agresión fúngica de SA40 solamente; rombos: ADR4-6; cuadros huecos: dAb ADR3-6; triángulos: dAbs ADR4-6 y ADR3-6; círculos: fluconazol).

Figura 6: Infección por *C. albicans* tratada con los dAbs heterodiméricos (círculos: ADR3-6/ADR4-6; rombos: ADR4-6/ADR3-6; cuadros: SA40 (control); cuadros: dAbs heterodiméricos VH-VL (control)).

DEFINICIONES

Inmunoglobulina: Ésta se refiere a una familia de polipéptidos que retienen la característica de pliegue de inmunoglobulina de las moléculas de anticuerpos, que contiene dos hojas β , y usualmente, un enlace de disulfuro conservado. Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulina están involucrados en muchos aspectos de las interacciones celulares y no celulares *in vivo*, incluyendo los papeles ampliamente extendidos en el sistema inmune (por ejemplo, anticuerpos, moléculas receptoras de células-T, y similares), involucramiento en la adhesión celular (por ejemplo, las moléculas ICAM), y señalización intracelular (por ejemplo, las moléculas receptoras, tales como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas). La presente invención es aplicable a todas las

moléculas de la superfamilia de inmunoglobulina que posean dominios de enlace. De una manera preferible, la presente invención se refiere a anticuerpos.

Dominio: Un dominio es una estructura de proteína plegada que retiene su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. En términos generales, los dominios son responsables de las propiedades funcionales separadas de las proteínas, y en muchos casos se pueden agregar, remover, o transferir a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio.

El término “**dominio variable de anticuerpo individual**” (**dAb**), como se utiliza en la presente, se refiere a un dominio de polipéptido plegado que comprende secuencias características de los dominios variables de anticuerpos. Por consiguiente, incluye los dominios variables de anticuerpos completos y los dominios variables modificados, por ejemplo, en donde uno o más ciclos han sido reemplazados por secuencias adicionales, o los dominios variables de anticuerpos que se han truncado o que comprenden extensiones N- ó C-terminales, así como los fragmentos plegados de los dominios variables que retienen cuando menos en parte la actividad de enlace y la especificidad del dominio de longitud completa. Más aún, el término dAb incluye, dentro de su alcance, los dominios variables de anticuerpos individuales en donde uno o más ciclos hipervariables y/o CDRs han sido reemplazados con aquéllos de un segundo dominio variable, que puede ser del mismo o diferente origen.

Biblioteca: El término biblioteca se refiere a una mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos heterogéneos. La biblioteca se compone de miembros, cada uno de los cuales tienen una sola secuencia de polipéptido o de ácido nucleico. Hasta este grado, la biblioteca es sinónimo de repertorio. Las diferencias de secuencia entre los miembros de la biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede tomar la forma de una mezcla simple de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede estar en la forma de organismos o células, por ejemplo bacterias, virus, células de animales o plantas, y similares, transformados con una biblioteca de ácidos nucleicos. De preferencia, cada organismo o célula individual contiene solamente uno de un número limitado de miembros de la biblioteca. De una manera conveniente, los ácidos nucleicos se incorporan en los vectores de expresión, con el objeto de permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. Por consiguiente, en un aspecto preferido, una biblioteca puede tomar la forma de una población de organismos huésped, conteniendo cada organismo una o más copias de un vector de expresión que contenga un solo miembro de la biblioteca en forma de ácido nucleico que se pueda expresar para producir su miembro de polipéptido correspondiente. Por lo tanto, la población de organismos huésped tiene el potencial de codificar un gran repertorio de variantes de polipéptidos genéticamente diversos.

Anticuerpo: Un anticuerpo (por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD ó

IgE) o fragmento (tal como un Fab, F(ab')₂, Fv, Fv enlazado con disulfuro, Fv, scFv, anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada, scFv enlazado con disulfuro, diacuerpo, dAb), ya sea derivado de cualquier especie que produzca naturalmente un anticuerpo, o bien creado mediante tecnología de ADN recombinante; ya sea aislado de suero, células B, hibridomas, transfectomas, levadura, o bacterias).

Antígeno: Una molécula que se enlaza mediante un ligando de acuerdo con la presente invención. Típicamente, los antígenos se enlazan mediante ligandos de anticuerpos, y son capaces de elevar una respuesta a anticuerpos *in vivo*. Puede ser un polipéptido, proteína, ácido nucleico, u otra molécula. En términos generales, los dAbs de acuerdo con la invención se seleccionan para una especificidad objetivo contra un antígeno particular. En el caso de los anticuerpos convencionales y fragmentos de los mismos, el sitio de enlace de anticuerpo definido por los ciclos variables (L1, L2, L3, y H1, H2, H3) es capaz de enlazarse con el antígeno.

Epítipo: Una unidad de estructura convencionalmente enlazada por un par V_H/V_L de inmunoglobulina. Los epítopos definen el sitio de enlace mínimo para un anticuerpo, y por lo tanto, representan el objetivo de especificidad de un anticuerpo. En el caso de un anticuerpo de un solo dominio, un epítipo representa la unidad de estructura enlazada por un dominio variable en aislamiento.

Estructura universal: Una sola secuencia de estructura de anticuerpo correspondiente a las regiones de un anticuerpo

conservadas en la secuencia, como es definido por Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos), o correspondiente el repertorio o estructura de inmunoglobulina de la línea germinal humana, como es definido por Chothia y Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:910-917. La invención proporciona el uso de una sola estructura, o un conjunto de estas estructuras, que se ha encontrado que permiten la derivación de virtualmente cualquier especificidad de enlace a través de la variación en las regiones hipervariables solas.

Sustancialmente idéntica: Una primera secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que contiene un número suficiente de residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos a una segunda secuencia de aminoácidos o de nucleótidos, de tal manera que las primera y segunda secuencias de aminoácidos o nucleótidos tienen actividades similares. En el caso de los anticuerpos, el segundo anticuerpo tiene la misma especificidad de enlace, y tiene cuando menos el 50 por ciento de la afinidad de la misma.

Candidiasis sistémica: En esta solicitud, se utiliza el término "candidiasis sistémica", pero es sinónimo de los términos "candidiasis invasiva", "candidiasis diseminada", y "candidiasis hematógena".

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo

significado que es entendido comúnmente por un experto ordinario en este campo (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación, y bioquímica). Se emplean las técnicas convencionales para los métodos
5 moleculares, genéticos, y bioquímicos (véase en general, Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., y Ausubel y colaboradores, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., los cuales se incorporan
10 a la presente como referencia), y los métodos químicos.

(A) Infección por *Candida spp.*

Las infecciones por levadura normalmente resultan de un sobre-crecimiento de una especie de hongo denominado como *Candida albicans*. Pueden presentarse en la piel, debajo de las uñas,
15 o en las membranas mucosas de la boca, vagina, bronquios, y pulmones.

Las infecciones por levadura vaginales son un tipo de vaginitis. El síntoma clave de una infección por levadura es comezón de los genitales externos e internos, que con frecuencia está asociada con
20 una descarga blanca que puede ser espesa y/o grumosa (tipo queso cottage). Las infecciones severas conducen a inflamación del tejido y a subsiguiente enrojecimiento, hinchamiento, e inclusive sangrado puntual.

Las infecciones por *Candida* de cualquier especie se pueden
25 tratar utilizando uno o más dAbs de acuerdo con la presente

invención. La *Candida spp.* preferida para el tratamiento de acuerdo con la invención incluye cualquiera de aquéllas del grupo que consiste en las siguientes: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida lusitanae*. En una modalidad más preferida del aspecto anterior de la invención, la especie de *Candida* es *Candida albicans*.

Tratamientos médicos actuales

Los fármacos sobre el mostrador disponibles para tratar infecciones por levadura causadas por *Candida* incluyen clotrimazol (Gyne-Lotrimm®, Mycelex®), miconazol (Monistat®), y butoconazol (Femstat®).

Los fármacos de prescripción incluyen fluconazol oral (Diflucan®), tabletas vaginales de nistatina (Mycostatin®), crema vaginal de terconazol (Terazol®), y crema vaginal de butoconazol (Gynazole®). Las cremas antifúngicas también se pueden aplicar tópicamente a la vulva (genitales externos), para ayudar a aliviar la comezón.

Vaginitis

La vaginitis es la inflamación de la vagina.

Las tres causas generales de vaginitis son desequilibrio hormonal, irritación, e infección. La vaginitis infecciosa es más común en las mujeres en edad reproductora, y generalmente es causada por una de tres tipos de infecciones: vaginosis bacteriana (BV), candidiasis causada por infección por *Candida spp.* (por ejemplo, infección por *Candida albicans*), o tricomoniasis.

(B) dAbs que se enlazan con el factor de virulencia de *Candida spp.* de acuerdo con la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual es capaz de enlazarse con, y/o de inhibir, la actividad funcional de una proteasa aspártica secretora (Sap) de *Candida spp.*.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual es capaz de enlazarse con, y/o de inhibir, la actividad funcional de la *manoproteína adhesina* (MP) de *Candida spp.*.

(Bi) Factores de virulencia de *Candida spp.*

(i) SAPs

Las aspartil-proteinasas de secretadas (Sap), codificadas por una familia de 10 genes SAP, son determinantes de virulencia clave de los miembros patogénicos de la familia de *Candida*. Aquéllos de *C. albicans* son los más estudiados. Los 10 genes SAP de *C. albicans* codifican pre-pro-enzimas de aproximadamente 60 aminoácidos más largas que la enzima madura, las cuales se procesan cuando se transportan por medio de la senda secretora. Las enzimas maduras son de un tamaño de entre 35 y 50 kDa, y contienen motivos de secuencia típicos para todas las aspartil-proteinasas, incluyendo los dos residuos de aspartato conservados del sitio activo, y los residuos de cisteína conservados implicados en el mantenimiento de la estructura tridimensional. La mayoría de las proteínas Sap contienen sitios de N-glicosilación supuestos.

Actualmente se cree que los papeles principales de las proteinasas de *C. albicans* son proporcionar nutrición para las células, ayudar a la penetración e invasión, y evadir las respuestas inmunes. (Naglik, J., R. 2003 *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67. 3. 400-428).

(ii) Manoproteína adhesina

La colonización e infección con éxito de los tejidos del huésped por parte de las especies de *Candida* patogénicas, dependen de la capacidad de estos organismos para adherirse a las superficies mucosas. Las diferentes especies varían en su capacidad para adherirse, y existe una clara correlación entre la adhesión y la virulencia. El mecanismo de adhesión de la mayoría de las especies patogénicas, *Candida albicans*, a las células epiteliales, se ha estudiado con detalle, y se piensa que involucra las interacciones tipo lectina entre las moléculas de enlace específicas (adhesinas) sobre la superficie de la levadura, y las moléculas receptoras complementarias sobre la superficie celular epitelial. La información actual sugiere que la porción de proteína de la manoproteína localizada en los fibrilos sobre la superficie de la levadura, sirve como la adhesina, e interactúa con los receptores de glicósido que se encuentran sobre las células epiteliales.

(Bii) dAbs de enlace de Sap de acuerdo con la invención

Las proteasas aspárticas secretoras para enlazarse con uno o más dAbs de acuerdo con la presente invención incluyen las proteasas aspárticas secretoras Sap1, Sap2, Sap3, Sap4, Sap5 y

Sap6, Sap8, Sap9 y Sap10. En una modalidad preferida del aspecto anterior de la invención, el dAb que se enlaza con Sap2, dAb isa (dAb que se enlaza con Sap2). De preferencia, es un dAb que se enlaza con Sap2 que comprende, o de preferencia que consiste en, una o más secuencias mostradas en el listado de secuencias proporcionado en la presente, y designada como ADR4-2, designada como la SEQ ID NO:14, a ADR-423 designada como las SEQ ID NO:35. De acuerdo con la invención descrita en la presente, las secuencias de aminoácidos designadas como ADR4-X representan secuencias de aminoácidos de Sap2. De una manera conveniente, el dAb de acuerdo con la presente invención es capaz de enlazarse con una o más Saps como se definen en la presente, con una constante de índice $K_{\text{desactivación}}$ de entre 5×10^{-1} y $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$.

De una manera muy conveniente, el dAb de acuerdo con la presente invención es capaz de enlazarse con Sap2 con una constante de disociación (K_d) de cuando menos $100 \mu\text{M}$ a 1 pM .

(Biii) dAbs que se enlazan con MP de acuerdo con la invención

De conformidad con la presente invención, las secuencias designadas como ADR3-X en el listado de secuencias proporcionado en la presente, representan las secuencias de los dAbs que se enlazan con la manoproteína adhesina (MP) (dAbs).

De acuerdo con la presente invención, de una manera conveniente, el dAb es un dAb que se enlaza con MP65 que comprende, o de preferencia que consiste en, una o más secuencias mostradas en el listado de secuencias proporcionado en la presente,

y designadas como ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3- 5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8, ADR3-9 y representadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

5 De acuerdo con el aspecto anterior de la invención, de una manera muy conveniente, el dAb es un dAb que se enlaza con MP65 que comprende, o de preferencia que consiste en, una o más secuencias mostradas en el listado de secuencias proporcionado en la presente, y designadas como ADR3-1, ADR3-2, y ADR3-6, y designadas como las SEQ ID NOs:5, 6 y 10, respectivamente.

10 De forma conveniente, el dAb de acuerdo con la presente invención es capaz de enlazarse con una o más MPs como se definen en la presente, con una constante de índice $K_{\text{desactivación}}$ de entre 5×10^{-1} y $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$.

15 De una manera muy conveniente, el dAb de acuerdo con la presente invención es capaz de enlazarse con la MP65 con una constante de disociación (K_d) de cuando menos $100 \mu\text{M}$ a 1 pM .

20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual es capaz de enlazarse con, y/o de inhibir, la actividad funcional de la manoproteína adhesina (MP) de *Candida spp.*, y que exhibe una identidad del 80 por ciento con los dAbs identificados como ADR3-1, ADR3-2, y ADR3-6, y designados como las SEQ ID NOs:5, 6 y 10, respectivamente.

25 En una modalidad preferida del aspecto anterior de la invención, el dAb exhibe una identidad del 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94,

96, 98, ó 99 por ciento con uno o más de los dAbs identificados como ADR3-1, ADR3-2, y ADR3-6, y designados como las SEQ ID NOs:5, 6 y 10, respectivamente.

Cálculo de la identidad de secuencia de aminoácidos

5 Las secuencias similares u homólogas (por ejemplo, con una identidad de secuencia de cuando menos aproximadamente el 80 por ciento) a las secuencias que se dan a conocer en la presente, también son parte de la invención. En algunas modalidades, la identidad de secuencias al nivel de los aminoácidos puede ser de
10 aproximadamente el 85 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o más alta. Al nivel del ácido nucleico, la identidad de secuencias puede ser de aproximadamente el 90 por ciento, el 91 por ciento, el
15 92 por ciento, 93 por ciento, 94 por ciento, 95 por ciento, 96 por ciento, 97 por ciento, 98 por ciento, 99 por ciento o más alta. De una manera alternativa, existe una identidad sustancial cuando los segmentos de ácidos nucleicos se hibridan bajo condiciones de hibridación selectivas (por ejemplo, condiciones de hibridación de
20 muy alta restringencia) al complemento de la cadena. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura.

Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencias" o
25 "similitud" entre dos secuencias (los términos se utilizan de una

manera intercambiable en la presente) se llevan a cabo como sigue. Las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico para una alineación óptima, y se pueden desechar las secuencias no homólogas para propósitos de comparación). En una modalidad preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para propósitos de comparación es de cuando menos el 30 por ciento, de preferencia de cuando menos el 40 por ciento, más preferiblemente de cuando el 50 por ciento, y todavía de una manera muy preferible de cuando menos el 60 por ciento, e inclusive muy preferiblemente de cuando menos el 70 por ciento, el 80 por ciento, el 90 por ciento, el 100 por ciento de la longitud de la secuencia de referencia. Entonces se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o en las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se utiliza en la presente, "homología" de aminoácidos o de ácidos nucleicos es equivalente a una "identidad" de aminoácidos o de ácidos nucleicos). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, tomando en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesiten introducirse para

una alineación óptima de las dos secuencias.

De una manera conveniente, se emplea el algoritmo BLAST (versión 2.0) para la alineación de secuencias, con los parámetros establecidos en los valores por omisión. El algoritmo BLAST se describe con detalle en el sitio web mundial ("www") del National Center for Biotechnology Information (".ncbi") de los Institutos Nacionales de Salud (".nih") del gobierno de los Estados Unidos (".gov"), en el directorio "/Blast/", en el archivo "blast_help.html". Los parámetros de búsqueda se definen como sigue, y convenientemente se establecen en los parámetros definidos por omisión.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica), es el algoritmo de búsqueda heurística empleado por los programas blastp, blastn, blastx, tblastn, y tblastx; estos programas adscriben significado a sus descubrimientos empleando los métodos estadísticos de Karlin y Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 87(6):2264-8 (véase el archivo "blast_help.html" descrito anteriormente), con unas cuantas mejoras. Los programas BLAST se hicieron a la medida para la búsqueda de similitudes de secuencias, por ejemplo, para identificar homólogos para una secuencia requerida. Los programas en general no son útiles para la búsqueda de motivos-estilos. Para una discusión de las cuestiones básicas en la búsqueda de similitudes de las bases de datos de secuencias, véase Altschul y colaboradores (1994).

Los cinco programas BLAST disponibles en sitio web del

National Center for Biotechnology Information llevan a cabo las siguientes tareas:

“blastp” compara una secuencia de aminoácidos requerida contra una base de datos de secuencias de proteínas;

5 “blastn” compara una secuencia de nucleótidos requerida contra una base de datos de secuencias de nucleótidos;

“blastx” compara los productos de traducción conceptual de seis marcos de una secuencia de nucleótidos requerida (ambas cadenas) contra una base de datos de secuencias de proteínas;

10 “tblastn” compara una secuencia de proteína requerida contra una base de datos de secuencias de nucleótidos dinámicamente traducida en los seis marcos de lectura (ambas cadenas);

“tblastx” compara las traducciones de seis marcos de una secuencia de nucleótidos requerida contra las traducciones de seis marcos de una base de datos de secuencias de nucleótidos.

BLAST utiliza los siguientes parámetros de búsqueda:

HISTOGRAM (HISTOGRAMA) exhibe un histograma del puntaje para cada búsqueda; por omisión es sí. (Véase el parámetro H en el Manual de BLAST).

20 DESCRIPTIONS (DESCRIPCIONES) restringe el número de descripciones cortas de secuencias de emparejamiento reportadas para el número especificado; el límite por omisión es de 100 descripciones. (Véase el parámetro V en la página del manual). Véase también EXPECT (EXPECTATIVA) y CUTOFF (CORTE).

25 ALIGNMENTS (ALINEACIONES) restringe las secuencias de la

base de datos al número especificado para el cual se reportan pares de segmentos de alto puntaje ((HSPs); el límite por omisión es de 50. Si sucede que más secuencias de la base de datos que este límite satisfacen el umbral de significado estadístico para el reporte
5 (ver EXPECT (EXPECTATIVA) y CUTOFF (CORTE) más adelante), solamente se reportan los emparejamientos adscritos al significado estadístico mayor. (Véase el parámetro B en el Manual BLAST).

EXPECT (EXPECTATIVA). El umbral de significado estadístico para reportar los emparejamientos contra las secuencias de la base
10 de datos; el valor por omisión es 10, de tal manera que se espera que se encuentren 10 emparejamientos meramente por azar, de acuerdo con el modelo estocástico de Karlin y Altschul (1990). Si el significado estadístico adscrito a un emparejamiento es mayor que el umbral de expectativa, no se reportará el emparejamiento. Los
15 umbrales de expectativa más bajos son más estrictos, conduciendo a que se reporten menos emparejamientos por azar. Los valores fraccionarios son aceptables. (Véase el parámetro E en el Manual BLAST).

CUTOFF (CORTE). Puntaje de corte para reportar los pares de
20 segmentos de alto puntaje. El valor por omisión se calcula a partir del valor de expectativa (ver anteriormente). Los HSPs se reportan para una secuencia de una base de datos solamente si el significado estadístico adscrito a ellos es cuando menos tan alto como sería adscrito a un solo HSP que tenga un puntaje igual al valor de corte.
25 Los valores de corte más altos son más estrictos, conduciendo a que

se reporten menos emparejamientos por azar. (Ver el parámetro S en el Manual BLAST). Típicamente, los umbrales de significado pueden ser más intuitivamente manejados utilizando la expectativa.

MATRIX (MATRIZ). Especifica una matriz de puntaje alternativa para BLASTP, BLASTX, TBLASTN, y TBLASTX. La matriz por omisión es BLOSUM62 ((Henikoff y Hemkoff, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 89(22):10915-9). Las elecciones alternativas válidas incluyen: PAM40, PAM120, PAM250 e IDENTIDAD. No hay matrices de puntaje alternativas disponibles para BLASTN; la especificación de la directiva de la matriz en las peticiones de BLASTN, devuelve una respuesta de error.

STRAND (CADENA). Restringe una búsqueda de TBLASTN a solamente la cadena superior o inferior de las secuencias de la base de datos; o restringe una búsqueda de BLASTN, BLASTX, ó TBLASTX a solamente los marcos de lectura de la cadena superior o inferior de la secuencia requerida.

