

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 015**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2006 E 06848335 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014 EP 1981538**

54 Título: **Proteínas de enlazamiento a la metaloproteinasa**

30 Prioridad:

30.12.2005 US 755376 P

22.06.2006 US 805567 P

18.12.2006 US 870566 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.12.2014

73 Titular/es:

**DYAX CORPORATION (100.0%)
300 TECHNOLOGY SQUARE, 8TH FLOOR
CAMBRIDGE, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**DEVY, LAETITIA;
PIETERS, HENK;
LADNER, ROBERT C.;
HOET, RENE;
HENDERIKX, MARIA;
WOOD, CLIVE R. y
DRANSFIELD, DANIEL T.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 524 015 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de enlazamiento a la metaloproteínasa

Antecedentes

5 Las metaloproteinasas de matriz (MMP) del tipo asociado a la membrana (MT) constituyen un subgrupo de las MMP ancladas a la membrana que son los mediadores principales de la proteólisis pericelular y activadores fisiológicos de la pro-MMP-2. Las MT-MMP activan la forma zimogénica de MMP-2 (pro-MMP-2 o pro-gelatinasa A) (Hernández-Barrantes et al., 2002, Semin. Cancer Biol, 12: 131 - 8; Zucker et al, 2003, Curr Top Dev Biol, 54: 1 - 74). La MMP-2, a su vez, puede activar la pro-MMP-9 (Toth et al., 2003, Biochem Biophys Res Commun, 308: 386 - 95). Las MT-MMP comprenden seis miembros de las MMP atadas al plasma, que incluyen cuatro enzimas transmembrana de tipo I (MMP-14, MMP-15, MMP-16 y MMP-24) y dos enzimas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (MMP-17 y MMP-25) (Zhao et al., 2004, J Biol Chem, 279: 8592 - 8601). Además de ser potentes enzimas degradadoras de la matriz extracelular (ECM), las MT-MMP transmembrana de tipo I también pueden iniciar una cascada de activación de zimógeno en la superficie celular.

15 Gálvez et al. (2001) J. Biol. Chem. 276: 37491 - 37500 describen la generación de anticuerpos monoclonales de ratón contra MMP-14 y su uso en ensayos in vitro para estudiar la función de MMP-14 en la motilidad endotelial y la remodelación de la matriz.

Resumen

20 Esta descripción se refiere, entre otras cosas, a las proteínas que se enlazan a MMP-14, denominadas en el presente documento como "proteínas de enlazamiento a la MMP-14", y a métodos de identificación y utilización de tales proteínas. Estas proteínas incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de primates y los Fab, especialmente anticuerpos humanos y los Fab) que se enlazan a y/o inhiben la MMP-14 (por ejemplo, la MMP-14 humana). Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades, particularmente enfermedades humanas, tales como el cáncer, en las que existe una actividad excesiva o inapropiada de la MMP-14. En muchos casos, las proteínas tienen una toxicidad baja tolerable o ninguna toxicidad. Entre estas proteínas de enlazamiento a la MMP-14, las proteínas aisladas de acuerdo con la invención se definen como en las reivindicaciones.

Algunas de estas proteínas de enlazamiento también se enlazan a y/o inhiben otras enzimas transmembrana de tipo I, tales como la MMP-16 y la MMP-24. La capacidad de inhibir dos o más de las MMP-14, MMP-16, y MMP-24 es útil para tratar enfermedades y condiciones a las que contribuyen estas MMP colectivamente.

30 En un aspecto, la divulgación presenta una proteína (por ejemplo, una proteína aislada) que se enlaza a la MMP-14 (por ejemplo, MMP-14 humana) e incluye al menos una región variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, la proteína incluye una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (HC) y una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera (LC). En una realización, la proteína se enlaza a, e inhibe la MMP-14, por ejemplo, la MMP-14 humana.

35 La proteína puede incluir una o más de las siguientes características: (a) una CDR humana o región marco humana; (b) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende una o más CDR que son al menos 85, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% idénticas a una CDR de un dominio variable de LC descrito en el presente documento; (c) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una o más CDR que son al menos 85, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% idénticas a una CDR de un dominio variable de HC descrito en el presente documento; (d) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC es al menos 85, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% idéntica a un dominio variable de LC descrito en este documento; (e) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC es de al menos 85, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% idéntica a un dominio variable de HC descrito en el presente documento; (f) la proteína se enlaza a un epítipo enlazado por una proteína descrita en este documento, o un epítipo que se traslapa con tale epítipo; y (g) una CDR de primate o región marco de primate.