FILTER (FILTRO). Enmascara los segmentos de la secuencia requerida que tengan una baja complejidad de composición, como sea determinado por el programa SEG de Wootton y Federhen (1993) Computers and Chemistry 17:149-163, o los segmentos consistentes en repeticiones internas de periodicidad corta, determinadas por el programa XNU de Claverie y States, 1993, Computers and Chemistry 17:191-201, o para BLASTN, mediante el programa DUST de Tatusov y Lipman (véase el sitio web mundial de NCBI). La filtración puede eliminar los reportes estadísticamente significativos pero

biológicamente no interesantes de la salida de BLAST (por ejemplo, los impactos contra las regiones comunes ricas en ácido, ricas en básico, o ricas en prolina), dejando las regiones más biológicamente interesantes de la secuencia requerida disponibles para el
5 emparejamiento específico contra las secuencias de la base de datos.

La secuencia de baja complejidad encontrada por un programa de filtro se sustituye utilizando la letra "N" en la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, "N" repetido 13 veces), y la letra "X" en las
10 secuencias de proteínas (por ejemplo, "X" repetido 9 veces).

La filtración solamente se aplica a la secuencia requerida (o sus productos de traducción), y no a las secuencias de la base de datos. La filtración por omisión es DUST para BLASTN, y SEG para otros programas.

15 No es inusual que no se enmascare nada mediante SEG, XNU, o ambos, cuando se apliquen a las secuencias de SWISS-PROT, de modo que no se debe esperar que la filtración siempre produzca algún efecto. Adicionalmente, en algunos casos, las secuencias se enmascaran en su totalidad, indicando que se debe sospechar el
20 significado estadístico de cualesquiera emparejamientos reportados contra la secuencia requerida no filtrada.

NCBI-gi hace que los identificados NCBI gi se muestran en la salida, en adición al acceso y/o al nombre de *locus*.

De una manera muy preferible, las comparaciones de
25 secuencias se conducen utilizando el simple algoritmo de búsqueda

BLAST proporcionado en el sitio web mundial de NCBI descrito anteriormente, en el directorio "/BLAST".

(C) Preparación de dAbs de acuerdo con la invención

Los dAbs de acuerdo con la invención se pueden preparar de conformidad con las técnicas previamente establecidas, utilizadas en el campo del diseño de anticuerpos, para la preparación de scFv, anticuerpos de "fagos", y otras moléculas de anticuerpo diseñadas. Las técnicas para la preparación de anticuerpos, por ejemplo, se describen en las siguientes revisiones, y en las referencias citadas en las mismas: Winter y Milstein, (1991) *Nature* 349:293-299; Plueckthun (1992) *Immunological Reviews* 130:151-188; Wright y colaboradores, (1992) *Crit. Rev. Immunol.* 12: 125-168; Holliger, P. y Winter, G. (1993) *Curr. Op. Biotechn.* 4, 446-449; Carter y colaboradores (1995) *J. Hematother.* 4, 463-470; Chester, K. A. y Hawkins, R. E. (1995) *Trends Biotechn.* 13, 294-300; Hoogenboom, H. R. (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 125-126; Fearon, D. (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 618-619; Plückthun, A. y Pack, P. (1997) *Immunotechnology* 3, 83-105; Carter, P. y Merchant, A. M. (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 449-454; Holliger, P. y Winter, G. (1997) *Cancer Immunol. Immunother.* 45, 128-130.

Las técnicas empleadas para la selección de los dominios variables emplean bibliotecas y procedimientos de selección que son conocidos en este campo. Las bibliotecas naturales (Marks y colaboradores (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581; Vaughan y colaboradores (1996) *Nature Biotech.*, 14:309) que utilizan genes V

reconfigurados cosechados de las células-B humanas, son bien conocidas por los expertos en la materia. Las bibliotecas sintéticas (Hoogenboom y Winter (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 381; Barbas y colaboradores (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4457; Nissim y colaboradores (1994) *EMBO J.*, 13:692; Griffiths y colaboradores (1994) *EMBO J.* 13:3245; De Kruif y colaboradores (1995) *J. Mol. Biol.*, 248:97), se preparan mediante la clonación de los genes V de inmunoglobulina, normalmente utilizando reacción en cadena de la polimerasa. Los errores en el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa pueden conducir a un alto grado de selección aleatoria. Las bibliotecas de VH y/o VL se pueden seleccionar contra los antígenos o epítomos objetivo por separado.

Sistemas de vectores de biblioteca

Una variedad de sistemas de selección son conocidos en la técnica, los cuales son adecuados para utilizarse en la presente invención. Los ejemplos de estos sistemas se describen en seguida.

Los sistemas de expresión de bacteriófago lambda se pueden rastrear directamente como placas de bacteriófagos o como colonias de lisógenos, como se describe anteriormente (Huse y colaboradores (1989) *Science*, 246:1275; Caton y Koprowski (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 87; Mullinax y colaboradores (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 87:8095; Persson y colaboradores (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 88:2432), y son útiles en la invención. Aunque estos sistemas de expresión se pueden utilizar para rastrear hasta 10^6 miembros diferentes de una biblioteca, en realidad no son adecuados

para rastrear números más grandes (más de 10^6 miembros).

En la construcción de las bibliotecas, son de un uso particular los sistemas de exhibición de selección, los cuales hacen posible que se enlace un ácido nucleico con el polipéptido que exprese.

5 Como se utiliza en la presente, un sistema de exhibición de selección es un sistema que permite la selección, mediante elementos de exhibición adecuados, de los miembros individuales de la biblioteca, mediante el enlace de los ligandos genéricos y/u objetivo.

10 Los protocolos de selección para el aislamiento de los miembros deseados de las bibliotecas grandes son conocidos en la materia, como es tipificado por las técnicas de exhibición de fagos. Estos sistemas, en donde se exhiben diversas secuencias de péptidos sobre la superficie del bacteriófago filamentoso (Scott y
15 Smith (1990) *Science*, 249:386), han probado ser útiles para la creación de bibliotecas de fragmentos de anticuerpos (y las secuencias de nucleótidos que los codifican) para la selección *in vitro* y amplificación de fragmentos de anticuerpos específicos que se enlacen con un antígeno objetivo (McCafferty y colaboradores,
20 Publicación Internacional Número WO 92/01047). Las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones V_H y V_L se enlazan a los fragmentos genéticos que codifiquen señales líder que los dirijan hacia el espacio periplásmico de *E. coli*, y como resultado, se exhiben los fragmentos de anticuerpos resultantes sobre la superficie
25 del bacteriófago, típicamente como fusiones con las proteínas de

recubrimiento de bacteriófagos (por ejemplo, pIII ó pVIII). De una manera alternativa, los fragmentos de anticuerpos se exhiben externamente sobre las capsidas de fagos lambda (fagocuerpos). Una ventaja de los sistemas de exhibición basados en fagos es que, debido a que son sistemas biológicos, se pueden amplificar los miembros de la biblioteca seleccionados simplemente haciendo crecer el fago que contenga al miembro de la biblioteca seleccionado en células bacterianas. Adicionalmente, debido a que la secuencia de nucleótidos que codifica el miembro de la biblioteca de polipéptidos está contenida en un vector de fago o fagémido, la secuenciación, expresión, y la siguiente manipulación genética, es relativamente directa.

Los métodos para la construcción de bibliotecas de exhibición de anticuerpos de bacteriófagos y de las bibliotecas de expresión de fagos lambda son bien conocidos en la técnica (McCafferty y colaboradores (1990) *Nature*, 348:552; Kang y colaboradores (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.*, 88:4363; Clackson y colaboradores (1991) *Nature*, 352:624; Lowman y colaboradores (1991) *Biochemistry*, 30:10832; Burton y colaboradores (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.*, 88:10134; Hoogenboom y colaboradores (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19:4133; Chang y colaboradores (1991) *J. Immunol.*, 147:3610; Breitling y colaboradores (1991) *Gene*, 104:147; Marks y colaboradores (1991) *supra*; Barbas y colaboradores (1992) *supra*; Hawkins y Winter (1992) *J. Immunol.*, 22:867; Marks y colaboradores 1992, *J. Biol. Chem.*, 267:16007; Lerner y

colaboradores (1992) *Science*, 258: 1313, incorporados a la presente como referencia).

Un planteamiento particularmente conveniente ha sido el uso de bibliotecas de fagos (Huston y colaboradores, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci E. U. A.*, 85:5879-5883; Chaudhary y colaboradores (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci E.U.A.*, 87:1066-1070; McCafferty y colaboradores (1990) *supra*; Clackson y colaboradores (1991) *Nature*, 352: 624; Marks y colaboradores (1991) *J. Mol. Biol*, 222:581; Chiswell y colaboradores (1992) *Trends Biotech.*, 10:80; Marks y colaboradores (1992) *J. Biol. Chem.*, 267). Se han descrito diferentes modalidades de bibliotecas de scFv exhibidas sobre proteínas de recubrimiento de bacteriófagos. También se conocen refinamientos de los planteamientos de exhibición de fagos, por ejemplo, como se describe en las Publicaciones Internacionales Números WO96/06213 y WO92/01047 (Medical Research Council y colaboradores), y en la Publicación Internacional Número WO97/08320 (Morphosys), las cuales se incorporan a la presente como referencia.

Otros sistemas para generar bibliotecas de polipéptidos involucran el uso de la maquinaria enzimática sin células para la síntesis *in vitro* de los miembros de la biblioteca. En un método, se seleccionan las moléculas de ARN mediante rondas alternadas de selección contra un ligando objetivo y con amplificación de reacción en cadena de la polimerasa (Tuerk y Gold (1990) *Science*, 249:505; Ellington y Szostak (1990) *Nature*, 346:818). Se puede emplear una

técnica similar para identificar las secuencias de ADN que se enlacen con un factor de transcripción humano previamente determinado (Thiesen y Bach (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18:3203; Beaudry y Joyce (1992) *Science*, 257:635; Publicaciones Internacionales Números WO92/05258 y WO92/14843). De una manera similar, se puede utilizar la traducción *in vitro* para sintetizar polipéptidos, como un método para generar bibliotecas grandes. Estos métodos, que comprenden en general complejos de polisomas estabilizados, se describen adicionalmente en las Publicaciones Internacionales Números WO88/08453, WO90/05785, WO90/07003, WO91/02076, WO91/05058, y WO92/02536. Los sistemas de exhibición alternativos que no están basados en fagos, tales como los que se dan a conocer en las Publicaciones Internacionales Números WO95/22625 y WO95/11922 (Affyrnax), utilizan los polisómeros para exhibir los polipéptidos para la selección.

Una categoría todavía adicional de técnicas involucra la selección de repertorios en compartimientos artificiales, que permiten el enlace de un gen con su producto genético. Por ejemplo, un sistema de selección en donde se pueden seleccionar ácidos nucleicos que codifiquen productos genéticos deseables en microcápsulas formadas por emulsiones de agua en aceite, se describe en las Publicaciones Internacionales Números WO99/02671 y WO00/40712, y en Tawfik y Griffiths (1998) *Nature Biotechnol.* 16(7), 652-6. Los elementos genéticos que codifiquen un producto genético que tenga una actividad deseada se compartimentalizan en

microcápsulas, y luego se transcriben y/o se traducen, para producir sus productos genéticos respectivos (ARN ó proteína) dentro de las microcápsulas. Subsiguientemente se clasifican los elementos genéticos que produzcan el producto genético que tenga la actividad deseada. Este planteamiento selecciona los productos genéticos de interés mediante la detección de la actividad deseada mediante una variedad de elementos.

Construcción de biblioteca

Las bibliotecas pretendidas para la selección, se pueden construir empleando las técnicas conocidas en este campo, por ejemplo como se estipulan anteriormente, o se pueden adquirir en las fuentes comerciales. Las técnicas que son útiles en la presente invención se describen, por ejemplo, en la Publicación Internacional Número WO99/20749. Una vez que se selecciona un sistema de vector, y que se clonan una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen los polipéptidos de interés en el vector de la biblioteca, se puede generar diversidad dentro de las moléculas clonadas, emprendiendo mutagénesis antes de la expresión; de una manera alternativa, las proteínas codificadas se pueden expresar y seleccionar, como se describe anteriormente, antes de la mutagénesis, y se llevan a cabo rondas adicionales de selección. La mutagénesis de las secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen los polipéptidos estructuralmente optimizados se lleva a cabo mediante métodos moleculares convencionales. Es de un uso particular la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR (Mullis y

Faloona (1987) *Methods Enzymol.*, 155:335, incorporado a la presente como referencia). La reacción en cadena de la polimerasa, que utiliza múltiples ciclos de réplica del ADN, catalizados por una polimerasa de ADN dependiente del ADN termoestable para
5 amplificar la secuencia objetivo de interés, es bien conocida en la materia. La construcción de diferentes bibliotecas de anticuerpos se ha discutido en Winter y colaboradores (1994) *Ann. Rev. Immunology* 12, 433-55, y en las referencias citadas en el mismo.

La reacción en cadena de la polimerasa se lleva a cabo
10 utilizando un ADN de plantilla (de cuando menos 1fg; más útilmente de 1 a 1,000 ng), y cuando menos 25 picomoles de cebadores de oligonucleótidos. Puede ser conveniente utilizar una mayor cantidad de cebadores cuando la reserva de cebadores sea pesadamente heterogénea, debido a que cada secuencia está representada
15 solamente por una pequeña fracción de las moléculas de la reserva, y las cantidades llegan a ser limitantes en los ciclos de amplificación posteriores. Una mezcla de reacción típica incluye: 2 microlitros de ADN, 25 picomoles de cebador de oligonucleótido, 2.5 microlitros de regulador de reacción en cadena de la polimerasa 10X 1 (Perkin-
20 Elmer, Foster City, CA), 0.4 microlitros de dNTP 1.25 μ M, 0.15 microlitros (ó 2.5 unidades) de polimerasa de ADN Taq (Perkin-Elmer, Foster City, CA), y agua desionizada hasta un volumen total de 25 microlitros. Se sobrepone el aceite mineral, y se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa utilizando un ciclador térmico
25 programable. La duración y temperatura de cada paso de un ciclo de

reacción en cadena de la polimerasa, así como el número de ciclos, se ajustan de acuerdo con los requerimientos de restringencia en vigor. La temperatura y el tiempo de templado se determinan tanto por la eficiencia con la que se espere que se temple un cebador a una plantilla, como por el grado de mal emparejamiento que se vaya a tolerar; obviamente, cuando se amplifiquen y mutagenicen simultáneamente las moléculas de ácidos nucleicos, se requiere un mal emparejamiento, cuando menos en la primera ronda de síntesis. La capacidad para optimizar la restringencia de las condiciones de templado de cebadores está bien dentro del conocimiento de un experto moderado en la materia. Se utiliza una temperatura de templado de entre 30°C y 72°C. La desnaturalización inicial de las moléculas de plantilla normalmente se presenta entre 92°C y 99°C durante 4 minutos, seguido por 20 a 40 ciclos consistentes en desnaturalización (de 94°C a 99°C durante 15 segundos a 1 minuto), templado (la temperatura se determina como se discute anteriormente; de 1 a 2 minutos), y extensión (72°C durante 1 a 5 minutos, dependiendo de la longitud del producto amplificado). La extensión final generalmente es durante 4 minutos a 72°C, y puede ser seguida por un paso indefinido (de 0 a 24 horas) a 4°C.

i. Selección de la conformación de la cadena principal

Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulina comparten todos un pliegue similar para sus cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, aunque los anticuerpos son altamente diversos en términos de su secuencia primaria, la comparación de las secuencias y

estructuras cristalográficas ha revelado que, contrariamente a lo que se espera, cinco de los seis ciclos de enlace de antígeno de los anticuerpos (H1, H2, L1, L2, L3) adoptan un número limitado de conformaciones de la cadena principal, o estructuras canónicas (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol*, 196:901; Chothia y colaboradores (1989) *Nature*, 342: 877). El análisis de las longitudes de ciclos y los residuos clave, por consiguiente, ha hecho posible la predicción de las conformaciones de la cadena principal de H1, H2, L1, L2, y L3, que se encuentran en la mayoría de los anticuerpos humanos (Chothia y colaboradores (1992) *J. Mol. Biol*, 227:799; Tomlinson y colaboradores (1995) *EMBO J.*, 14:4628; Williams y colaboradores (1996) *J. Mol. Biol*, 264:220). Aunque la región H3 es mucho más diversa en términos de secuencia, longitud, y estructura (debido al uso de segmentos D), también forma un número limitado de conformaciones de la cadena principal para las longitudes de ciclo cortas que dependen de la longitud y la presencia de residuos particulares, o de tipos de residuos, en posiciones claves en el ciclo y en la estructura del anticuerpo (Martin y colaboradores (1996) *J. Mol. Biol*, 263: 800; Shirai y colaboradores (1996) *FEBS Letters*, 399:1).

Los dAbs de la invención se pueden proporcionar ellos mismos en la forma de bibliotecas. En un aspecto de la presente invención, se diseñan bibliotecas de dAbs y/o dominios, en donde se hayan seleccionado ciertas longitudes de ciclo y residuos clave para asegurar que se conozca la conformación de la cadena principal de

los miembros. De una manera conveniente, éstas son conformaciones reales de las moléculas de la superfamilia de inmunoglobulina que se encuentran en la naturaleza, para minimizar las oportunidades de que no sean funcionales, como se discute anteriormente. Los segmentos del gen V de la línea germinal sirven como una estructura básica adecuada para construir las bibliotecas de anticuerpos o de receptores de células-T; también son útiles otras secuencias. Se pueden presentar variaciones a una baja frecuencia, de tal manera que un pequeño número de miembros funcionales pueden poseer una conformación de la cadena principal alterada, lo cual no afecta su función.

La teoría de la estructura canónica también es útil para evaluar el número de conformaciones de la cadena principal diferentes codificadas por los ligandos, para predecir la conformación de la cadena principal basándose en las secuencias de los ligandos, y para elegir los residuos para la diversificación, que no afecten a la estructura canónica. Se sabe que, en el dominio V_{κ} , el ciclo L1 puede adoptar una de cuatro estructuras canónicas, el ciclo L2 tiene una sola estructura canónica, y que el 90 por ciento de los dominios V_{κ} humanos adoptan una de cuatro o cinco estructuras canónicas para el ciclo L3 (Tomlinson y colaboradores (1995) *supra*); por consiguiente, solamente en el dominio V_{κ} , diferentes estructuras canónicas pueden combinarse para crear un rango de conformaciones de la cadena principal diferentes. Dado que el dominio V_{λ} codifica un rango diferente de estructuras canónicas para

los ciclos L1, L2, y L3, y que los dominios V_{κ} y V_{λ} pueden emparejarse con cualquier dominio V_H que pueda codificar varias estructuras canónicas para los ciclos H1 y H2, el número de combinaciones de estructuras canónicas observadas para estos cinco ciclos es muy grande. Esto implica que la generación de diversidad en la conformación de la cadena principal puede ser esencial para la producción de un amplio rango de especificidades de enlace. Sin embargo, mediante la construcción de una biblioteca de anticuerpos basada en una sola conformación de la cadena principal conocida, se ha encontrado, contrariamente a la expectativa, que no se requiere diversidad en la conformación de la cadena principal para generar suficiente diversidad para dirigirse sustancialmente a todos los antígenos. Todavía de una manera más sorprendente, la conformación de la cadena principal individual no necesita ser una estructura en consenso - se puede utilizar una sola conformación que se presente naturalmente como la base para una biblioteca entera. Por consiguiente, en un aspecto preferido, los dAbs de la invención poseen una sola conformación de la cadena principal conocida.

La conformación de la cadena principal individual que se selecciona de preferencia es un lugar común entre las moléculas del tipo de la superfamilia de inmunoglobulina en cuestión. Una conformación es un lugar común cuando se observa que un número significativo de moléculas que se presentan naturalmente la adoptan. De conformidad con lo anterior, en un aspecto preferido de la

invención, se considera por separado la presentación natural de las diferentes conformaciones de la cadena principal para cada ciclo de enlace de un dominio de inmunoglobulina, y luego se selecciona un dominio variable que se presente naturalmente, el cual posea la combinación deseada de conformaciones de la cadena principal para los diferentes ciclos. Si no hay ninguna disponible, se puede seleccionar el equivalente más cercano. Es preferible que la combinación deseada de conformaciones de la cadena principal para los diferentes ciclos sea creada mediante la selección de los segmentos genéticos de la línea germinal que codifiquen las conformaciones de la cadena principal deseadas. Es más preferible que los segmentos genéticos de la línea germinal seleccionados se expresen con frecuencia en la naturaleza, y es más preferible que sean los que se expresen con más frecuencia de todos los segmentos genéticos de la línea germinal naturales.

En el diseño de los dAbs o bibliotecas de los mismos, se puede considerar por separado la incidencia de las diferentes conformaciones de la cadena principal para cada uno de los seis ciclos de enlace de antígeno. Para H1, H2, L1, L2, y L3, se selecciona una conformación dada que se adopta entre el 20 por ciento y el 100 por ciento de los ciclos de enlace de antígeno de las moléculas que se presentan naturalmente. Típicamente, se observa que la incidencia es mayor del 35 por ciento (es decir, entre el 35 por ciento y el 100 por ciento), e idealmente mayor del 50 por ciento, o todavía mayor del 65 por ciento. Debido a que la gran mayoría de

ciclos H3 no tienen estructuras canónicas, es preferible seleccionar una conformación de la cadena principal que sea un lugar común entre los ciclos que sí exhiban las estructuras canónicas. Para cada uno de los ciclos, por consiguiente, se selecciona la conformación que se observe más frecuente en el repertorio natural. En los anticuerpos humanos, las estructuras canónicas más populares (CS) para cada ciclo son como sigue: H1 - CS 1 (79 por ciento del repertorio expresado), H2 - CS 3 (46 por ciento), L1 - CS 2 de V_{κ} (39 por ciento), L2 - CS 1 (100 por ciento), L3 - CS 1 de V_{κ} (36 por ciento) (el cálculo asume una proporción de $\kappa:\lambda$ de 70:30, Hood y colaboradores (1967) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 48:133). Para los ciclos H3 que tengan estructuras canónicas, parece ser que una longitud de CDR3 ((Kabat y colaboradores (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos) de siete residuos con un puente de sal desde el residuo 94 hasta el residuo 101, es la más común. Existen cuando menos 16 secuencias de anticuerpo humanas en la biblioteca de datos de EMBL, con la longitud de H3 requerida y los residuos clave para formar esta conformación, y cuando menos dos estructuras cristalográficas en el banco de datos de proteínas, que se pueden utilizar como una base para la modelación de anticuerpos (2cgr y 1tet). También son adecuados los segmentos genéticos de la línea germinal más frecuentemente expresados en esta combinación de estructuras canónicas, que son el segmento V_H 3-23 (DP-47), el segmento J_H JH4b, el segmento V_{κ}

O2/O12 (DPK9), y el segmento $J_k J_{k1}$. Los segmentos V_H DP45 y DP38 también son adecuados. Estos segmentos, por consiguiente, se pueden utilizar en combinación como una base para construir una biblioteca con la conformación de la cadena principal individual deseada.

De una manera alternativa, en lugar de elegir la conformación de una sola cadena principal, basándose en la presentación natural de las diferentes conformaciones de la cadena principal para cada uno de los ciclos de enlace en aislamiento, se utiliza la presentación natural de las combinaciones de conformaciones de la cadena principal como la base para elegir la conformación de la cadena principal individual. En el caso de los anticuerpos, por ejemplo, se puede determinar la presentación natural de las combinaciones de la estructura canónica para cualesquiera dos, tres, cuatro, cinco, o para los seis ciclos de enlace de antígeno. Aquí, es preferible que la conformación elegida sea un lugar común en los anticuerpos que se presentan naturalmente, y más preferible que se observe con más frecuencia en el repertorio natural. Por consiguiente, en los anticuerpos humanos, por ejemplo, cuando se consideran combinaciones naturales de los cinco ciclos de enlace de antígeno, H1, H2, L1, L2, y L3, se determina la combinación más frecuente de las estructuras canónicas, y luego se combina con la conformación más popular para el ciclo H3, como una base para elegir la conformación de la cadena principal individual.

25

ii. Diversificación de la secuencia canónica

Habiendo seleccionado varias conformaciones de la cadena principal conocidas, o de preferencia una sola conformación de la cadena principal conocida, los dAbs de acuerdo con la invención, o
5 las bibliotecas para utilizarse en la invención, se pueden construir variando el sitio de enlace de la molécula, con el objeto de generar un repertorio con diversidad estructural y/o funcional. Esto significa que se generan variantes, de tal manera que posean suficiente diversidad en su estructura y/o en su función, de tal modo que sean
10 capaces de proporcionar un rango de actividades.

La diversidad deseada típicamente se genera variando la molécula seleccionada en una o más posiciones. Las posiciones que se vayan a cambiar se pueden elegir al azar, o de preferencia se seleccionan. Entonces se puede lograr la variación ya sea mediante
15 selección aleatoria, durante la cual el aminoácido residente es reemplazado por cualquier aminoácido o análogo del mismo, natural o sintético, que produzca un número muy grande de variantes, o mediante el reemplazo del aminoácido residente con un o más de un subconjunto definido de aminoácidos, produciendo un número más
20 limitado de variantes.

Se han reportado diferentes métodos para introducir esta diversidad. La reacción en cadena de la polimerasa susceptible a error (Hawkins y colaboradores (1992) *J. Mol. Biol.*, 226:889), mutagénesis química (Deng y colaboradores (1994) *J. Biol. Chem.*,
25 269:9533), o cepas mutadoras bacterianas (Low y colaboradores

(1996) *J. Mol. Biol.*, 260:359), se pueden utilizar para introducir mutaciones aleatorias en los genes que codifiquen la molécula. Los métodos para mutar las posiciones seleccionadas también son bien conocidos en este campo, e incluyen el uso de oligonucleótidos mal emparejados u oligonucleótidos degenerados, con o sin el uso de
 5 reacción en cadena de la polimerasa. Por ejemplo, se han creado varias bibliotecas de anticuerpos sintéticos mediante la dirección de mutaciones hacia los ciclos de enlace de antígeno. La región H3 de un Fab de enlace de toxoide de tétanos humano se ha seleccionado
 10 aleatoriamente para crear un rango de nuevas especificidades de enlace (Barbas y colaboradores (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 89:4457). Las regiones H3 y L3 aleatorias o semi-aleatorias se han adjuntado a los segmentos genéticos V de la línea germinal para producir bibliotecas grandes con regiones de estructura no mutadas
 15 (Hoogenboom y Winter (1992) *J. Mol. Biol.*, 111:381; Barbas y colaboradores (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 89:4457; Nissim y colaboradores (1994) *EMBO J.*, 13:692; Griffiths y colaboradores (1994) *EMBO J.*, 13:3245; De Kruif y colaboradores (1995) *J. Mol. Biol.*, 248:97). Esta diversificación se ha extendido para incluir
 20 algunos o todos los otros ciclos de enlace de antígeno (Cramer y colaboradores (1996) *Nature Med.*, 2:100; Riechmann y colaboradores (1995) *Bio/Technology*, 13:475; Morphosys, Publicación Internacional Número WO97/08320, *supra*).

Debido a que la selección aleatoria de ciclo tiene el potencial
 25 para crear aproximadamente más de 10^{15} estructuras para H3

solamente, y un número similarmente grande de variantes para los otros cinco ciclos, no es factible, empleando la tecnología de transformación actual, o inclusive empleando los sistemas sin células, producir una biblioteca que represente todas combinaciones posibles. Por ejemplo, en una de las bibliotecas más grandes construidas hasta la fecha, se generaron 6×10^{10} anticuerpos diferentes, lo cual solamente es una fracción de la diversidad potencial para una biblioteca de este diseño (Griffiths y colaboradores (1994) *supra*).

En una modalidad preferida, solamente se diversifican los residuos que estén directamente involucrados en la creación o modificación de la función deseada de la molécula. Para muchas moléculas, la función será enlazar un objetivo, y por consiguiente, la diversidad se debe concentrar en el sitio de enlace objetivo, mientras que se eviten los residuos cambiantes, los cuales son cruciales para el empaque global de la molécula, o para mantener la conformación de la cadena principal elegida.

Diversificación de la secuencia canónica como se aplica a los dominios de anticuerpos

En el caso de los dAbs de anticuerpos, el sitio de enlace para el objetivo con más frecuencia es el sitio de enlace de antígeno. Estos residuos son extremadamente diversos en el repertorio de anticuerpos humanos, y se sabe que hacen contactos en los complejos de anticuerpo/antígeno de alta resolución. Por ejemplo, en L2 se sabe que las posiciones 50 y 53 son diversas en los

anticuerpos que se presentan naturalmente, y se sabe que hacen contacto con el antígeno. En contraste, el planteamiento convencional habría sido diversificar todos los residuos en la Región Determinante de Complementariedad (CDR1) correspondiente, como es definido por Kabat y colaboradores (1991, *supra*), comparándose
5 unos siete residuos con los dos diversificados en la biblioteca para utilizarse de acuerdo con la invención. Esto representa una mejora significativa en términos de la diversidad funcional requerida para crear un rango de especificidades de enlace de antígeno.

10 En la naturaleza, la diversidad de anticuerpos es el resultado de dos procesos: recombinación somática de los segmentos genéticos V, D, y J de la línea germinal para crear un repertorio primario puro (denominado como diversidad de la línea germinal y de unión), e hipermutación somática de los genes V reconfigurados
15 resultantes. El análisis de las secuencias de anticuerpos humanos ha demostrado que la diversidad en el repertorio primario está enfocada en el centro del sitio de enlace de antígeno, mientras que la hipermutación somática extiende la diversidad hasta regiones en la periferia del ciclo de enlace de antígeno que están altamente
20 conservadas en el repertorio primario (véase Tomlinson y colaboradores (1996) *J. Mol. Biol.*, 256:813). Esta complementariedad probablemente ha evolucionado como una estrategia eficiente para buscar espacio de secuencias, y, aunque es aparentemente única para los anticuerpos, se puede aplicar
25 fácilmente a otros repertorios de polipéptidos. Los residuos que se

varían son un subconjunto de aquéllos que forman el sitio de enlace para el objetivo. Diferentes subconjuntos de residuos (incluyendo los traslapados) en el sitio de enlace objetivo se diversifican en diferentes etapas durante la selección, si se desea.

5 En el caso de un repertorio de anticuerpos, se crea un repertorio "puro" inicial, en donde se diversifican algunos, pero no todos, de los residuos, en el sitio de enlace de antígeno. Como se utiliza en la presente, en este contexto, el término "puros" se refiere a las moléculas de anticuerpos que no tienen un objetivo
10 previamente determinado. Estas moléculas se parecen a aquéllas que son codificadas por los genes de inmunoglobulina de un individuo que no haya sufrido diversificación inmune, como es el caso con los individuos fetales y recién nacidos, cuyos sistemas inmunes no han sido agredidos por una amplia variedad de estímulos
15 antigénicos. Entonces se selecciona este repertorio contra un rango de antígenos o epítomos. Si se requiere, se puede introducir entonces más diversidad fuera de la región diversificada en el repertorio inicial. Este repertorio maduro se puede seleccionar para la función, especificidad, o afinidad modificadas.

20 En la construcción de las bibliotecas para utilizarse en la invención, la diversificación de las posiciones seleccionadas típicamente se logra al nivel del ácido nucleico, alterando la secuencia de codificación que especifica la secuencia del polipéptido, de tal manera que se puede incorporar un número de
25 posibles aminoácidos (los 20 ó un subconjunto de los mismos) en

esa posición. Utilizando la nomenclatura de IUPAC, el codón más versátil es NNK, que codifica todos los aminoácidos, así como el codón de paro TAG. El codón NNK de preferencia se utiliza con el objeto de introducir la diversidad requerida. También son útiles otros
5 codones que logren los mismos fines, incluyendo el codón NNN, que conduce a la producción de los codones de paro adicionales TGA y TAA.

Una característica de la diversidad de cadena lateral en el sitio de enlace de antígeno de los anticuerpos humanos es una inclinación
10 pronunciada que favorece a ciertos residuos de aminoácidos. Si la composición de aminoácidos de las 10 posiciones más diversas en cada de las regiones V_H , V_K , y V_L se suman, más del 76 por ciento de la diversidad de cadena lateral viene solamente desde siete residuos diferentes, siendo éstos serina (24 por ciento), tirosina (14 por
15 ciento), asparagina (11 por ciento), glicina (9 por ciento), alanina (7 por ciento), aspartato (6 por ciento), y treonina (6 por ciento). Esta inclinación hacia los residuos hidrofílicos y los residuos pequeños que pueden proporcionar flexibilidad de la cadena principal, probablemente refleja la evolución de las superficies que tienen
20 predisposición al enlace con un amplio rango de antígenos o epítomos, y puede ayudar a explicar la promiscuidad requerida de los anticuerpos en el repertorio primario.

Debido a que es preferible imitar esta distribución de aminoácidos, la distribución de los aminoácidos en las posiciones
25 que se vayan a variar de preferencia imita a la que se ve en el sitio

de enlace de antígeno de los anticuerpos. Esta inclinación en la sustitución de los aminoácidos que permite la selección de ciertos polipéptidos (no solamente polipéptidos de anticuerpos) contra un rango de antígenos objetivo, se aplica fácilmente a cualquier repertorio de polipéptidos. Existen diferentes métodos para inclinar la distribución de aminoácidos en la posición que se vaya a variar (incluyendo el uso de mutagénesis de tri-nucleótidos, véase la Publicación Internacional Número WO97/08320), de los cuales, el método preferido, debido a la facilidad de síntesis, es el uso de codones degenerados convencionales. Mediante una comparación del perfil de aminoácidos codificado por todas las combinaciones de codones degenerados (con degeneración individual, doble, triple, y cuádruple en proporciones iguales en cada posición), con el uso de los aminoácidos naturales, es posible calcular el codón más representativo. Los codones (AGT)(AGC)T, (AGT)(AGC)C, y (AGT)(AGC)(CT) - es decir, DVT, DVC, y DVY, respectivamente, utilizando la nomenclatura de IUPAC - son aquéllos más cercanos al perfil de aminoácidos deseado: codifican el 22 por ciento de serina y el 11 por ciento de tirosina, asparagina, glicina, alanina, aspartato, treonina, y cisteína. Por consiguiente, de una manera preferible, se construyen bibliotecas utilizando cualquiera de los codones DVT, DVC, ó DVY, en cada una de las posiciones diversificadas.

D. Caracterización de los dAbs de acuerdo con la presente invención

El enlace de los dAbs de acuerdo con la invención con sus

antígenos específicos (factores de virulencia de *Candida spp.*), o epítomos, se puede probar mediante métodos que serán familiares para los expertos en la materia, e incluyen ELISA. En una modalidad preferida, se prueba el enlace utilizando un ELISA de fago
5 monoclonal.

El ELISA de fago se puede llevar a cabo de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado: en seguida se estipula un protocolo de ejemplo.

Las poblaciones de fagos producidos en cada ronda de
10 selección se pueden rastrear para determinar el enlace mediante ELISA con el antígeno o epítomo seleccionado, con el fin de identificar los anticuerpos de fagos "policlonales". El fago de las colonias bacterianas infectadas individuales de estas poblaciones se puede rastrear entonces mediante un ELISA, para identificar los
15 anticuerpos de fagos "monoclonales". También es deseable rastrear los fragmentos de anticuerpos solubles para determinar el enlace con el antígeno o epítomo, y esto también se puede emprender mediante un ELISA, utilizando reactivos, por ejemplo, contra una marca C- ó N-terminal (véase, por ejemplo, Winter y colaboradores (1994) *Ann.*
20 *Rev. Immunology* 12, 433-55, y las referencias citadas en el mismo).

La diversidad de los anticuerpos monoclonales de fago seleccionados también se puede evaluar mediante electroforesis en gel de los productos de reacción en cadena de la polimerasa (Marks y colaboradores, 1991, *supra*; Nissim y colaboradores, 1994, *supra*),
25 sondeo (Tomlinson y colaboradores, (1992) *J. Mol. Biol.* 227, 776), o

mediante la secuenciación del ADN del vector.

E. Tratamiento de infección por *Candida spp.* utilizando los dAbs de acuerdo con la invención

Los dAbs seleccionados de acuerdo con el método de la presente invención se pueden emplear en aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, en aplicaciones de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, en aplicaciones de ensayo y reactivos *in vitro*, y similares. Por ejemplo, los dAbs se pueden utilizar en técnicas de ensayo basadas en anticuerpos, tales como las técnicas de ELISA, de conformidad con los métodos conocidos por los expertos en este campo.

Como se alude anteriormente, los dAbs de acuerdo con la invención son útiles en los procedimientos de diagnóstico, profilácticos, y terapéuticos. Los anticuerpos del grupo efector de un solo dominio (dAbs) seleccionados de conformidad con la invención, son útiles diagnósticamente en el análisis Western, y en la detección de proteínas *in situ*, mediante procedimientos inmunohistoquímicos convencionales; para utilizarse en estas aplicaciones, los anticuerpos de un repertorio seleccionado se pueden marcar de acuerdo con las técnicas conocidas en la materia. En adición, estos polipéptidos de anticuerpos se pueden utilizar en preparación de los procedimientos de cromatografía por afinidad, cuando forman complejo con un soporte cromatográfico, tal como una resina. Todas estas técnicas son bien conocidas por un experto en este campo.

Los dAbs sustancialmente puros de acuerdo con la presente invención, de una homogeneidad de cuando menos el 90 al 95 por

ciento, son los preferidos para administrarse a un mamífero, y con una homogeneidad del 98 al 99 por ciento o más son los más preferidos para usos farmacéuticos, en especial cuando el mamífero es un ser humano. Una vez purificados, parcialmente o hasta la
5 homogeneidad, según se desee, los dAbs seleccionados se pueden utilizar diagnósticamente y/o terapéuticamente (incluyendo extracorpóreamente), o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo, teñidos inmunofluorescentes, y similares (Lefkovite y Pernis, (1979 y 1981) Immunological Methods,
10 Volúmenes I y II, Academic Press, NY).

Los dAbs de la presente invención típicamente encontrarán uso en la prevención, supresión, o tratamiento de infección por *Candida spp.*, en particular infección por *Candida albicans*, en un individuo.

En la presente solicitud, el término "prevención" involucra la
15 administración de la composición protectora antes de la inducción de la enfermedad. "Supresión" se refiere a la administración de la composición después de un evento inductivo, pero antes de la aparición clínica de la enfermedad. "Tratamiento" involucra la administración de la composición protectora después de que llegan a
20 manifestarse los síntomas de la enfermedad.

Los sistemas modelo animales que se pueden utilizar para rastrear los dAbs en la protección contra, o el tratamiento de, infección por *Candida spp.*, están disponibles, y serán familiares para los expertos en la técnica. En los ejemplos se proporcionan los
25 detalles de algunos sistemas modelo utilizados. La infección por

Candida spp. puede presentarse sistémicamente, mucosamente, bronquialmente, en los pulmones, debajo de las uñas, oralmente, o vaginalmente. En una modalidad preferida de la invención descrita en la presente, se utilizan uno o más dAbs de acuerdo con la
5 invención para el tratamiento de infección sistémica o vaginal por *Candida spp.*, en particular infección sistémica o vaginal por *Candida albicans*.

Los dAbs dados a conocer en la presente se pueden formatear para extender su vida media en suero *in vivo*. La mayor vida media *in vivo* es útil en las aplicaciones *in vivo* de inmunoglobulinas, en
10 especial anticuerpos, y más especialmente fragmentos de anticuerpos de tamaño pequeño, tales como los dAbs. Estos fragmentos (Fvs, Fvs enlazado con disulfuro, Fvs, Fabs, scFvs, dAbs) se eliminan rápidamente del cuerpo, lo cual puede limitar
15 severamente las aplicaciones clínicas.

Un dAb se puede formatear como un fragmento de enlace de antígeno más grande de un anticuerpo, o como un anticuerpo (por ejemplo, se puede formatear como un Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv), que tenga un tamaño hidrodinámico más grande. Los dAbs
20 también se pueden formatear para tener un tamaño hidrodinámico más grande, por ejemplo, mediante la unión de un grupo polialquilenglicol (por ejemplo, un grupo polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polibutilenglicol), albúmina en suero, transferrina, receptor de transferrina o cuando menos la porción de enlace de
25 transferrina del mismo, una región Fc de anticuerpo, o mediante

conjugación con un dominio de anticuerpo. En algunas modalidades, el dAb es PEGilado. De preferencia, el dAb PEGilado se enlaza con SAP y MP con sustancialmente la misma afinidad o avidez que el mismo dAb que no esté PEGilado. Por ejemplo, los dAbs pueden ser un dAb PEGilado que comprenda un dAb que se enlace con SAP y MP con una avidez que difiera de la avidez del dAb en una forma no PEGilada por no más de un factor de aproximadamente 1,000, de preferencia no más de un factor de aproximadamente 100, más preferiblemente no más de un factor de aproximadamente 10, o con una afinidad de avidez sustancialmente sin cambios en relación con la forma no PEGilada. Véase la Publicación del TCP Número PCT/GB03/002804, presentada el 30 de junio de 2003 (Publicación Internacional Número WO 2004/081026), con respecto a la PEGilación de los dominios variables individuales y los dAbs, los métodos adecuados para su preparación, la mayor vida media *in vivo* de los dominios variables individuales y monómeros y multímeros de dAb PEGilados, los polietilenglicoles adecuados, los tamaños hidrodinámicos preferidos de los polietilenglicoles, y los tamaños hidrodinámicos preferidos de los dominios variables individuales y los monómeros y multímeros de dAb PEGilados. Toda la enseñanza de la Publicación del TCP Número PCT/GB03/002804 (Publicación Internacional Número WO 2004/081026), incluyendo las porciones referidas anteriormente, se incorpora a la presente como referencia.

El tamaño hidrodinámico de los dAbs (por ejemplo, monómeros y multímeros de dAb) de la invención, se puede determinar

empleando métodos que son bien conocidos en este campo. Por ejemplo, se puede utilizar cromatografía de filtración de gel para determinar el tamaño hidrodinámico de un dAb. Las matrices de filtración de gel adecuadas para determinar los tamaños hidrodinámicos de los dAbs, tales como las matrices de agarosa reticuladas, son bien conocidas y están fácilmente disponibles.

El tamaño de un formato de dAb por ejemplo, el tamaño de una fracción de PEG unida a un dAb) se puede variar dependiendo de la aplicación deseada. Por ejemplo, cuando se pretende que un dAb salga de la circulación y entre a los tejidos periféricos, es deseable mantener el tamaño hidrodinámico del ligando bajo para facilitar la extravasación desde la corriente sanguínea. De manera alternativa, cuando se desee hacer que el dAb permanezca en la circulación sistémica durante un período de tiempo más largo, se puede aumentar el tamaño del dAb, por ejemplo, mediante el formateo como una proteína tipo Ig, o mediante la adición de una fracción de PEG de 30 a 60 kDa (por ejemplo, PEG lineal o ramificado, PEG de 30 a 40 kDa, tal como la adición de dos fracciones de PEG de 20 kDa). El tamaño del formato del dAb se puede hacer a la medida para lograr una vida media en suero deseada *in vivo*, por ejemplo, para controlar la exposición a una toxina y/o para reducir los efectos secundarios de los agentes tóxicos.