40 La proteína puede enlazarse a la MMP-14, por ejemplo, la MMP-14 humana, con una afinidad de enlazamiento de al menos 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} y 10^{11} M⁻¹. En una realización, la proteína se enlaza a la MMP-14 con una K_{no} activada más lenta que 1×10^{-3} , 5×10^{-4} s⁻¹ o 1×10^{-4} s⁻¹. En una realización, la proteína se enlaza a la MMP-14 con una $K_{activada}$ más rápida que 1×10^2 , 1×10^3 , o 5×10^3 M⁻¹s⁻¹. En una realización, la proteína inhibe la actividad de la MMP-14 humana, por ejemplo, con una K_i de menos de 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , y 10^{-10} M. La proteína puede tener, por ejemplo, una IC50 de menos de 100 nM, 10 nM o 1 nM. Por ejemplo, la proteína modula en enlazamiento de la MMP-14 a proMMP-2, por ejemplo, mediante la inhibición de la activación de proMMP-2. La proteína puede inhibir la activación de la MMP-14 de pro-MMP2 in vitro en células HT-1080 activadas con PMA. La afinidad de la proteína por la MMP-14 se puede caracterizar por una K_D de menos de 100 nm, menos de 10 nM, o menos de 2,4 nM.

En una realización, la proteína se enlaza el dominio catalítico de la MMP-14 humana, por ejemplo, los residuos de los contactos de proteínas en o cerca del sitio activo de la MMP-14.

5 En una realización, la proteína también se enlaza a la MMP-16 y/o la MMP-24, por ejemplo, con una afinidad de enlazamiento de al menos 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} y 10^{11} M^{-1} . Por ejemplo, la proteína se enlaza tanto a la MMP-14 como a la MMP-16 o la MMP-24 con una afinidad de enlazamiento de al menos 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} y 10^{11} M^{-1} .

10 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo humano que tiene las cadenas ligera y pesada de anticuerpos escogidos de la lista que comprende M0031-C02, M0031-F01, M0033-H07, M0037-C09, M0037-D01, M0038-E06, M0038-F01, M0038-F08, M0039-H08, M0040-A06, M0040-A11 Y M0043-G02. En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo humano que tiene su cadena pesada escogida de la lista que comprende M0031-C02, M0031-F01, M0033-H07, M0037-C09, M0037-D01, M0038-E06, M0038-F01, M0038-F08, M0039-H08, M0040-A06, M0040-A11 y M0043-G02. En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo humano que tiene su cadena ligera escogida de la lista que comprende M0031-C02, M0031-F01, M0033-H07, M0037-C09, M0037-D01, M0038-E06, M0038-F01, M0038-F08, M0039-H08, M0040-A06, M0040-A11 y M0043-G02. En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo humano que tiene una o más CDR de cadena pesada escogidas de las CDR correspondientes de la lista de cadenas pesadas que comprende M0031-C02, M0031-F01, M0033-H07, M0037-C09, M0037-D01, M0038-E06, M0038-F01, M0038-F08, M0039-H08, M0040-A06, M0040-A11 y M0043-G02. En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo humano que tiene una o más CDR de cadena ligera escogidas de las CDR correspondientes de la lista de cadenas pesadas que comprende M0031-C02, M0031-F01, M0033-H07, M0037-C09, M0037-D01, M0038-E06, M0038-F01, M0038-F08, M0039-H08, M0040-A06, M0040-A11 y M0043-G02.

25 En una realización, las secuencias de dominio variable de LC y de HC son componentes de la misma cadena polipeptídica. En otra, las secuencias de dominio variable de LC y de HC son componentes de diferentes cadenas polipeptídicas. Por ejemplo, la proteína es una IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. La proteína puede ser un Fab soluble. En otra implementación la proteína incluye un Fab2', scFv, minicuerpo, la fusión scFv::Fc, la fusión Fab::HSA, la fusión HSA::Fab, la fusión Fab::HSA::Fab, u otra molécula que comprende al sitio de combinación del antígeno de una de las proteínas de enlazamiento de la presente invención. Las regiones VH y VL de estos Fab se pueden proveer como IgG, Fab, Fab2, Fab2', scFv, Fab PEGilado, scFv PEGilado, Fab2 PEGilado, VH::CH1::HSA + LC, HSA::VH::CH1 + LC, LC::HSA + VH::CH1, HSA::LC + VH::CH1, u otra construcción apropiada.