El tamaño hidrodinámico del dAb y su vida media en suero también se puede aumentar mediante la conjugación o el enlace del dAb con un dominio de enlace (por ejemplo, anticuerpo o fragmento

de anticuerpo) que se enlace con un antígeno o epítipo que aumente la vida media *in vivo*, como se describe en la presente. Por ejemplo, el dAb se puede conjugar o enlazar con una albúmina anti-suero o con un anticuerpo del receptor Fc anti-neonatal, o con un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un receptor dAb, Fab, Fab', ó scFv anti-SA ó anti-Fc neonatal, o con un anticuerpo anti-SA ó un anticuerpo de receptor anti-Fc neonatal.

Los ejemplos de albúmina, fragmentos de albúmina, o variantes de albúmina adecuados para utilizarse en un ligando de acuerdo con la invención, se describen en la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2, la cual se incorpora a la presente como referencia en su totalidad. En particular, se pueden utilizar las siguientes albúminas, fragmentos de albúmina, o variantes de albúmina en la presente invención.

- SEQ ID NO:1 (como se da a conocer en la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2, incorporándose explícitamente esta secuencia en la presente divulgación por referencia);

- Fragmento o variante de albúmina que comprende o que consiste en los aminoácidos 1-387 de la SEQ ID NO:1 de la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2;

- Albúmina, o fragmento o variante de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en: (a) los aminoácidos 54 a 61 de la SEQ ID NO:1 de la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2;

(b) los aminoácidos 76 a 89 de la SEQ ID NO:1 de la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2; (c) los aminoácidos 92 a 100 de la SEQ ID NO:1 de la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2; (d) los aminoácidos 170 a 176 de la SEQ ID NO:1
5 de la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2; (e) los aminoácidos 247 a 252 de la SEQ ID NO:1 de la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2; (f) los aminoácidos 266 a 277 de la SEQ ID NO:1 de la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2; (g) los aminoácidos 280 a 288 de la SEQ ID NO:1
10 de la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2; (h) los aminoácidos 362 a 368 de la SEQ ID NO:1 de la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2; (i) los aminoácidos 439 a 447 de la SEQ ID NO:1 de la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2; (j) los aminoácidos 462 a 475 de la SEQ ID NO:1 de
15 la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2; (k) los aminoácidos 478 a 486 de la SEQ ID NO:1 de la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2; y (l) los aminoácidos 560 a 566 de la SEQ ID NO:1 de la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2.

20 Otros ejemplos de albúminas, fragmentos, y análogos adecuados para utilizarse en una composición de dAb de acuerdo con la invención, se describen en la Publicación Internacional Número WO 2005/077042A2, la cual se incorpora a la presente como referencia en su totalidad. En particular, se pueden utilizar las
25 siguientes albúminas, fragmentos, o variantes, en la presente

invención:

• Albúmina de suero humano, como se describe en la
Publicación Internacional Número WO 03/076567A2, por ejemplo en
la Figura 3 (incorporándose explícitamente esta información de
5 secuencia en la presente divulgación por referencia);

• Albúmina de suero humano (HA) consistente en una sola
cadena de polipéptido no glicosilada de 585 aminoácidos con un
peso molecular de la fórmula de 66,500 (véase Meloun y
colaboradores, *FEBS Letters*, 58:136 (1975); Behrens y
10 colaboradores, *Fed. Proc.* 34:591 (1975); Lawn y colaboradores,
Nucleic Acids Research, 9:6102-6114 (1981); Minghetti y
colaboradores, *J. Biol. Chem.* 261:6147 (1986));

• Una variante polimórfica o fragmento de albúmina, como
se describe en Weitkamp y colaboradores, *Ann. Hum. Genet.* 37:219
15 (1973);

• Un fragmento o variante de albúmina, como se describe
en la Patente Europea Número EP 322094, por ejemplo HA(1-373),
HA(1-388), HA(1-389), HA(1-369), y HA(1-419), y los fragmentos
entre 1 y 369 y entre 1 y 419;

20 • Un fragmento o variante de albúmina como se describe en
la Patente Europea Número EP 399666, por ejemplo HA(1-177) y
HA(1-200), y los fragmentos entre HA(1-X), en donde X es cualquier
número de 178 a 199.

25 Cuando se utiliza una (una o más) fracción que extienda la vida
media (por ejemplo, albúmina, transferrina, y fragmentos y análogos

de las mismas) en los dAbs de la invención, ésta se puede conjugar con el dAb empleando cualquier método adecuado, tal como, mediante fusión directa con el dAb, por ejemplo, utilizando una construcción de un solo nucleótido que codifique una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión sea codificada como una sola cadena de polipéptido, localizándose la fracción que extienda la vida media N- ó C-terminalmente para las fracciones de enlace objetivo de superficie celular. De una manera alternativa, la conjugación se puede lograr utilizando un enlazador peptídico entre el dAb, por ejemplo, un enlazador peptídico como se describe en la Publicación Internacional Número WO 03/076567A2 ó en la Publicación Internacional Número WO 2004/003019 (incorporándose estas divulgaciones de enlazadores como referencia a la presente divulgación, para proporcionar los ejemplos de uso en la presente invención).

Típicamente, un polipéptido que mejore la vida media en suero *in vivo*, es un polipéptido que se presenta naturalmente *in vivo*, y que resiste a la degradación o remoción mediante los mecanismos endógenos que remueven el material indeseado del organismo (por ejemplo, humano). Por ejemplo, un polipéptido que mejore la vida media en suero *in vivo*, se puede seleccionar a partir de las proteínas de la matriz extracelular, las proteínas que se encuentran en la sangre, las proteínas que se encuentran en la barrera hematoencefálica o en el tejido neural, las proteínas localizadas en el riñón, hígado, pulmón, corazón, piel, o hueso, las proteínas de

tensión, las proteínas específicas de la enfermedad, o las proteínas involucradas en el transporte de Fc.

Los polipéptidos adecuados que mejoran la vida media en suero *in vivo* incluyen, por ejemplo, las proteínas de fusión de
 5 ligando específico de receptor de transferrina-agente neurofarmacéutico (véase la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,977,307, cuyas enseñanzas se incorporan a la presente como referencia), el receptor de células endoteliales capilares cerebrales, transferrina, el receptor de transferrina (por
 10 ejemplo, el receptor de transferrina soluble), insulina, el receptor de factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF 1), el receptor de crecimiento tipo insulina 2 (IGF 2), el receptor de insulina, el factor de coagulación sanguínea X, α 1-antitripsina, y HNF 1 α . Los polipéptidos adecuados que mejoran la vida media en suero también
 15 incluyen la glicoproteína alfa-1 (orosomucoide; AAG), la antiquimiotripsina alfa-1 (ACT), la microglobulina alfa-1 (proteína HC; AIM), antitrombina III (AT III), apolipoproteína A-1 (Apo A-1), apolipoproteína B-1 (Apo B-1), ceruloplasmina (Cp), componente de complemento C3 (C3), componente de complemento C4 (C4),
 20 inhibidor de esterasa C1 (C1 INH), proteína C-reactiva (CRP), ferritina (FER), hemopexina (HPX), lipoproteína(a) (Lp(a)), proteína de enlace de manosa (MBP), mioglobina (Myo), prealbúmina (transtiretina; PAL), proteína de enlace de retinol (RBP), y factor reumatoide (RF).

25 Las proteínas adecuadas desde la matriz extracelular incluyen,

por ejemplo, colágenos, lamininas, integrinas, y fibronectina. Los colágenos son las proteínas principales de la matriz extracelular. Actualmente se conocen aproximadamente 15 tipos de moléculas de colágeno, que se encuentran en diferentes partes del cuerpo, por ejemplo colágeno tipo I (que cuenta por el 90 por ciento del colágeno corporal) que se encuentra en hueso, piel, tendones, ligamentos, córnea, órganos internos, o colágeno tipo II que se encuentra en cartílagos, discos vertebrales, notocorda, y humor vítreo del ojo.

Las proteínas adecuadas de la sangre incluyen, por ejemplo, proteínas de plasma (por ejemplo, fibrina, α -2-macroglobulina, albúmina de suero, fibrinógeno (por ejemplo, fibrinógeno A, fibrinógeno B), proteína amiloide A de suero, haptoglobina, profilina, ubiquitina, uteroglobulina, y β -2-microglobulina), enzimas e inhibidores de enzimas (por ejemplo, plasminógeno, lisozima, cistatina C, antitripsina alfa-1, e inhibidor de tripsina pancreática), proteínas del sistema inmune, tales como proteínas de inmunoglobulina (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, cadenas ligeras de inmunoglobulina (kappa/lambda)), proteínas de transporte (por ejemplo, proteína de enlace de retinol, α -1-microglobulina), defensinas (por ejemplo, beta-defensina 1, defensina de neutrófilos 1, defensina de neutrófilos 2, y defensina de neutrófilos 3), y similares.

Las proteínas adecuadas que se encuentran en la barrera hematoencefálica o en el tejido neural incluyen, por ejemplo, el receptor de melanocortina, mielina, transportador de ascorbato, y

similares.

Los polipéptidos adecuados que mejoran la vida media en suero *in vivo*, también incluyen las proteínas que se localizan en el riñón (por ejemplo, policistina, colágeno tipo IV, transportador de aniones orgánico K1, antígeno de Heymann), las proteínas localizadas en el hígado (por ejemplo, deshidrogenasa de alcohol, G250), las proteínas localizadas en el pulmón (por ejemplo, componente secretor, el cual se enlaza con IgA), las proteínas localizadas en el corazón (por ejemplo, HSP 27, que está asociada con la cardiomiopatía dilatada), las proteínas localizadas en la piel (por ejemplo, queratina), las proteínas específicas de huesos, tales como las proteínas morfogénicas (BMPs), las cuales son un subconjunto de la superfamilia de proteínas de factor de crecimiento transformante β , que demuestran una actividad osteogénica (por ejemplo, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8), las proteínas específicas de tumor (por ejemplo, antígeno de trofoblastos, receptor de herceptina, receptor de estrógeno, catepsinas (por ejemplo, catepsina B, que se puede encontrar en el hígado y en el bazo)).

Las proteínas específicas de la enfermedad adecuadas incluyen, por ejemplo, los antígenos expresados solamente sobre las células-T activadas, incluyendo LAG-3 (gen de activación de linfocitos), ligando de osteoprotegerina (OPGL; véase *Nature* 402, 304-309 (1999)), OX40 (un miembro de la familia de receptores de TNF, expresada sobre las células-T activadas, y aumentada

específicamente en las células productoras del virus de leucemia tipo-I de células-T humanas (HTLV-I); véase *Immunol.* 165 (1):263-70 (2000)). Las proteínas específicas de la enfermedad adecuadas también incluyen, por ejemplo, las metaloproteasas (asociadas con
 5 artritis/cánceres), incluyendo CG6512 de *Drosophila*, paraplegina humana, FtsH humana, AFG3L2, ftsH de murino; y los factores de crecimiento angiogénicos, incluyendo el factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGF-1), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2), el factor de crecimiento endotelial vascular/factor de
 10 permeabilidad vascular (VEGF/VPF), el factor de crecimiento transformante- α (TGF α), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), angiogenina, interleucina-3 (IL-3), interleucina 8 (IL-8), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento placentario (P1GF), factor de crecimiento derivado de
 15 plaquetas de cinesis media-BB (PDGF), y fractalquino.

Los polipéptidos adecuados que mejoran la vida media en suero *in vivo*, también incluyen las proteínas de tensión, tales como las proteínas de choque por calor (HSPs). Las proteínas de choque por calor normalmente se encuentran intracelularmente. Cuando se
 20 encuentran extracelularmente, esto es un indicador de que la célula ha muerto y derramó su contenido hacia fuera. Esta muerte celular no programada (necrosis) ocurre cuando, como un resultado de un trauma, enfermedad, o lesión, las proteínas de choque por calor extracelulares disparan una respuesta desde el sistema inmune. El
 25 enlace con la proteína de choque por calor extracelular puede dar

como resultado la localización de las composiciones de la invención en un sitio de enfermedad.

Las proteínas adecuadas involucradas en el transporte de Fc incluyen, por ejemplo, el receptor de Brambell (también conocido como FcRB). Este receptor de Fc tiene dos funciones, ambas de las
5 cuales son potencialmente útiles para el suministro. Las funciones son: (1) transporte de IgG desde la madre hasta el hijo a través de la placenta (2) protección de IgG de la degradación, prolongando de esta manera su vida media en suero. Se piensa que el receptor
10 recicla la IgG desde los endosomas. (Véase Holliger y colaboradores, *Nat. Biotechnol.* 15(7):632-6 (1997)).

Los métodos para el análisis farmacocinético y la determinación de la vida media del dAb serán familiares para los expertos en este campo. Los detalles se pueden encontrar en Kenneth, A. y
15 colaboradores: *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* y en Peters y colaboradores, *Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi y D. Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª Revisión, edición extemporánea (1982), que describe los
20 parámetros farmacocinéticos, tales como las vidas medias t-alfa y t-beta, y el área debajo de la curva (AUC).

En términos generales, los dAbs se utilizarán en una forma purificada, junto con vehículos farmacológicamente apropiados. Típicamente, estos vehículos incluyen soluciones, emulsiones, o
25 suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, incluyendo cualquiera

de ellas medios de suero y/o regulados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, y Ringer lactado. Los auxiliares fisiológicamente aceptables adecuados, si son necesarios para mantener un complejo
5 de polipéptido en suspensión, se pueden seleccionar a partir de espesantes, tales como carboxi-metil-celulosa, polivinil-pirrolidona, gelatina, y alginatos.

Los vehículos intravenosos incluyen rellenos de fluidos y nutrientes y rellenos de electrolitos, tales como aquéllos
10 basados en dextrosa de Ringer. También puede haber conservadores y otros aditivos, tales como agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y gases inertes presentes ((Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª Edición).

Los dAbs de la presente invención se pueden utilizar como
15 composiciones administradas por separado, o en conjunto con otros agentes. Éstos pueden incluir diferentes fármacos inmunoterapéuticos, tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino, e inmunotoxinas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de diferentes agentes
20 citotóxicos o diferentes, en conjunto con los dAbs de la presente invención, o inclusive combinaciones de los dAbs de acuerdo con la presente invención, que tengan diferentes especificidades.

La vía de administración de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede ser cualquiera de aquéllas
25 comúnmente conocidas por los expertos ordinarios en la materia.

Para terapia, incluyendo sin limitación inmunoterapia, los dAbs y las composiciones de la invención se pueden administrar a cualquier paciente de conformidad con las técnicas convencionales. La administración puede ser mediante cualquier modo apropiado, incluyendo parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, transdérmicamente, por medio de la vía pulmonar, o también, de una manera apropiada, mediante infusión directa con un catéter. La dosificación y la frecuencia de administración dependerán de la edad, el sexo, y la condición del paciente, de la administración concurrente de otros fármacos, de las contraindicaciones y otros parámetros que deban ser tomados en cuenta por el clínico.

En una modalidad preferida de la invención, las composiciones terapéuticas descritas en la presente se administran ya sea tópicamente o bien sistémicamente.

En una modalidad preferida de la invención, la administración de una composición farmacéutica que comprenda los dAbs para el tratamiento de un paciente que sufra de candidiasis, incluye una infusión continua durante un período de tiempo, o la administración de una sola dosis o de un bolo. Además, se prevé que, en seguida de una administración de una sola dosis o de un bolo, se puede administrar una segunda dosis de bolo, o se puede administrar una infusión continua.

Los dAbs de esta invención se pueden liofilizar para su almacenamiento, y se pueden reconstituir en un vehículo adecuado.

antes de usarse. Se ha demostrado que esta técnica es efectiva con las inmunoglobulinas convencionales, y se pueden emplear las técnicas conocidas en este campo de liofilización y reconstitución. Será apreciado por los expertos en la materia, que la liofilización y reconstitución pueden conducir a diferentes grados de pérdida de actividad de los anticuerpos (por ejemplo, con las inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG), y que los niveles de uso pueden tener que ajustarse hacia arriba para compensar esto.

10 Las composiciones que contengan los dAbs o un cóctel de los mismos, se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En ciertas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para llevar a cabo cuando menos una inhibición parcial, supresión, modulación, aniquilación, u otro parámetro mensurable, 15 de una población de células seleccionadas, se define como una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades necesarias para alcanzar esta dosificación dependerán de la severidad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmune del paciente, pero en general están en el intervalo de 0.005 a 5.0 20 miligramos del dAb seleccionado por kilogramo de peso corporal, utilizándose más comúnmente las dosis de 0.05 a 2.0 miligramos/kilogramo/dosis. Para las aplicaciones profilácticas, también se pueden administrar las composiciones que contengan los dAbs o cócteles de los mismos en dosificaciones similares o 25 ligeramente más bajas.

Una composición que contenga un dAb ó un cóctel del mismo de conformidad con la presente invención, se puede utilizar en los establecimientos profilácticos y terapéuticos para ayudar a la alteración, inactivación, aniquilación, o remoción de una población celular objetivo seleccionada en un mamífero. En adición, los dAbs descritos en la presente se pueden utilizar extracorpóreamente o *in vitro* selectivamente para aniquilar, consumir, o remover efectivamente de otra manera una población celular objetivo de una colección heterogénea de células. La sangre de un mamífero se puede combinar extracorpóreamente con los anticuerpos seleccionados, los receptores de superficie celular, o las proteínas de enlace de los mismos, mediante lo cual, se aniquilan las células indeseadas o se remueven de otra manera de la sangre, para regresarse al mamífero de acuerdo con las técnicas convencionales.

La invención se describe adicionalmente, para propósitos de ilustración solamente, en los siguientes Ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y Métodos

Microorganismo y condiciones de cultivo.

A través de todo este estudio, se utilizó la levadura de laboratorio común *Candida albicans*. Sin embargo, se prevé que la invención se puede utilizar para prevenir o tratar otras levaduras, tales como *tropicalis*, *glabrata*, *krusei*, *norvegensis*, ó *inconspicua*.

Se utilizaron las cepas de *Candida albicans* SA40 y AIDS 68 a través de todo este estudio. SA40 fue completamente susceptible al

fluconazol y otros fármacos de triazol, mientras que la cepa AIDS 68 se aisló a partir de un paciente de SIDA como resistente al fluconazol (es decir, MIC >64 microgramos/mililitro, definido mediante los métodos de NCLLS). Ambas cepas se cultivaron rutinariamente en levadura-peptona-dextrosa (YPD; extracto de levadura al 1 por ciento, bacto-peptona al 2 por ciento, glucosa al 2 por ciento, todos en peso/volumen), o en base de nitrógeno de levadura (YNB; glucosa al 2 por ciento, base de nitrógeno de levadura al 0.17 por ciento sin aminoácidos y sulfato de amonio, sulfato de amonio al 0.5 por ciento, en peso/volumen), o un medio de Winge (extracto de levadura al 0.3 por ciento, glucosa al 0.2 por ciento), o un medio SDB (bacto-peptona al 1 por ciento, dextrosa al 2 por ciento), a 28°C. Todos los medios se solidificaron con ágar al 2 por ciento.

La filamentación (formación de hifas) sobre el medio solidificado con ágar, se obtuvo diluyendo las células en fase estacionaria hasta 2×10^8 células/mililitro en agua, manchando 1×10^6 células sobre placas con Medio 199, de araña, y de suero, e incubándolas a 37°C durante 7 días. El medio sólido 199 (M199, número de catálogo 31100-019, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) se reguló con Tris 150 mM (pH de 7) como fue previamente descrito (Sharkey, L. L. y colaboradores, 1999. *J. Bacteriol.* 181:5273-9). El medio de araña, de suero, y de Lee modificado sólido se preparó como fue previamente descrito (Liu, H., J., y colaboradores, 1994. *Science* 266:1723-6).

La formación del tubo germinal se evaluó a 37°C en M199, medio de Lee modificado, de araña, y de suero, en seguida de la inoculación de las células en fase estacionaria, en un caldo previamente calentado, a una densidad de 10⁸ células/mililitro. Los
5 controles negativos se incubaron en el mismo medio a 28°C.

Todos los productos químicos y antibióticos fueron de Roche Diagnostic (Perkin Elmer Roche, Branchburg, NJ) y de Sigma-Aldrich (Milán, Italia). Los polvos microbiológicos (excepto M199) fueron de Becton Dickinson (Becton Dickinson & Co., Sparks, MD).

10 **Generación de proteínas recombinantes**

Los plásmidos pRLV126 y pRLV130 se utilizaron para la clonación molecular de enolasa y MP65, como se detalla en cualquier otra parte (La Valle, R., S. y colaboradores, 2000. *Infect. Immun.* 68:6777-84; Sandini, S. y colaboradores, 2002. *Med. Mycol.*
15 40:471-8).

Con el objeto de clonar la forma madura de CaMP65 en *E. coli*, el fragmento de ADN de 1,200 pares de bases, que se extiende desde la secuencia N-terminal secretada hasta el codón de paro de CaMP65, se amplificó utilizando los oligonucleótidos Ca69 y Ca65
20 (Tabla 1). El producto de reacción en cadena de la polimerasa, después de la digestión con BamHI y HindIII, se clonó en los sitios correspondientes de pDS56-RBSII, para dar el pRLV148.

Para la clonación molecular de la secuencia de codificación de la proteinasa SAP2, se amplificaron las cds de longitud completa de
25 SAP2 utilizando los oligonucleótidos Ca70 y Ca71. Después de la

digestión parcial con BamHI y PstI, se clonó la forma madura de SAP2 en los sitios correspondientes de pDS56-RBSII, para dar el pRLV143.

Tabla 1:

5					
	ID	Secuencia	Enzima de restricción	Posición de CAMP65, inicio=1, paro=1138	Posición de CaSAP2 inicio=1, paro=1198
10	Ca70	GGGGGATCCATGTTTTTAAAGAATATTTTCAT TG - SEQ ID NO:1	BamHI		1-25
	Ca71	CCTAAGCTTAGGTCAAGGCAGAAATACTGGA AGCAG2 - SEQ ID NO:2	HindIII		1216-1198
15	Ca69	CCCGGATCCCTGTTTCATGTTGTTACC - SEQ ID NO:3	BamHI	98-114	
	Ca65	GGGCTGCAGGTGCTTAGTTAGAGTAA - SEQ ID NO:4	PstI	1142-1125	

Antes de usarse, todos los insertos de ADN de pRLV143 y pRLV148 se secuenciaron para confirmar la homología con los genes conocidos. Se han observado pocas diferencias, pero ninguna de ellas confiere cambios de aminoácidos en los productos codificados.

Expresión y purificación de proteínas recombinantes de *C. albicans*.

La expresión de las proteínas recombinantes se obtuvo en *E.*

coli M15, que lleva el plásmido pUHA1 que produce el represor de lac (Hochuli y colaboradores, 1988, *J. Chromatogr.*, 444.293-302). La inducción se llevó a cabo en un medio LB, conteniendo canamicina y ampicilina, agregando la isopropil- β -D-tio-galactopiranosida (IPTG; Boehringer) en una concentración final de 1 mM a un cultivo con una O.D.₆₀₀ de 0.7, seguido por 5 horas adicionales de incubación a 37°C. Las proteínas marcadas con 6xhis recombinantes se purificaron mediante cromatografía por afinidad de quelato de níquel, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen; condiciones desnaturalizantes). Las fracciones que contenían al polipéptido purificado se reservaron y se precipitaron con tres volúmenes de etanol absoluto, se volvieron a suspender en agua, y se almacenaron a -20°C.

Repliegue de las proteínas recombinantes de *C. albicans*.

Las proteínas purificadas disueltas en urea 8M se replegaron mediante diálisis contra concentraciones decrecientes de urea (4M, 2M, 1M, 0.5M) en suero regulado con fosfato a 4°C, incubándose las muestras durante 6 horas en cada concentración de urea, seguido por una diálisis final contra suero regulado con fosfato (Sigma-Aldrich) (regulador de fosfato 10 mM; KCl 2.7 mM; NaCl 137 mM; pH de 7.4).

Generación de bibliotecas de dAb de exhibición de fagos.

Las bibliotecas de fagos de dAb se basaron en una estructura de un solo anticuerpo humano para VH (V3-23 [locus] DP47 [entrada de Base V] y J_H4b), y para VL (012/02 [locus] DP κ 9 [entrada de Base

V] y Jk1), con la diversidad incorporada utilizando diversificación de nucleótidos de ADN, para generar la diversidad de la cadena lateral de aminoácidos en las posiciones que se sabe que hacen contactos de proteína con el antígeno en las estructuras moleculares conocidas, y se diversifican naturalmente en el repertorio humano maduro. Los dominios variables de dAb se clonaron en el vector de fago pDOM4, el cual se basa en el genoma fd-fago, y por consiguiente, contiene todos los genes de fago necesarios para producir las partículas de fago infecciosas utilizadas durante el proceso de selección.

Selección de dAb mediante exhibición de fagos.

Las selecciones se llevaron a cabo contra MP65 y SAP2 pasivamente recubiertas en inmunotubos Maxisorp Immuno^{MR} Tube (Nunc), en 4 mililitros de ambos antígenos, a 10 microgramos/mililitro en regulador de carbonato-bicarbonato de BupH (regulador de carbonato-bicarbonato 0.2M, pH de 9.4) (Perbio, Reino Unido), para recubrir los inmunotubos durante la noche a 4°C. Los inmunotubos se bloquearon subsiguientemente con suero regulado con fosfato conteniendo polvo de leche descremada al 2 por ciento (PBSM) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se lavaron tres veces con suero regulado con fosfato. Se incubaron aproximadamente 1×10^{11} fagos de cada biblioteca de dAb, en un volumen total de 1 mililitro de polvo de leche descremada al 2 por ciento en el tubo recubierto con antígeno durante 1 hora a temperatura ambiente (RT), girando a 50 revoluciones por minuto. Después de 10 lavados con suero regulado

con fosfato complementado con Tween 20 al 0.1 por ciento (Sigma-Aldrich) (PBST), y de diez lavados con suero regulado con fosfato para la selección de la ronda 1 (veinte lavados para las selecciones de las rondas 2 y 3, respectivamente), los fagos enlazados se eluyeron con 500 microlitros de suero regulado con fosfato conteniendo 1 miligramo/mililitro de tripsina (Sigma-Aldrich), complementado con CaCl_2 0.1 mM (Sigma-Aldrich), con rotación a 50 revoluciones por minuto, a temperatura ambiente, durante 10 minutos. La solución de tripsina que contenía al fago eluido se recuperó, y se utilizaron 250 microlitros para infectar 1.75 mililitros de células TG1 de *E. coli* en fase log a 37°C durante 30 minutos. La aplicación de la biblioteca y las diluciones log en serie (para la titulación de fagos) se hicieron sobre placas de 2xTYE-ágar (15 gramos de Bacto-Ágar, 8 gramos de NaCl, 10 gramos de triptona, 5 gramos de extracto de levadura en 1 litro de agua) complementadas con 15 microgramos/mililitro de tetraciclina (Sigma-Aldrich). Para las siguientes rondas de selección, las células se recuperaron de las placas de cultivo raspando en 2 mililitros de medio 2xTY (16 gramos de triptona, 10 gramos de extracto de levadura, y 5 gramos de NaCl en 1 litro de agua) complementado con glicerol al 20 por ciento (Sigma-Aldrich), de los cuales se utilizaron 50 microlitros para inocular 50 mililitros de 2xTYE-Tet a 37°C para la amplificación del fago.

En seguida del número deseado de rondas de selección (típicamente 2 a 3), se recuperaron los genes de dAb enriquecidos

digiriendo 20 microgramos del ADN del fago de dAb purificado (QIAgen Midiprep), a partir de la producción de selección deseada, con las enzimas de restricción *SaII* y *NotI* (NEB) en regulador NEB3 (1 microgramo/mililitro de albúmina de suero bovino, NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, ditioeritritol 1 mM, pH de 7.9, a
5 aproximadamente 25°C). Los genes de dAb separados se pasaron por electroforesis sobre un gel de agarosa al 1 por ciento (Sigma-Aldrich) en TBE (Sigma-Aldrich) (Tris-borato 44.5 mM, y EDTA 1 mM, pH de 8.3) a 150V durante 1 hora. En seguida de la electroforesis,
10 los genes de dAb se separaron y se purificaron utilizando el kit de purificación de gel QIAgen (QIAgen). Entonces se ligaron 100 nanogramos de los genes de dAb digeridos purificados con 400 nanogramos del vector de expresión soluble digerido con *SaII/NotI*, utilizando la ligasa de ADN T4 (New England Biolabs) en el regulador de ligamiento (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, ditioeritritol
15 10 mM, 25 microlitros/mililitro de albúmina de suero bovino, pH de 7.5, a aproximadamente 25°C), a temperatura ambiente durante 1 hora. Se utilizaron 3 microlitros del producto de ligamiento para transformar 50 microlitros de HB2151 de *E. coli* electrocompetente
20 (200Ω, 25 μFd, 2.5 kV, cubetas con un hueco de 0.2 centímetros), y se aplicó la cantidad deseada de células transformadas sobre placas de ágar complementadas con glucosa al 5 por ciento, y 50 microgramos/mililitro de carbenicilina (Sigma-Aldrich); seguido por incubación a 37°C durante la noche.

Rastreo de enlazador de dAb específicos mediante ELISA.

Los clones HB2151 de *E. coli* frescos se analizaron para determinar los dAbs de enlace de MP65 y SAP2 mediante un ELISA. Los clones individuales se cultivaron en 200 microlitros de 2xTY
5 conteniendo 50 microgramos/mililitro de carbenicilina, glucosa al 0.1 por ciento, en placas de microtitulación de 96 pozos (Corning), a 37°C con agitación a 250 revoluciones por minuto durante 6 horas, y se indujeron con IPTG en una concentración final de 1 mM; se continuó la incubación a 30°C/250 revoluciones por minuto durante la
10 noche para expresar el dAb soluble. Las placas se centrifugaron a 870xg durante 10 minutos a temperatura ambiente, y el sobrenadante se analizó mediante ELISA como sigue (a menos que se informe, todos los volúmenes fueron de 50 microlitros/pozo). Las placas ELISA de 96 pozos (Nunc Maxisorp) se recubrieron durante la noche
15 a 4°C con 1 microgramo/mililitro de MP65 ó SAP2 en regulador de carbonato-bicarbonato de BupH, y luego se lavaron tres veces mediante inmersión en PBST. Entonces las placas se bloquearon con 200 microlitros/pozo de suero regulado con fosfato complementado con Tween 20 al 2 por ciento (volumen/volumen) durante 1 hora a
20 temperatura ambiente, y luego se lavaron tres veces con PBST. Veinticinco microlitros del sobrenadante del cultivo nocturno se diluyeron a 1:1 en PBST, y se agregaron a cada pozo, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. En seguida de tres lavados con PBST, los dAbs específicos de SAP2 enlazados se incubaron
25 durante 1 hora a temperatura ambiente, con una dilución de 1:2000

de conjugado de proteína A/peroxidasa de radícula roja en PBST. Aunque los dAbs seleccionados contra MP65 se detectaron utilizando la dilución de 1:2000 de anticuerpo 9E10 de ratón (anti-myc, Sigma-Aldrich, Número de Catálogo M5546) en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBST, y luego a una dilución de 1:2000 de conjugado de peroxidasa de radícula roja específica anti-Fc de ratón (Sigma-Aldrich, Número de Catálogo A0168) en PBST, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. En seguida de la incubación con el ligando de detección apropiado, ambos ensayos de SAP2 y MP65 se lavaron tres veces con PBST, seguido por tres lavados con suero regulado con fosfato. Entonces se relevaron todas las placas agregando 50 microlitros/pozo de sustrato TMB (SureBlue, KPL, MD, EUA). La reacción se dejó revelarse durante varios minutos, hasta que hubo aparecido una señal suficiente en relación con los pozos de control, y entonces la reacción se detuvo mediante la adición de 100 microlitros/pozo de HCl 1M. La absorbencia se leyó a 450 nanómetros en un lector de placas de microtitulación Victor2 (Perkin Elmer).

20 **Expresión y purificación de la proteína dAb.**

Las colonias frescas individuales correspondientes a cada clon positivo en ELISA de dAb soluble se inocularon en 5 mililitros de 2xTY complementado con 50 microgramos/mililitro de carbenicilina y glucosa al 5 por ciento, y se incubaron durante la noche a 37°C, con agitación a 250 revoluciones por minuto. Se utilizaron 5 mililitros de

este cultivo para inocular 500 mililitros del medio previamente calentado fresco (2xTY complementado con 50 microgramos/mililitro de carbenicilina y glucosa al 0.1 por ciento), y se incubaron a 37°C con agitación a 250 revoluciones por minuto, hasta que la OD600 alcanzó 0.8, cuando se indujo el cultivo a través de la adición de IPTG hasta una concentración final de 1 mM, y se incubó durante la noche a 30°C con agitación a 250 revoluciones por minuto. Entonces las células granularon mediante centrifugación a 3,450xg durante 10 minutos, y el sobrenadante aclarado resultante se filtró a través de un filtro estéril de 0.45 micras. Luego se mezclaron 50 microlitros de este sobrenadante mediante rotación a 50 revoluciones por minuto con 200 microlitros de proteína-L-Sepharose (Sigma-Aldrich) para los dAbs VL ó la línea continua de Proteína-A (Amersham Pharmacia) para los dAbs VH a temperatura ambiente durante 1 hora. Las resinas se recuperaron mediante centrifugación a 220xg durante 1 minuto, seguido por lavado dos veces con 1 mililitro de NaCl 0.5M en suero regulado con fosfato, y dos veces con 1 mililitro de suero regulado con fosfato en una placa de papel filtro de 96 pozos (Whatmann), y entonces el dAb se eluyó con 210 microlitros de glicina 0.1M (pH de 2.0), y se neutralizó mediante la adición de 40 microlitros de Tris-HCl 1M (pH de 8.0). La pureza de los dAbs se determinó mediante SDS-PAGE llevada a cabo bajo condiciones de reducción, utilizando los geles Bis-Tris NuPAGE al 12 por ciento ejecutados en un regulador de MES (sistema de gel Novex, Invitrogen). Los geles se tiñeron con azul Coomassie (Simply Blue

Safestain, Invitrogen). La concentración de las muestras de dAb se determinó por la absorbencia a 280 nanómetros.

Ensayos de adherencia a células endoteliales o plástico.

Se cultivaron las células fúngicas a 28°C sobre portaobjetos de
5 ágar YPD (glucosa al 2.0 por ciento en peso/volumen, extracto de
levadura al 1.0 por ciento en peso/volumen, bacto-peptona al 2.0 por
ciento en peso/volumen (Difco, Detroit, Mich.). Se prepararon
suspensiones individuales de cada organismo mediante una
modificación del procedimiento de Rotronsen (Rotronsen, D. y
10 colaboradores, 1986, *Rev. Infect. Dis.*; 8:73-85). Dicho de una
manera breve, las células se cultivaron durante 24 horas a 28°C
sobre un tambor giratorio en caldo YBD, a un pH de 5.0 (extracto de
levadura al 0.2 por ciento en peso/volumen, albúmina de suero
bovino al 2.0 por ciento en peso/volumen, y dextrosa al 2.0 por
15 ciento en peso/volumen (Difco, Detroit, Mich.). Después de cosechar
mediante centrifugación, las células de *C. albicans* se lavaron tres
veces en una solución fisiológica (NaCl al 0.85 por ciento). Las
blastoesporas se contaron con una cámara Thoma, y se ajustaron a
la concentración deseada (108 células/mililitro) en una Solución de
20 Sal Equilibrada de Hank con calcio y magnesio (Hyclone, Logan,
Utah).

Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC),
se prepararon mediante una modificación del método de Jaffe y
colaboradores (Jaffe y colaboradores, 1989, *J. Immunol.* 15;
25 143:3961-6). Dicho de una manera breve, las HUVECs se obtuvieron

de vena de cordón umbilical mediante digestión con 0.5 miligramos/mililitro de colagenasa H (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemania). Las células se cultivaron rutinariamente en un Medio-199 al 50 por ciento, Medio Esencial Mínimo-D al 50 por ciento (EuroClone, Yorkshire, Reino Unido) complementado con
5 suero bovino fetal al 20 por ciento (Hyclone, Logan, Utah), 50 nanogramos/mililitro de heparina (Sigma), y 50 microgramos/mililitro de ECGF (Becton, Dickinson).

Para los estudios de adherencia de *Candida*, las células se
10 cultivaron hasta la confluencia en placas de cultivo de tejido de 12 pozos (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) recubiertas con gelatina bacto al 0.5 por ciento (Difco, Detroit, Mich.). Todas las incubaciones estuvieron en aire humidificado al 95 por ciento, con una atmósfera de CO₂ al 5 por ciento, a 37°C.

15 Para la adherencia al plástico, las células fúngicas, cultivadas como anteriormente, se lavaron dos veces con agua, y se suspendieron a 1.5×10^3 células/mililitro, en un medio de Lee modificado o en un medio líquido M199. Se incubaron 1.5×10^3 células durante 3 horas a 37°C en placas de poliestireno de seis pozos
20 (Corning Incorporated, Corning, NY). Después de un extenso lavado, se vertió 1 mililitro de ágar de dextrosa Sabouraud en cada pozo, y se dejó solidificar. Después de la incubación a 37°C durante 24 horas, se contaron las colonias, y los resultados se expresaron como un porcentaje del inóculo. El tamaño de inóculo de cada suspensión
25 celular se confirmó poniendo alícuotas del cultivo directamente en

las placas de ágar de dextrosa Sabouraud.

ELISA

Se midió el enlace mediante un ensayo inmunosorbente enlazado con enzima (ELISA). Dicho de una manera breve, las
5 placas de microtitulación de poliestireno (Dynatech, PBI, Milán, Italia) se recubrieron durante la noche a 4°C con 200 nanogramos de antígeno disuelto en 100 microlitros de carbonato de sodio 0.05M (pH de 9.6). Después de un lavado en una solución de bloqueo de albúmina de suero bovino-suero regulado con fosfato (PBS), se
10 diluyeron 100 microlitros de diluciones dobles en suero regulado con fosfato-Tween 20 al 0.05 por ciento de ascitas de animales inmunizados, y se incubaron a 37°C durante 2 horas.

Se utilizó el suero reservado (diluido a 1:2) de ratones no inmunizados como el control negativo. Después de 3 lavados con 400
15 microlitros de suero regulado con fosfato-Tween 20, se agregó a los pozos una dilución de 1:1000 en suero regulado con fosfato de conjugado de fosfatasa alcalina polivalente anti-ratón (Sigma) utilizado como anticuerpo secundario durante 1 hora a 37°C, y la reacción se desarrolló con fosfato de nitrofenilo disódico (Sigma)
20 como el sustrato. Las titulaciones se definieron como la dilución más alta de suero de ratón que dio una lectura óptica de cuando menos dos veces la lectura del control negativo. Para el inmunomanchado, las proteínas recombinantes purificadas de las células M15 inducidas por IPTG (pUHA1, pDS56/RBSH6xhis-ca) se volvieron a suspender
25 en regulador de muestra en aproximadamente 1 microgramo de

proteína por litro, se hirvieron durante 10 minutos, y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE (gradiente del 5 al 15 por ciento de poliacrilamida)). Los materiales pasados por electroforesis se electromancharon sobre filtros de microcelulosa en un regulador que contenía Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0.1 por ciento, y metanol al 20 por ciento. Los filtros se incubaron con ascitas como se detalla en los experimentos individuales. En todos los casos, se impidió el enlace no específico de las ascitas a la microcelulosa mediante el bloqueo de los filtros con albúmina de suero bovino al 1 por ciento en suero regulado con fosfato (PDS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de un extenso lavado con suero regulado con fosfato-Tween 20, los anticuerpos enlazados se detectaron mediante dilución a 1:1000 en suero regulado con fosfato del conjugado de fosfatasa alcalina polivalente anti-ratón (Sigma) utilizado como el anticuerpo secundario.

Ensayo de enzima de proteinasa.

Este se basó en la degradación de albúmina de suero bovino por parte de una preparación de SAP2 altamente purificada nativa, esencialmente como es descrito por Ross y colaboradores. Dicho de una manera breve, cada ensayo contenía 0.6 mililitros de albúmina de suero bovino al 1 por ciento (peso/volumen) (Sigma Chem. Co., Detroit, MI) en citrato de sodio 50 mM, pH de 3.2, y solución enzimática 0.15 (100 microgramos/mililitro). Después de 30 minutos a 37°C, se agregaron 0.4 mililitros de ácido tricloro-acético al 10 por ciento (peso/volumen). Los tubos se almacenaron en hielo durante

30 minutos, y luego se centrifugaron (1600 xg) durante 10 minutos. La absorbencia del sobrenadante se leyó a 280 nanómetros. El control fue albúmina de suero bovino al 1 por ciento en regulador de citrato sin enzimas. Una unidad de enzima catalizó una OD delta de 1 por minuto. Con nuestra preparación de SAP2 purificada, el ensayo fue proporcional a la concentración de enzima sobre un intervalo OD delta de 0.1-0.4, y el límite de detección de 1 microgramo.

Infección vaginal de rata.

A través de todo este estudio, se utilizaron ratas Wistar hembras ooforectomizadas (de 80 a 100 gramos, Charles River Breeding Laboratories, Calco, Italia). Todas las ratas se mantuvieron bajo pseudo-estro mediante inyección de benzoato de estradiol (Amsa Farmaceutici srl, Roma, Italia). Seis días después de la primera dosis de estradiol, los animales se inocularon intravaginalmente con 10^7 células de levadura en 0.1 mililitros de solución salina. El número de células en el fluido vaginal se contó cultivando muestras de 10 microlitros (utilizando el ciclo de plástico calibrado, Disponoic, PBI, Milán, Italia) tomadas de cada animal, sobre una placa de ágar Sabouraud conteniendo cloranfenicol (50 microgramos/mililitro), como fue previamente descrito (De Bernardis y colaboradores, 1999, *J. Infect. Dis.* 179:201-8). La rata se consideró infectada cuando se detectó al menos una unidad formadora de colonias en el lavado vaginal, es decir, un conteo de $\geq 10^3$ unidades formadoras de colonias/mililitro. También se tiñeron otras muestras vaginales mediante el método periódico de ácido-Schiff-van Gieson para el

examen microscópico.