30 En una realización, la proteína es un anticuerpo humano o humanizado o es no inmunogénico en un ser humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones marco de anticuerpo humano, por ejemplo, todas las regiones marco humanas. En una realización, la proteína incluye un dominio de Fc humano, o un dominio de Fc que es al menos 95, 96, 97, 98, o 99% idéntico a un dominio de Fc humano.

35 En una realización, la proteína es un anticuerpo de primate o primatizado o es no inmunogénico en un ser humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones marco de anticuerpo de primate, por ejemplo, todas las regiones marco de primates. En una realización, la proteína incluye un dominio de Fc de primate, o un dominio de Fc que es al menos 95, 96, 97, 98, o 99% idéntico a un dominio de Fc de primates. "Primate" incluye a los humanos (*Homo sapiens*), chimpancés (*Pan troglodytes* y *Pan paniscus* (bonobos)), gorilas (*Gorilla gorilla*), gibones, monos, lémures, aye-ayes (*Daubentonia madagascariensis*) y tarsiers.

40 En algunas realizaciones, la afinidad del anticuerpo de primate por MMP-14 se caracteriza por una K_D de menos de 1,2 nM.

En ciertas realizaciones, la proteína no incluye secuencias de ratones o conejos (por ejemplo, no es un anticuerpo de murino o de conejo).

45 En una realización, la proteína es capaz de enlazarse a células tumorales que expresan MMP-14, por ejemplo, a células HT-1080 (una línea de células de fibrosarcoma humano), LNCaP (carcinoma de próstata humano), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama de humana caucásica), o PC3 (células de cáncer prostático humano).

En una realización, la proteína se asocia físicamente con una nanopartícula, y se puede utilizar para guiar una nanopartícula a una célula que expresa MMP-14 sobre la superficie de la célula. En una realización, la proteína hace que las células efectoras (CDC o ADCC) maten una célula que expresa MMP-14.

50 Se puede proporcionar una proteína de enlazamiento descrita en la presente invención como una composición farmacéutica, por ejemplo, incluyendo un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede estar al menos 10, 20, 30, 50, 75, 85, 90, 95, 98, 99, o 99,9% libre de otras especies de proteínas.

En otro aspecto, la divulgación presenta un método de detección de una MMP-14 en una muestra. El método incluye: poner en contacto la muestra con una proteína de enlazamiento a la MMP-14; y detectar una interacción entre la proteína y la MMP-14, si está presente. En algunas realizaciones, la proteína incluye una etiqueta detectable. Una proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede ser utilizada para detectar la MMP-14 en un sujeto. El método incluye: la administración de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 a un sujeto; y la detección de la proteína en el sujeto. En algunas realizaciones, la proteína incluye además una etiqueta detectable. Por ejemplo, la detección comprende la formación de imágenes del sujeto.

En otro aspecto, la divulgación presenta un método para modular la actividad de MMP-14. El método incluye: poner en contacto una MMP-14 con una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, en un sujeto humano), modulando de esta manera la actividad de la MMP-14.

En otro aspecto, la divulgación presenta un método de tratamiento de cáncer (por ejemplo, cáncer metastásico). El método incluye: administrar, a un sujeto, una proteína de enlazamiento a la MMP-14 en una cantidad suficiente para tratar un cáncer en el sujeto. Por ejemplo, el cáncer es cáncer de cabeza y cuello, cáncer de la cavidad oral, cáncer de laringe, el condrosarcoma, cáncer de mama (que puede ser receptor de estrógeno positivo (ER+), receptor de estrógeno negativo (ER-), Her2 positivo (Her2+), Her2 negativo (Her2-), o una combinación de los mismos, por ejemplo, ER+ / Her2+, ER+ / Her2-, ER- / Her2+ o ER- / Her2-), cáncer de laringe, cáncer de ovario, carcinoma testicular, melanoma, o tumores cerebrales (por ejemplo, astrocitomas, glioblastomas, gliomas).

Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 son útiles para modular la actividad metastásica en un sujeto. Se puede administrar la proteína al sujeto, una proteína de enlazamiento a la MMP-14 en una cantidad efectiva para modular la actividad metastásica. Por ejemplo, la proteína inhibe uno o más de: el crecimiento del tumor, embolismo tumoral, movilidad tumoral, invasividad tumoral, proliferación de células cancerosas.

Los métodos descritos en este documento en relación con el tratamiento del cáncer (por ejemplo, el tratamiento del cáncer y/o modulación de la actividad metastásica