Ejemplo 2: Resultados

1. Generación, rastreo, y caracterización de dAbs.

Se probaron las proteínas de *C. albicans* recombinantes replegadas para determinar la actividad funcional antes de la selección del dAb mediante exhibición de fagos. SAP2 se probó mediante el ensayo de enzima proteinasa, y mostró una buena funcionalidad, que indicó una estructura correctamente plegada. MP65 se replegó empleando el mismo método que para SAP2; sin embargo, no se probó la funcionalidad, debido a la falta de un ensayo robusto. Se utilizaron cuatro bibliotecas de fagos con un tamaño combinado de más de 1×10^{10} dAbs únicos para la selección, utilizándose cuando menos 1×10^{11} fagos individuales para cada ronda de selección (representando cuando menos una sobre-representación de 10 veces de la diversidad de la biblioteca). En seguida de tres rondas de selección, las titulaciones de producción de fagos habían aumentado por más de 5 logs. Se aislaron los dAbs tanto específicos de MP65 como específicos de SAP2 a partir de la producción de la selección de la tercera ronda, mediante el rastreo de los sobrenadantes de cultivo bacteriano que contenían el dAb expresado para el enlace con el antígeno pasivamente adsorbido mediante ELISA. Se identificaron 10 enlazadores específicos de MP65 únicos (3 VH y 7 VK) y 27 enlazadores específicos de SAP2 únicos (22 VH y 5 VK). Con el fin de determinar la actividad inhibidora de cada dAb contra su antígeno respectivo, se produjeron

varios miligramos del dAb purificado para cada clon positivo único para el rastreo.

2. Enlace de dAbs y propiedades funcionales.

Los clones de dos bibliotecas de expresión de fagos diferentes, que comprendían las sub-bibliotecas VH y Vk seleccionadas contra SAP2 ó MP65 en seguida del rastreo apropiado mediante un método inmunoenzimático (ver anteriormente), se rastrearon en adición funcionalmente. En el caso de SAP2, también se evaluó la capacidad del dAb para inhibir la actividad enzimática de una preparación de proteína nativa, mientras que para MP65, también se probó cada enlazador de dAb para determinar la inhibición de la adherencia de *Candida* al plástico. Al final de estos ensayos preliminares, por consiguiente, se seleccionó un número limitado de cada familia de dAb, basándose tanto en su fuerte enlace con la proteína recombinante, como en su capacidad inhibidora funcional de la adhesión y de la actividad enzimática. Sin embargo, se previó que todos los dAbs funcionarían en ambos ensayos de enlace y funcionales.

A manera de ejemplo, la Tabla 2 muestra la capacidad de cada enlazador de SAP2 individual seleccionado para inhibir la degradación de la albúmina de suero bovino bajo condiciones ácidas, comparándose con el inhibidor prototípico de pepstatina de proteasa aspártica A.

Tabla 2

5

10

15

20

25

MUESTRA	$\Delta OD/ml/min$	% inhibición
Regulador de citrato + BSA al 1% + SAP	1.0	-
Regulador de citrato + BSA al 1% + SAP + pepstatina	0.36	100*
ADR4-11	0.80	29
ADR4-12	0.60	60
ADR4-13	0.46	82
ADR4-3	0.66	40
ADR4-4	0.76	32
ADR4-5	1	0
ADR4-6	0.50	78
ADR4-7	0.70	61
ADR4-8	1	0
ADR4-9	0.93	5
ADR4-10	0.83	13
DUMMY	0.93	5
Hel4/pr2	1.16	-

Los dAbs relacionados con pepstatina más fuertes, ADR4-13 y ADR4-6, se seleccionaron y se purificaron para un estudio adicional. En el caso de los enlazadores de MP65, se seleccionaron en su lugar los dAbs ADR3-1, ADR3-2, y ADR3-6, con base en su capacidad para
5 inhibir la adherencia al plástico.

3. Actividad del dAb en el modelo de candidiasis vaginal de rata.

Los dAbs seleccionados, como se describe anteriormente, se ensayaron para determinar su capacidad para acelerar la eliminación
10 del hongo de la cavidad vaginal de rata agredida con una cepa de *Candida* vaginopática virulenta. Los controles fueron el uso de un dAb irrelevante, y un anticuerpo anti-enolasa como los negativos, y el fluconazol antimicótico y la pepstatina A (el inhibidor prototípico de SAP) como los positivos.

15 La interpretación de los resultados se basa en dos criterios principales: 1. La eliminación acelerada durante el primer tratamiento, es decir, de 3 a 6 días después de la agresión intravaginal; 2. El sanado de la infección (<1 unidad formadora de colonias/microlitro de fluido vaginal) en el día 21 después de la
20 agresión. Las diferencias se evaluaron tanto mediante estadística paramétrica (prueba-t de Student) como no paramétrica (prueba-U de Mann-Withney). Se hicieron dos tipos de experimentos (repetidos tres veces), uno de tipo preventivo y uno de tipo terapéutico. En los primeros experimentos, se dio intravaginalmente una sola
25 administración de dAb (20 microgramos como proteína), 30 minutos

antes de la agresión de *Candida* intravaginal, mientras que en el último, se dio la misma cantidad de dAb a las 1, 24, y 48 horas después de la agresión.

4. Actividad preventiva del dAb.

5 En un experimento inicial, en donde las ratas se trataron previamente ya sea con un dAb anti-MP65 (ADR3-2), o bien con un dAb anti-SAP2 (ADR4-6) (Figura 1), o se trataron con fluconazol o pepstatina, y se mostró que ambos dAbs aceleran la eliminación de *Candida* desde la vagina con una cinética sustancialmente
10 equivalente a aquélla tanto del antimicótico como de la pepstatina (Figura 1). Todos los tratamientos parecieron resolver la infección en el día 21, mientras que todas las ratas de control (no tratadas) estaban todavía infectadas en el día 28. En seguida de los experimentos, tratados de examinar analíticamente la actividad de
15 cada dAb individual, y también de examinar si los dAbs ejercían una actividad terapéutica, es decir, cuando se daban después de la agresión.

 Como se muestra en la Figura 2, ambos dAbs anti-SAP2 (ADR4-6 ó ADR4-13) confirieron una alta protección preventiva
20 contra la agresión fúngica, como se ejemplifica por la eliminación inicial más rápida del hongo y la eliminación de la infección anticipada (día 21), comparándose con las ratas de control, no tratadas, o tratadas con el dAb irrelevante. Comparando los dos dAbs, no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre
25 ellos. Por ejemplo, en el experimento ilustrado en la Figura 2, hubo

una diferencia estadísticamente significativa de la línea límite ($P = 0.048$; prueba-t de Student) en el día 14, solamente entre las unidades formadoras de colonias de *Candida* vaginales en los animales a los que se dieron los dos dAbs, pero no se reprodujo en experimentos adicionales.

Los tres dAbs anti-MP65 seleccionados también fueron notoriamente activos en el modelo de candidiasis vaginal de rata, con un comportamiento y capacidad generalmente similares para acelerar la eliminación fúngica de la vagina. Aunque las ratas previamente tratadas con el dAb ADR3-2 todavía estaban infectadas en el día 21, se curaron similarmente, que las otras ratas previamente tratadas con los otros dos dAbs anti-MP65, al día siguiente (día 28) de la observación (Figura 3).

En adición, y como se esperaba por el mecanismo de acción del dAb supuesto (inhibición de la actividad de SAP2), tanto el ADR4-6 como el ADR4-13 fueron altamente eficaces, inclusive contra la infección causada por una cepa de *Candida* resistente al fluconazol, AIDS 68, con una fuerte aceleración de eliminación del hongo y un sanado prematuro de la infección (Figura 4).

20 **Actividad terapéutica del dAb.**

Se llevaron a cabo experimentos adicionales para evaluar el potencial del dAb para ejercer un efecto curativo cuando se administrara después de la agresión con *Candida*. Por consiguiente, cada dAb se administró a las 1, 24, y 48 horas después de la infección. Como se muestra en la Figura 5, este tratamiento también

proporcionó una aceleración de la eliminación del hongo desde la vagina, comparándose con las ratas tratadas con dAb irrelevante o no tratadas. Aunque aquí el índice de eliminación pareció ser inferior, cualquiera que fuera el dAb utilizado, al alcanzado con el dAb correspondiente previo al tratamiento, no obstante, también se obtuvo una cura completa de la infección antes de los controles, aunque solamente en el día 28. En este planteamiento terapéutico, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dAbs anti-SAP2 y anti-MP65, pero el fluconazol fue significativamente más activo para reducir el número de unidades formadoras de colonias vaginales en todos los tiempos examinados. Tampoco hubo una ventaja aparente en el tratamiento con una mezcla de dAbs anti-SAP2 y anti-MP65. No obstante, todas las ratas tratadas se curaron de la infección en el día 28.

Control sistémico de la infección por *Candida*.

Se evaluó la capacidad de los dAbs anti-SAP2 y anti-MP65 para controlar una infección sistémica de *C. albicans*, empleando métodos convencionales.

Dicho de una manera breve, los ratones se infectaron crónicamente con *C. albicans*, mediante la inyección de 1×10^6 células por ratón, por la vena lateral de la cola (en 0.2 mililitros de suero). Los dAbs anti-SAP2 ó anti-MP65 se administraron como se indica anteriormente. Se midieron los índices de sobrevivencia, comparándose con los animales de control.

Adicionalmente, se prevé que los dAbs se pueden utilizar para

conferir una protección pasiva contra la infección fúngica en los sujetos vulnerables, mediante la administración de una dosis efectiva antes de cualquier posible infección. Una dosis efectiva se puede determinar por medios conocidos por los expertos en este campo.

- 5 Los ratones se dosificaron con 1 miligramo/kilogramo o con 2.5 miligramos/kilogramo de cualquier dAb anti-SAP2 ó anti-MP65, seguido por una dosis de *C. albicans*, mediante la inyección de 1×10^6 células por ratón, por medio de la vena lateral de la cola (0.2 mililitros de suero). Se midieron los índices de infección fúngica y de
- 10 sobrevivencia, comparándose con los controles. Se observó que ambos dAbs anti-SAP2 y anti-MP65 protegían a los ratones contra la infección fúngica, comparándose con los controles.

Ejemplo 3. Construcción del heterodímero:

- El ADN que codificaba los dAbs ADR3-6 y ADR4-6 se clonó en
- 15 secuencia en ambas orientaciones en el vector de expresión pDOM5D-5U, para generar dos construcciones separadas (ADR3-6/ADR4-6 y ADR4-6/ADR3-6). Este vector se basó en el pDOM5 (como el pDOM4 descrito en los ejemplos para la producción del monómero, pero sin la codificación de expresión del fago), y
- 20 contenía un enlazador situado entre los sitios de clonación del dAb.

Expresión de proteína:

Expresión y purificación como se describe para los dAbs del monómero, utilizando la proteína-A. La confirmación de la pureza de la proteína fue mediante SDS-PAGE, con teñido con Coomassie.

Análisis *in vivo*:

Se utilizaron cinco ratas Wistar hembras ooforectomizadas (de 80 a 100 gramos, Charles River Breeding Laboratories, Calco, Italia) por grupo. El mantenimiento de los animales y el cuidado global fueron como se describe en cualquier otra parte (De Bernardis, F. y colaboradores, *J. Infect. Dis.* 161, 1276-1283 (1990)). Todas las ratas se mantuvieron bajo pseudo-estro mediante inyecciones subcutáneas de 50 miligramos de benzoato de estradiol (Amsa Farmaceutici srl, Roma, Italia) dados cada segundo día. Seis días después de la primera dosis de estradiol, a las ratas se les administraron intravaginalmente 20 microgramos (en 0.1 mililitros de suero) de cada molécula dimérica, 30 minutos antes de la agresión intravaginal con 10^7 células de *Candida albicans* (cepa SA-40) en 0.1 mililitros de solución salina. El número de células en el fluido vaginal se contó cultivando muestras de 10 microlitros (utilizando un ciclo de plástico calibrado, Disponoic, PBI, Milán, Italia) tomadas de cada animal sobre placas de ágar Sabouraud conteniendo cloranfenicol (50 microgramos/mililitro). Las ratas se consideraron infectadas cuando se detectó al menos una unidad formadora de colonias en el lavado vaginal, es decir, un conteo de $>10^3$ unidades formadoras de colonias/mililitro.

Resultados

Ambos heterodímeros fueron capaces de acelerar la eliminación de *Candida* (Figura 6). El heterodímero ADR3-6YADR4-6 eliminó la infección hasta debajo del límite detectable para

aproximadamente el día 10. El heterodímero ADR4-6/ADR3-6 eliminó la infección para el día 15.

Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria descriptiva y las referencias citadas en esas publicaciones, se incorporan a la presente como referencia. Diferentes modificaciones y variaciones de los métodos descritos y del sistema de la invención serán aparentes para los expertos en la materia, sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con las modalidades preferidas específicas, se debe entender que la invención como se reivindica no debe limitarse indebidamente a estas modalidades específicas. En realidad, se pretende que diferentes modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que sean obvias para los expertos en el campo o en campos relacionados, queden dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Ejemplo 4. Generación de los formatos de dAb heterodiméricos y monoespecíficos PEGilados:

La secuencia de ADN que codifica los dAbs individuales, clonada en el vector de expresión pDOM5, se mutó mediante reacción en cadena de la polimerasa, para cambiar el codón que codifica el aminoácido de estructura 4 de dAb final (típicamente una serina para los VH dAbs, y arginina para los VK dAbs) hasta una cisteína (...TGC... codón). Se incluyeron dos codones de paro (...TAATAA...) inmediatamente a 3' del codón de TGC. Se empleó un planteamiento similar para introducir una cisteína en el dAb 3' de las

construcciones heterodiméricas.

Expresión de Proteína:

La expresión y purificación de las construcciones monoméricas mutadas fueron como se describe para los dAb monoméricos, utilizando proteína-A para los clones de VH, o proteína L para los clones de VK. La expresión y purificación de las construcciones diméricas mutadas fueron como se describe para los dAbs monoméricos utilizando la proteína-A. Para ambas construcciones monomérica y dimérica mutadas, la pureza de la proteína se evaluó mediante SGS-PAGE con tñido con Coomassie.

PEGilación:

Los dAbs de tanto la forma monomérica como la forma dimérica se PEGilaron empleando la química de enlazador de maleimida estándar. El PEG se enlazó ya sea con cisteína o bien con lisina, que era natural o se agregaba al dAb. Si se agregaba la cisteína o la lisina, se agregaba en el término N ó C del dAb, o dentro de la estructura del dAb.

Una vez PEGilados, los dAbs se purificaron y se aislaron antes de utilizarse, mediante el empleo de una técnica de purificación SEC estándar.

Resultados:

Se ensayaron las versiones PEGiladas de las construcciones tanto monoméricas como diméricas, para determinar su eficacia para controlar una infección sistémica de *C. albicans* en ratones Balb/c, utilizando un protocolo similar al modelo sistémico de murino

descrito anteriormente. Se administró 1 miligramo/kilogramo de proteína de dAb PEGilada o fluconazol a las 2 horas, 6 horas, y 24 horas después de la infección, a grupos de 8 ratones. La construcción heterodimérica específica doble ADR4-6/ADR3-6-PEG, 5 mostró la actividad más potente. Esta molécula fue más eficaz que sus monómeros constituyentes o que el fluconazol.

10

15

20

25

Muestra	Sobrevivencia	Tiempo de supervivencia medio (días)
Diluyente de dAb (PBS)	50%	2
ADR3-1- <u>PEG</u>	75%	>30
HEL4-PEG	62%	>30
ADR3-6- <u>PEG</u>	62%	>30
ADR4-6- <u>PEG</u>	88%	>30
ADR4-6/ADR3-6- <u>PEG</u>	88%	>30
ADR4-13- <u>PEG</u>	50%	4
ADR3-6/ADR4-6- <u>PEG</u>	100%	>30
Fluconazol	88%	>30
SA40 solamente	25%	2
Ratones no infectados	100%	-

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual se enlaza con una proteasa aspártica secretora (Sap) de *Candida spp.*.
- 5 2. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con la reivindicación 1, el cual se enlaza con Sap2.
3. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con la reivindicación 2, el cual comprende, o de preferencia consiste en, cualquier secuencia en el grupo que consiste en las siguientes:
10 ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente.
- 15 4. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con la reivindicación 2 ó con la reivindicación 3, el cual comprende, o de preferencia consiste en, la secuencia designada como ADR4-6, designada como la SEQ ID NO:18, o ADR4-13 designada como la SEQ ID NO:25.
- 20 5. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dAb se enlaza con Sap como se define en la presente, con una constante de índice $K_{\text{desactivación}}$ de entre 5×10^{-1} y $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$.
- 25 6. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con la reivindicación 1, el cual se enlaza con Sap con una constante de

disociación (Kd) de cuando menos 100 μ M a 1 pM.

7. Un anticuerpo de un solo dominio de acuerdo con la reivindicación 4, 5, ó 6, el cual se enlaza con Sap2.

8. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual se enlaza con una proteasa aspártica secretora (Sap), de *Candida spp.*, y el cual exhibe una identidad de secuencia de aminoácidos de cuando menos el 80 por ciento con la secuencia designada como ADR4-6 designada como la SEQ ID NO:18, o ADR4-13 designada como la SEQ ID NO:25.

9. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual inhibe la actividad funcional de una proteasa aspártica secretora (Sap) de *Candida spp.*

10. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con la reivindicación 9, el cual inhibe la actividad funcional de Sap2.

11. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con la reivindicación 10, el cual comprende, o de preferencia consiste en, cualquier secuencia en el grupo que consiste en las siguientes: ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente.

12. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende, o de preferencia consiste en, la secuencia designada como ADR4-6

designada como la SEQ ID NO:18, o ADR4-13 designada como la SEQ ID NO:25.

13. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual inhibe la actividad funcional de una proteasa aspártica secretora (Sap) de *Candida spp.*, y el cual exhibe una identidad de secuencia de aminoácidos de cuando menos el 80 por ciento con la secuencia designada como ADR4-6, y representada como la SEQ ID NO:18, ó ADR4-13 designada como la SEQ ID NO:25.

14. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual se enlaza con la manoproteína adhesina (MP) de *Candida spp.*.

15. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con la reivindicación 14, el cual se enlaza con MP65.

16. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con la reivindicación 15, el cual comprende, o de preferencia consiste en, cualquier secuencia en el grupo que consiste en las siguientes: ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8, y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

17. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 y 16, en donde el dAb se enlaza con la MP con una constante de índice $K_{\text{desactivación}}$ de entre 5×10^{-1} y $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$.

18. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, el cual se enlaza con la MP con una constante de disociación (K_d) de cuando menos $100 \mu\text{M}$

a 1 pM.

19. Un anticuerpo de un solo dominio de acuerdo con la reivindicación 18, el cual se enlaza con MP65.

20. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual se enlaza con la manoproteína adhesina (MP) de *Candida spp.*, y el cual exhibe una identidad del 80 por ciento con los dAbs en el grupo que consiste en las siguientes: ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8, y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

21. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual inhibe la actividad funcional de la manoproteína adhesina (MP) de *Candida spp.*.

22. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con la reivindicación 21, el cual inhibe la actividad funcional de MP65.

23. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb) de acuerdo con la reivindicación 22, el cual comprende, o de preferencia consiste en, cualquier secuencia en el grupo que consiste en las siguientes: ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8, y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

24. Un anticuerpo de un solo dominio (dAb), el cual inhibe la actividad funcional de la manoproteína adhesina (MP) de *Candida spp.*, y el cual exhibe una identidad del 80 por ciento con los dAbs en el grupo que consiste en los siguientes: ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8, y ADR3-9, y designadas

como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

25. Una composición farmacéutica, la cual comprende uno cualquiera o más dAbs de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un vehículo, diluyente, y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

26. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 25, la cual comprende uno o más dAbs que se enlazan con MP65 y Sap2.

27. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 25, la cual comprende uno o más dAbs que inhiben la actividad funcional de MP65, y uno o más dAbs que inhiben la actividad funcional de Sap2.

28. Un método para la profilaxis y/o el tratamiento de infección por *Candida spp.* en un paciente, mediante la administración al paciente que necesite dicho tratamiento, de uno o más dAbs o una composición de los mismos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

29. Un dAb de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, o una composición de acuerdo con las reivindicaciones 25 a 28, para utilizarse en la profilaxis y/o el tratamiento de infección por *Candida spp.*.

30. Un método para la profilaxis y/o el tratamiento de infección de *Candida spp.* resistente al azol en un paciente, mediante la administración a ese paciente que necesite dicho tratamiento, de un dAb de acuerdo con cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 24, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28.

31. Un método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el azol es un triazol.

5 32. Un método para la profilaxis y/o el tratamiento de infección por *Candida spp.* resistente al triazol de acuerdo con la reivindicación 31, mediante la administración a un paciente que necesite dicho tratamiento, de un dAb de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, o una composición de acuerdo con las
10 reivindicaciones 25 a 28, en donde la infección por *Candida spp.* es resistente a cualquiera o más agentes del grupo que consiste en los siguientes: itraconazol, fluconazol, y voriconazol.

 33. Un método para el tratamiento de una infección por *Candida spp.* resistente al imidazol de acuerdo con la reivindicación
15 30, mediante la administración a un paciente que necesite dicho tratamiento, de un dAb de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, o una composición de acuerdo con las reivindicaciones 25 a 28, en donde la infección por *Candida spp.* es resistente a cualquiera o más agentes del grupo que consiste en los
20 siguientes: clotrimazol, econazol, fenticonazol, sulconazol, y tioconazol.

 34. Un dAb, un método, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la infección por *Candida spp.* es una o más de aquéllas del grupo que consiste
25 en las siguientes: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida*

glabrata, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, y *Candida lusitanae*.

35. Un dAb, un método o una composición de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la infección por *Candida spp.* es *Candida albicans*.

5 36. Un dAb, un método o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la infección por *Candida spp.* está en cualquiera o más de las localizaciones del grupo que consiste en las siguientes: sistémica, mucosa, oral, debajo de las uñas, bronquial, pulmonar, vaginal (incluyendo vulvovaginal),
10 esofágica, y orofaríngea.

37. Un método ó dAb de acuerdo con la reivindicación 36, en donde la infección por *Candida spp.* es sistémica o mucosa.

38. Un método ó dAb de acuerdo con la reivindicación 37, en donde la infección por *Candida spp.* es sistémica.

15 39. Un método ó dAb de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29 a 38, en donde el dAb se administra al sujeto por cualquier vía de la lista que consiste en las siguientes: administración sistémica, administración tópica, administración oral, administración intranasal, y administración mucosa.

20 40. Un método o uso de acuerdo con la reivindicación 39, en donde el dAb se administra al sujeto mediante administración oral.

41. Un método o uso de acuerdo con la reivindicación 40, en donde el dAb se administra al sujeto mediante administración sistémica.

25 42. El uso de un dAb de acuerdo con cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 24, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de una o más condiciones asociadas con los pacientes inmunocomprometidos.

5 43. El uso de acuerdo con la reivindicación 42, en donde el paciente inmunocomprometido está sufriendo de cualquiera o más condiciones del grupo que consiste en las siguientes: infecciones por VIH, SIDA, e infecciones por levadura.

10 44. El uso de acuerdo con la reivindicación 42 ó 43, en donde el dAb o la composición del mismo se administra al paciente en la forma de una sola dosis.

15 45. El uso de acuerdo con la reivindicación 44, en donde el dAb o la composición del mismo, se administra al paciente en la forma de una sola dosis, seguida por la administración de múltiples dosis.

46. Un método para la profilaxis y/o el tratamiento de infección sistémica por *Candida spp.* en un paciente, en donde el método comprende el paso de administrar al paciente que necesite dicho tratamiento, uno o más de:

20 (i) un anticuerpo que se enlace con una proteína Sap y/o MP;

(ii) un fragmento de un anticuerpo que se enlace con una proteína Sap y/o MP;

(iii) un dAb que se enlace con una proteína Sap y/o MP.

25 47. Un método para la profilaxis y/o el tratamiento de

infección sistémica por *Candida spp.* en un paciente, en donde el método comprende el paso de administrar al paciente que necesite dicho tratamiento, uno o más de:

5 (i) un anticuerpo que inhiba la actividad funcional de una proteína Sap y/o MP;

(ii) un fragmento de un anticuerpo que inhiba la actividad funcional de una proteína Sap y/o MP; y

(iii) un dAb que inhiba la actividad funcional de una proteína Sap y/o MP.

10 48. Un método de acuerdo con la reivindicación 46 ó 47, en donde el dAb se administra sistémicamente.

49. Un método de acuerdo con la reivindicación 46, la reivindicación 47, o la reivindicación 48, en donde el anticuerpo es monoespecífico.

15 50. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 49, en donde la Sap es Sap2.

51. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 49, en donde la proteína MP es MP65.

20 52. Una composición que comprende un dAb multimérico que comprende el dAb de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13 enlazado con el dAb de acuerdo con las reivindicaciones 14 a 24.

53. Una composición de acuerdo con la reivindicación 52, en donde el dAb multimérico es un dímero.

25 54. Una composición de acuerdo con la reivindicación 52 ó 53, en donde los dAbs se enlazan directamente.

55. Una composición de acuerdo con la reivindicación 52 ó 53, en donde los dAbs se enlazan mediante un enlazador.

56. Una composición farmacéutica, la cual comprende el dAb multimérico de acuerdo con las reivindicaciones 52 a 55, y un
5 vehículo, diluyente, y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

57. Un método para la profilaxis y/o el tratamiento de infección por *Candida spp.* de un dispositivo médico, en donde el dispositivo médico necesite dicho tratamiento, mediante la administración de uno o más dAbs o una composición de los mismos
10 de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 28 y 52 a 55.

58. Un dAb que se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13,
15 ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como SEQ ID NOs:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o que difiere de la
20 secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-
25 5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ

ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, en no más de 25 posiciones de aminoácidos, y tiene una secuencia de CDR1 que tiene cuando menos una identidad del 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

59. Un dAb que se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o que difiere de la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ

ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, en no más de 25 posiciones de aminoácidos, y tiene una secuencia de CDR2 que tiene cuando menos una identidad del 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

60. Un dAb que se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o que difiere de la secuencia de aminoácidos de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ

ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, en no más de 25 posiciones de aminoácidos, y que tiene una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

61. Un dAb que se enlaza Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o difiere de la secuencia de aminoácidos de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-

3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, en no más de 25 posiciones de aminoácidos, y tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, y que tiene una secuencia de CDR2 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

62. Un dAb que se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13,

ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las

5 SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o que difiere de la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID

10 NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, en no más de 25 posiciones de aminoácidos, y que tiene una secuencia de CDR2 que tiene una identidad de cuando

15 menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-

20 1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, y que tiene una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7,

25 ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14,

ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID
5 NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

63. Un dAb que se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13,
10 ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o que difiere de la
15 secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y
20 designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, en no más de 25 posiciones de aminoácidos, y que tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10,
25

ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y
 5 ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, y que tiene una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14,
 10 ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

15 64. Un dAb que se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-20
 20 21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, o que difiere de la secuencia de aminoácidos de las ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12,
 25 ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-20, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y

5 designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, en no más de 25 posiciones de aminoácidos, y que tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10,

10 ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13,

15 respectivamente, y que tiene una secuencia de CDR2 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-

20 22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente, y que tiene una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento

25 con la secuencia de CDR3 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5,

ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

65. Un dAb que se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

66. Un dAb que se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de CDR2 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y

ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

67. Un dAb que se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando
5 menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de ADR4-2, ADR4-3, ADR4-4, ADR4-5, ADR4-6, ADR4-7, ADR4-8, ADR4-9, ADR4-10, ADR4-11, ADR4-12, ADR4-13, ADR4-14, ADR4-15, ADR4-16, ADR4-17, ADR4-18, ADR4-19, ADR4-21, ADR4-22, ADR4-23, y designadas como las SEQ ID NO:14 a SEQ ID NO:35, respectivamente, ó ADR3-
10 1, ADR3-2, ADR3-3, ADR3-4, ADR3-5, ADR3-6, ADR3-7, ADR3-8 y ADR3-9, y designadas como las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:13, respectivamente.

68. Un dAb que se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando
15 menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441), y una secuencia de CDR2 que tiene una
20 identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441).

25 69. Un dAb que se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb

tiene una secuencia de CDR2 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441), y una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441).

70. Un dAb que se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441), y una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441).

71. Un dAb que se enlaza con Sap ó MP, en donde el dAb tiene una secuencia de CDR1 que tiene una identidad de cuando

menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR1 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441), y una secuencia de CDR2 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR2 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441), y una secuencia de CDR3 que tiene una identidad de cuando menos el 50 por ciento con la secuencia de CDR3 de DOM16-39 (SEQ ID NO:345), DOM16-39-87 (SEQ ID NO:420), DOM16-39-100 (SEQ ID NO:423), DOM16-39-107 (SEQ ID NO:430), DOM16-39-109 (SEQ ID NO:432), DOM16-39-115 (SEQ ID NO:438), y DOM16-39-200 (SEQ ID NO:441).

72. Un dAb de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 24, 29, y 58 a 71, una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 25 a 27, y 56, o una composición de acuerdo con las reivindicaciones 52 a 55, en donde el dAb, la composición farmacéutica, o la composición, comprende opcionalmente una fracción de extensión de la vida media.

73. Un dAb, composición farmacéutica, o composición de acuerdo con la reivindicación 71, en donde la fracción de extensión de la vida media es polietilenglicol (PEG).

74. Un dAb, composición farmacéutica, o composición de

acuerdo con la reivindicación 71, en donde la fracción de extensión de la vida media se enlaza con la albúmina de suero.

5

10

15

20

25

Listado de Secuencias

- SEQ ID No. 1
GGGGGATCCATGTTTTTAAAGAATATTTTCATTG
- 5
SEQ ID No.2
CCTAAGCTTAGGTCAAGGCAGAAATACTGGAAGCAG
- SEQ ID No. 3
CCCGGATCCCTGTTTCATGTTGTTACC
- 10
SEQ ID No. 4
GGGCTGCAGGTGCTTAGTTAGAGTAA
- ADR3-1 SEQ ID No. 5
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPDYSMTWVRQAPGKGLEWVSLISNSGKT
TMYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWVNRILQEFDYWGQG
TLVTVSS
- 15
ADR3-2 SEQ ID No. 6
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISAALAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQIGRRPDTFGQGTKVEIKRAAAEQKLISEE
D
- ADR3-3 SEQ ID No. 7
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIKKLAWYQQKPGKAPKLLIYNASHLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWRRFPITFGQGTKVEIKRAAAEQKLISE
ED
- 20
ADR3-4 SEQ ID No. 8
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIKKQLNWWYQQKPGKAPKLLIYKASHLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQMRVLPITFGQGTKVEIKRAAAEQKLISE
ED
- ADR3-5 SEQ ID No. 9
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIKKHLAWYQQKPGKAPKLLIYGASHLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWRRKPITFGQGTKVEIKRAAAEQKLISE
ED
- 25

ADR3-6 SEQ ID No. 10

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIKKQLNWKYQKPGKAPKLLIYKASHLQSGV
PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQWRRFPTTFGQGTKVEIKRAAAEQKLISE
ED

5 ADR3-7 SEQ ID No. 11

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPSYSMVWVRQAPGKGLEWVSLISKAGST
TLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWVNRILQEFDYWGQG
TLVTVSS

ADR3-8 SEQ ID No. 12

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIKHSLLQWYQKPGKAPKLLIYKASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVKKRPPTFGQGTKVEIKRAAAEQKLISE
ED

10 ADR3-9 SEQ ID No. 13

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIKKQLNWKYQKPGKAPKLLIYKASHLQSGV
PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQMRVLPITFGQGTKVEIKRAAAEQKLISE
ED

ADR4-2 SEQ ID No. 14

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIFALKWYQKPGKAPKLLIYNASVLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQQSRKPQTFGQGTKVEIKRAAAEQKLISEE
D

15

ADR4-3 SEQ ID No. 15

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAQYRMAWVRQAPGKGLEWVSQINAQGT
QTGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWVGGARYTFDYWG
QGTLVTVSS

ADR4-4 SEQ ID No. 16

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLDYQMSWVRQAPGKGLEWVSGISRSGNK
TKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWAGLNRHDFDYWGQ
GTLVTVSS

20

ADR4-5 SEQ ID No. 17

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDRISSEFMGWVRQAPGKGLEWVSAIYKPNGS
TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRARRTESTYQLRYW
GQGTTLVTVSS

ADR4-6 SEQ ID No. 18

25

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRVSNYDLTWVRQAPGKGLEWVSTISATNGS
 TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVTWLLRHNDNLGF
 WGQGTILVTVSS

ADR4-7 SEQ ID No. 19

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTYQNMWVRQAPGKGLEWVSTITVPNG
 STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGLGEVLRDGNANVQF
 WGQGTILVTVSS

ADR4-8 SEQ ID No. 20

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYKVMGWVRQAPGKGLEWVSAINRENG
 STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGFARRGAPHSASVEFW
 GQGTILVTVSS

ADR4-9 SEQ ID No. 21

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVRLSHQVMGWVRQAPGKGLEWVSAIRSSDG
 STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGWRSKSAKSMHYWGQ
 GTILVTVSS

ADR4-10 SEQ ID No. 22

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSVSAYTMSWVRQAPGKGLEWVSAILKKNQ
 STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGRPSVTFGGPGKRYDY
 HFQYWGQGTILVTVSS

15 ADR4-11 SEQ ID No. 23

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVIFTDQTMGWVRQAPGKGLEWVSAIKTRDGS
 TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFLRPNASRGSAREAQI
 HSWGQGTILVTVSS

ADR4-12 SEQ ID No. 24

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDTVSSKAMWVRQAPGKGLEWVSGIFIPNGS
 TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAKQRAVLSRWGSSTEF
 GSWGQGTILVTVSS

20 ADR4-13 SEQ ID No. 25

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSISYKNMAWVRQAPGKGLEWVSAIKAANGS
 TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGSQKKRTYTFDFWGQ
 GTILVTVSS

ADR4-14 SEQ ID No. 26

25 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDLYSMKWVRQAPGKGLEWVSGISANGMI
 TWYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWAAFDYRGQGTILV
 TVSS

ADR4-15 SEQ ID No. 27

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAVYTMDWVRQAPGKGLEWVSSIRPMGH
QTRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNGEIFDYWGQGT
LVTVSS

ADR4-16 SEQ ID No. 28

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFREYVMDWVRQAPGKGLEWVSGITNGV
STRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSESPGMAIFDYWGQ
GTLTVTVSS

ADR4-17 SEQ ID No. 29

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRVYMMAWVRQAPGKGLEWVSKISSQGIS
THYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQARLGHQSFDYWGQ
GTLTVTVSS

ADR4-18 SEQ ID No. 30

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGLYSMSWVRQAPGKGLEWVSGILAGGGA
TSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLLLFDYWGQGT
LVTVSS

ADR4-19 SEQ ID No. 31

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYLMWVRQAPGKGLEWVSAIGASGSS
TIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKKGMLRKQFDYWGQ
GTLTVTVSS

ADR4-20 SEQ ID No. 32

15 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYLMWVRQAPGKGLEWVSAIGASGSS
TIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQARLGHQSFDYWGQ
GTLTVTVSS

ADR4-21 SEQ ID No. 33

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGLYSMSWVRQAPGKGLEWVSGILAGGGA
TSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLLLFDYWGQGT
LVTVSS

20 ADR4-22 SEQ ID No. 34

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFQSYMMWVRQAPGKGLEWVSRISRGLE
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRSRFQPRSFYWGQ
GTLTVTVSS

ADR4-23 SEQ ID No. 35

25 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRMYSMRWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWGAFDYWGQGT
LVTVSS

FIG. 1

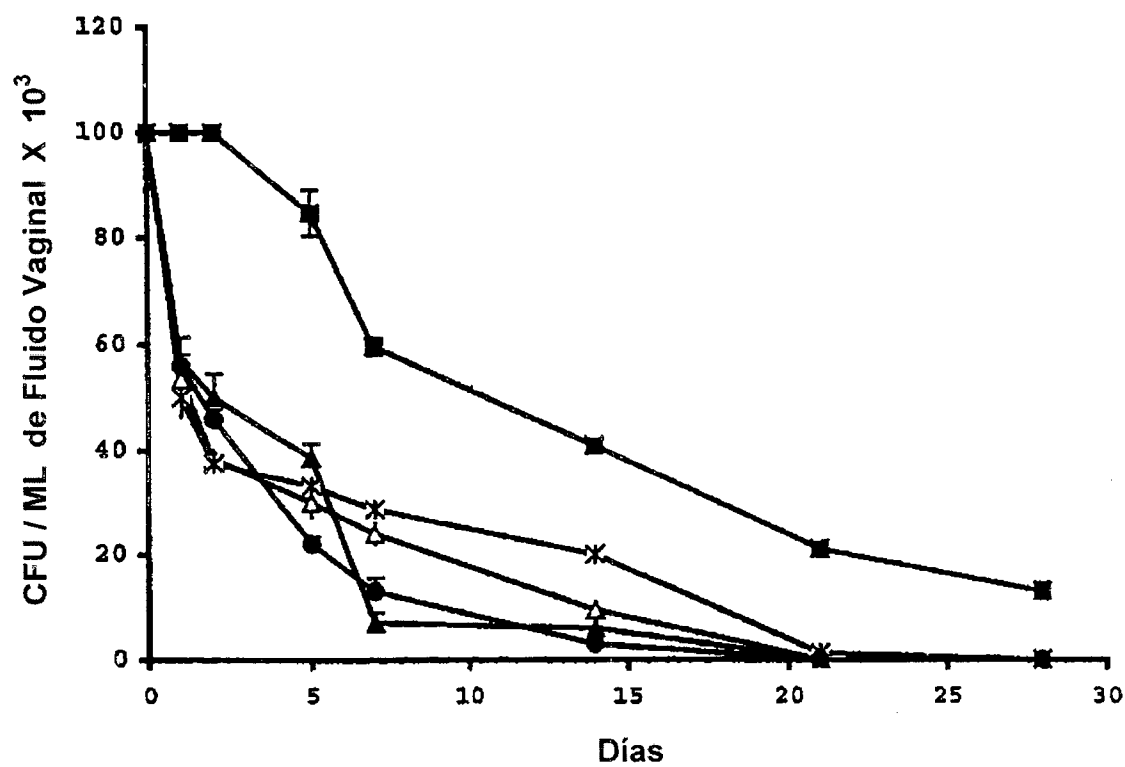


FIG. 2

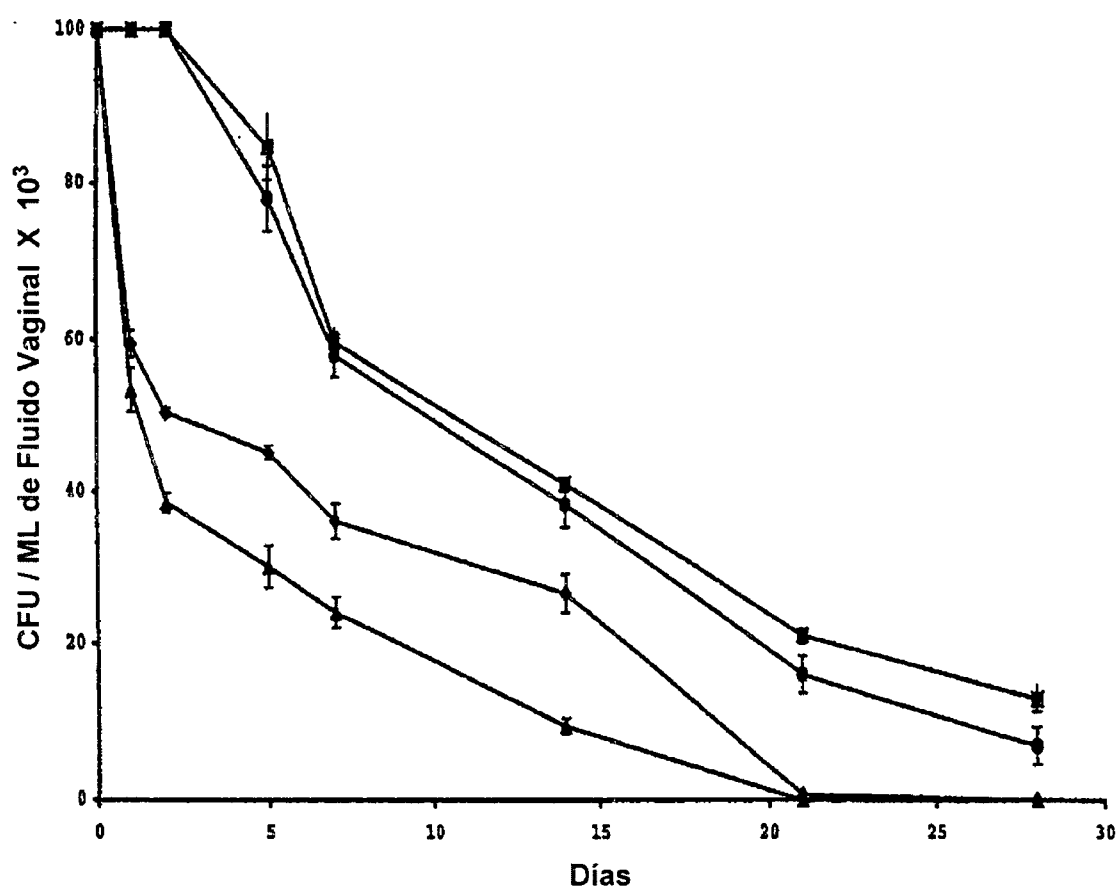


FIG. 3

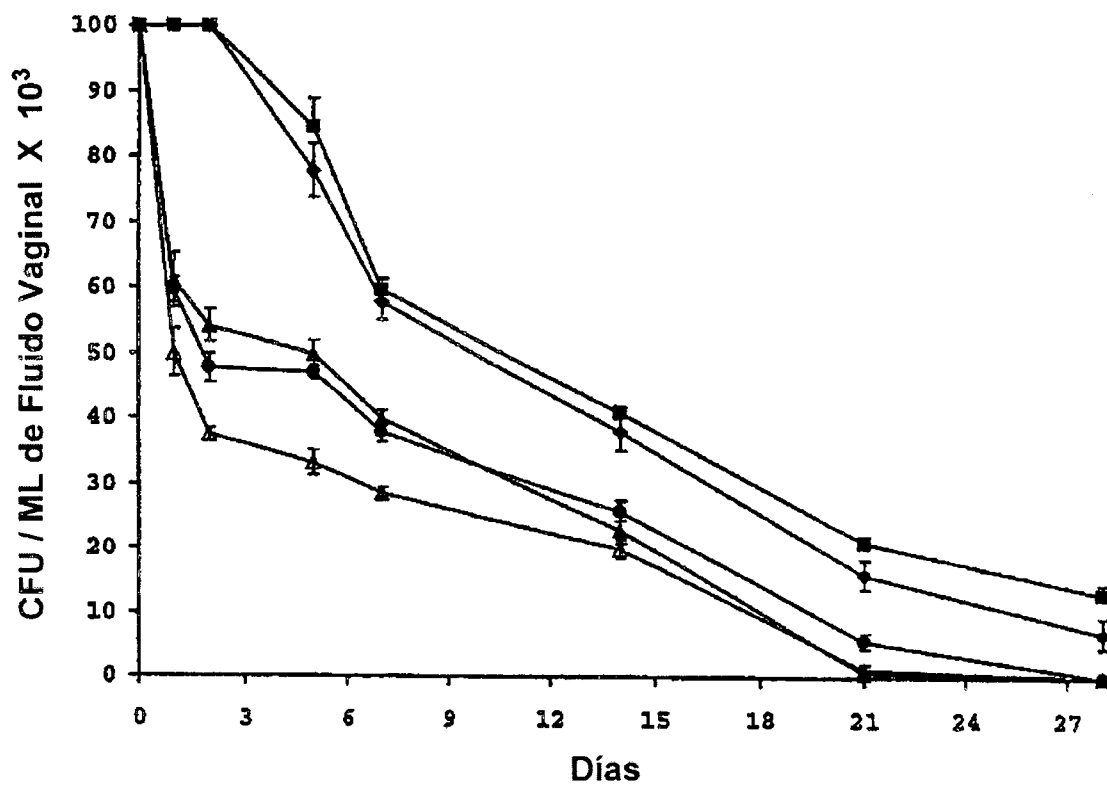


FIG. 4

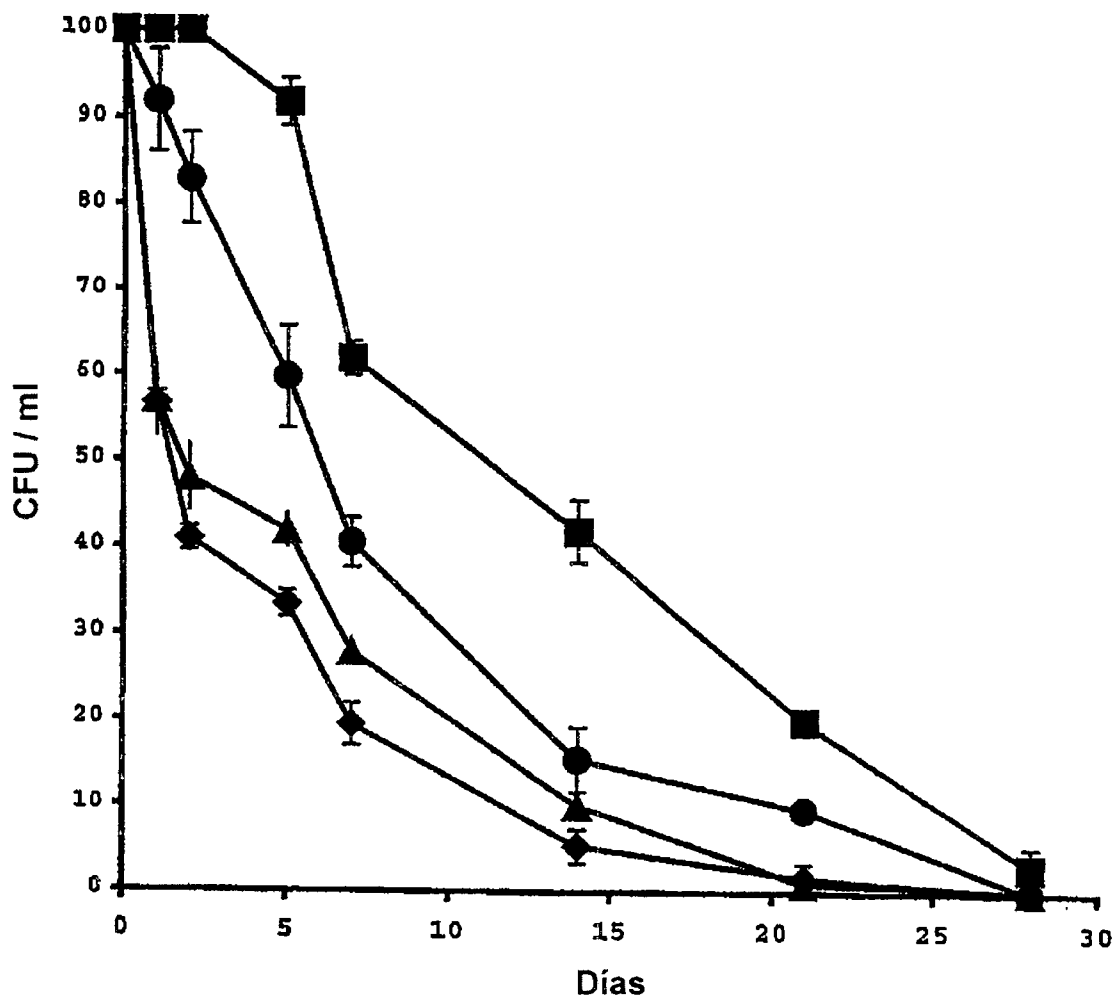


FIG. 5

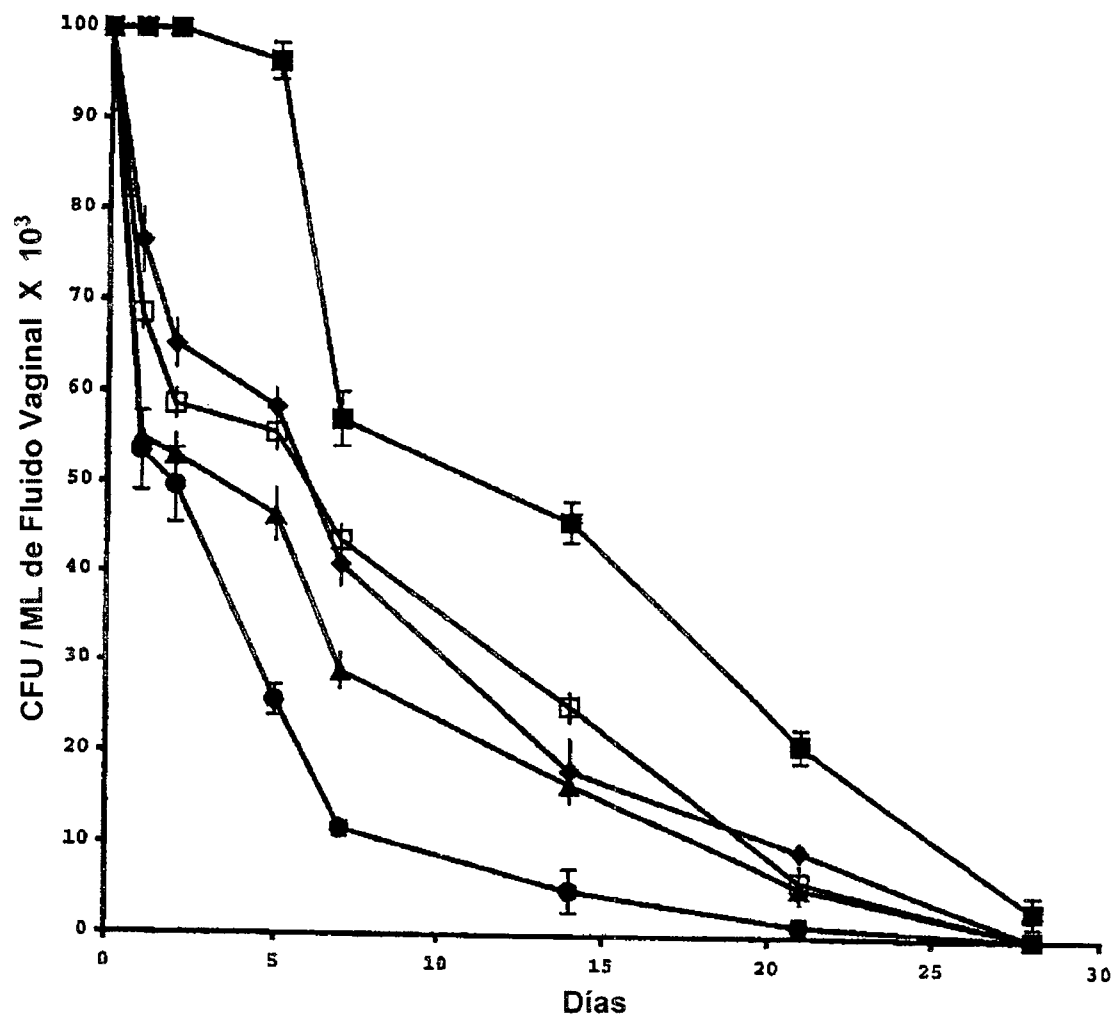
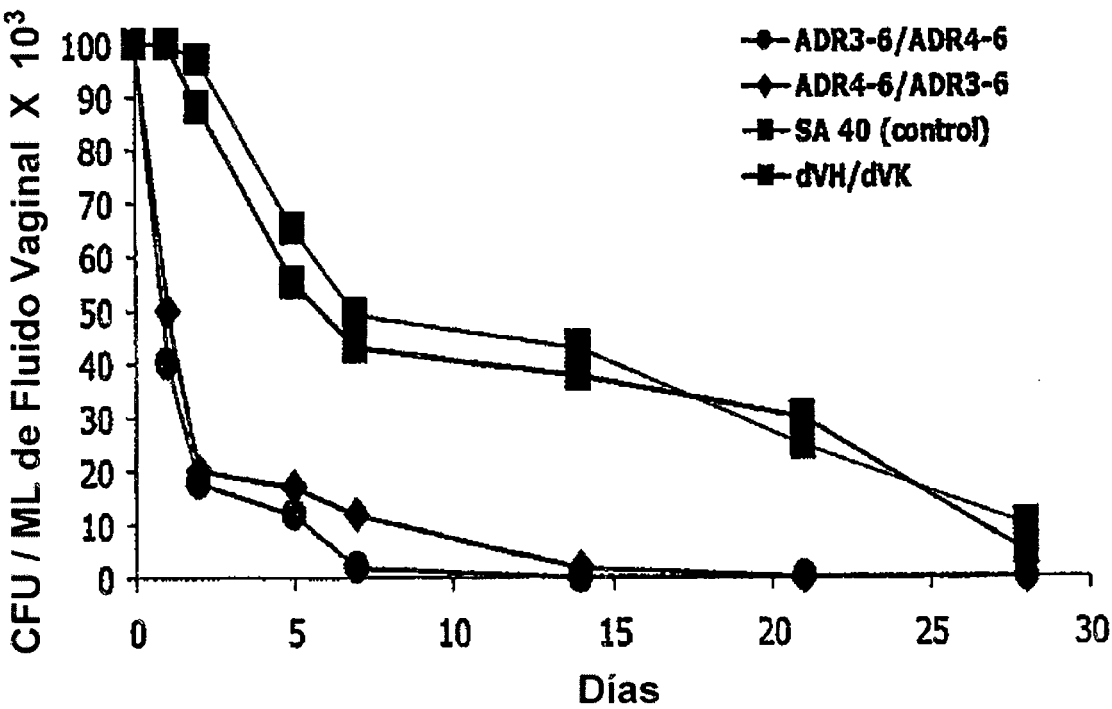


FIG. 6



TRADUCCION OFICIAL No. 2007-09-11-681
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

PCT/GB2006/000843

Casilla No. VIII(iv) DECLARACION: INVENTOR (únicamente para la designación de los Estados Unidos de América)

La declaración debe ajustarse a la siguiente redacción estandarizada suministrada en la Sección 214; ver las Notas a las Casillas Nos. VIII, VIII(i) a (v) (en general) y las Notas específicas a la Casilla No. VIII (iv). Si esta Casilla no se usa, esta hoja no debe incluirse en la solicitud.

Declaración de inventor (Reglas 4.17(iv) y 51bis.1(a)(iv))
para la designación de los Estados Unidos de América:

Por el presente declaro que creo ser el inventor original, primero y único (si sólo se menciona un nombre más adelante), o conjunto (si se menciona más de un inventor más adelante), de la materia objeto que se reivindica y para la cual se busca una patente.

Esta declaración está dirigida a la solicitud internacional de la cual forma parte (si se presenta una declaración con la solicitud.)

Esta declaración está dirigida a la solicitud internacional No. PCT/..... (si se presenta una declaración según la Regla 26ter).

Por el presente declaro que mi residencia, dirección postal y ciudadanía son como se expresa junto a mi nombre.

Por el presente declaro que he revisado y entiendo los contenidos de la solicitud internacional identificada a continuación, incluyendo las reivindicaciones de dicha solicitud. He identificado en la solicitud de dicha solicitud, en cumplimiento con la Regla 4.10 PCT, cualquier reivindicación de prioridad extranjera, y he identificado a continuación, bajo el encabezamiento "Solicitudes Anteriores", por número de solicitud, país o Miembro de la Organización Mundial del Comercio, día, mes y año de presentación, cualquier solicitud de patente o certificado de inventor presentado en un país diferente a los Estados Unidos de América, incluyendo cualquier solicitud internacional del PCT designando al menos a un país diferente a los

Estados Unidos de América, que tiene una fecha de presentación anterior a la de la solicitud sobre la cual se reivindica prioridad extranjera.

Solicitudes Anteriores: UK – 0505489.5 presentada el 18 de marzo de 2005 & UK – 0519883.3 presentada el 29 de septiembre de 2005

Por el presente reconozco el deber de revelar información que sé que es importante para patentabilidad según se define en 37 C.F.R. §1.56, incluyendo solicitudes para solicitudes de continuación en parte, información importante que se hizo disponible entre la fecha de presentación de la solicitud anterior y la fecha de presentación internacional del PCT de la solicitud de continuación en parte.

Mediante el presente declaro que todas las declaraciones hechas en el presente de mi propio conocimiento son verdaderas y que todas las declaraciones hechas sobre información y creencia se cree que son verdaderas; y además que estas declaraciones fueron dadas con el conocimiento de que las declaraciones intencionalmente fraudulentas y semejantes son castigables con multa o prisión, o ambos, bajo la Sección 1001 del Título 18 del Código de los Estados Unidos y que dichas declaraciones intencionalmente fraudulentas pueden perjudicar la validez de la solicitud o cualquier patente que se expida sobre ella.

Nombre: GRANT, Steven

Residencia: Reino Unido

(ciudad y estado de los EU, si aplica, o país)

Dirección de correo: 315 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0WG Reino Unido

Ciudadanía: Reino Unido

Firma del Inventor: (ilegible)

Fecha: 06 / 04 / 2006

(La firma debe ser la del inventor, no la del agente)

Nombre: HAIQUN, Liu

Residencia: Reino Unido

(ciudad y estado de los EU, si aplica, o país)

Dirección de correo: 315 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0WG Reino Unido

Ciudadanía: Reino Unido

Firma del Inventor: (ilegible)

Fecha: 24 / 4 / 2006

(La firma debe ser la del inventor, no la del agente)

☐ Esta declaración continúa en la página siguiente, "Continuación de la Casilla No. VIII(iv)".

Casilla No. VIII(iv) DECLARACION: INVENTOR (únicamente para la designación de los Estados Unidos de América)

La declaración debe ajustarse a la siguiente redacción estandarizada suministrada en la Sección 214; ver las Notas a las Casillas Nos. VIII, VIII(i) a (v) (en general) y las Notas específicas a la Casilla No. VIII (iv). Si esta Casilla no se usa, esta hoja no debe incluirse en la solicitud.

Declaración de inventor (Reglas 4.17(iv) y 51bis.1(a)(iv))
para la designación de los Estados Unidos de América:

Por el presente declaro que creo ser el inventor original, primero y único (si sólo se menciona un nombre más adelante), o conjunto (si se menciona más de un inventor más adelante), de la materia objeto que se reivindica y para la cual se busca una patente.

Esta declaración está dirigida a la solicitud internacional de la cual forma parte (si se presenta una declaración con la solicitud.)

Esta declaración está dirigida a la solicitud internacional No. PCT/GB2006/000843 (si se presenta una declaración según la Regla 26ter).

Por el presente declaro que mi residencia, dirección postal y ciudadanía son como se expresa junto a mi nombre.

Por el presente declaro que he revisado y entiendo los contenidos de la solicitud internacional identificada a continuación, incluyendo las reivindicaciones de dicha solicitud. He identificado en la solicitud de dicha solicitud, en cumplimiento con la Regla 4.10 PCT, cualquier reivindicación de prioridad extranjera, y he identificado a continuación, bajo el encabezamiento "Solicitudes Anteriores", por número de solicitud, país o Miembro de la Organización Mundial del Comercio, día, mes y año de presentación, cualquier solicitud de patente o certificado de inventor presentado en un país diferente a los Estados Unidos de América, incluyendo cualquier solicitud internacional del PCT designando al menos a un país diferente a los Estados Unidos de América, que tiene una fecha de presentación anterior a la de la solicitud sobre la cual se reivindica prioridad extranjera.

Solicitudes Anteriores: UK – 0505489.5 presentada el 18 de marzo de 2005 & UK – 0519883.3 presentada el 29 de septiembre de 2005

Por el presente reconozco el deber de revelar información que sé que es importante para patentabilidad según se define en 37 C.F.R. §1.56, incluyendo solicitudes para solicitudes de continuación en parte, información importante que se hizo disponible entre la fecha de presentación de la solicitud anterior y la fecha de presentación internacional del PCT de la solicitud de continuación en parte.

Mediante el presente declaro que todas las declaraciones hechas en el presente de mi propio conocimiento son verdaderas y que todas las declaraciones hechas sobre información y creencia se cree que son verdaderas; y además que estas declaraciones fueron dadas con el conocimiento de que las declaraciones intencionalmente fraudulentas y semejantes son castigables con multa o prisión, o ambos, bajo la Sección 1001 del Título 18 del Código de los Estados Unidos y que dichas declaraciones intencionalmente fraudulentas pueden perjudicar la validez de la solicitud o cualquier patente que se expida sobre ella.

Nombre: CASSONE, Antonio

Residencia: Italia

(ciudad y estado de los EU, si aplica, o país)

Dirección de correo: Via Meropia, 112.00147 – Roma, Italia

Ciudadanía: Italia

Firma del Inventor: (ilegible)

Fecha: 25 de julio de 2006

(La firma debe ser la del inventor, no la del agente)

Nombre: Flavia De Bernardis, Ph.D.

Residencia: Italia

(ciudad y estado de los EU, si aplica, o país)

Dirección de correo: Via del Nuoto, 16, 00194 – Roma, Italia

Ciudadanía: Italia

Firma del Inventor: (ilegible)

Fecha: 25 de julio de 2006

(La firma debe ser la del inventor, no la del agente)

☐ Esta declaración continúa en la página siguiente, "Continuación de la Casilla No. VIII(iv)".

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 11 de septiembre de 2007, 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 DE 1989 MINJUSTICIA
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

236

Sheet No.

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)
The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

**Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv))
for the purposes of the designation of the United States of America:**

I hereby declare that I believe I am the original, first and sole (if only one inventor is listed below) or joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/..... (if furnishing declaration pursuant to Rule 26ter).

I hereby declare that my residence, mailing address, and citizenship are as stated next to my name.

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application, including the claims of said application. I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4.10, any claim to foreign priority, and I have identified below, under the heading "Prior Applications," by application number, country or Member of the World Trade Organization, day, month and year of filing, any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America, including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America, having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed.

Prior Applications: UK - 0505489.5 - filed 18 March 2005 & UK - 0519883.3 - filed 29 September 2005

I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 C.F.R. § 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part application.

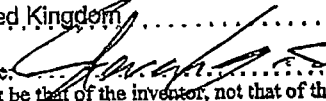
I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Name: GRANT, Steven

Residence: United Kingdom
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 315 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0WG, United Kingdom

Citizenship: United Kingdom

Inventor's Signature: 
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

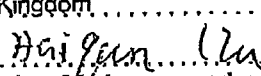
Date: 06/04/2006

Name: HAIQUN, Liu

Residence: United Kingdom
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 315 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0WG, United Kingdom

Citizenship: United Kingdom

Inventor's Signature: 
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Date: 24/4/2006

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

Form PCT/RO/101 (declaration sheet (iv)) (October 2005)

See Notes to the request form

Sheet No.

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)
The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

**Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv))
for the purposes of the designation of the United States of America:**

I hereby declare that I believe I am the original, first and sole (if only one inventor is listed below) or joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/..... (if furnishing declaration pursuant to Rule 26ter).

I hereby declare that my residence, mailing address, and citizenship are as stated next to my name.

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application, including the claims of said application. I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4.10, any claim to foreign priority, and I have identified below, under the heading "Prior Applications," by application number, country or Member of the World Trade Organization, day, month and year of filing, any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America, including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America, having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed.

Prior Applications: UK - 0505489.5 - filed 18 March 2005 & UK - 0519883.3 - filed 29 September 2005

I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 C.F.R. § 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part application.

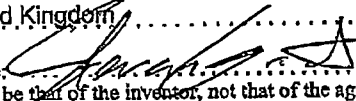
I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Name: GRANT, Steven

Residence: United Kingdom
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 315 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0WG, United Kingdom

Citizenship: United Kingdom

Inventor's Signature: 
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

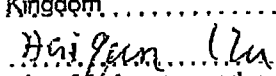
Date: 06/04/2006

Name: HAIQUN, Liu

Residence: United Kingdom
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 315 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0WG, United Kingdom

Citizenship: United Kingdom

Inventor's Signature: 
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Date: 24/4/2006

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- | | |
|---|---------|
| ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente | [x] 1 |
| ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [x] 1 |
| ◆ Descripción de la invención | [x] 84 |
| ◆ Dibujos de ser estos pertinentes | [x] 226 |
| ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas | [x] 2 |

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- | | | |
|---|---|-----|
| ◆ | Indicación de que se solicita el registro de 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 []

- | | | |
|---|---|-----|
| ◆ | Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado | [] |
| ◆ | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [] |
| ◆ | Representación gráfica del esquema trazado | [] |
| ◆ | Comprobante de pago de las tasas establecidas | [] |

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia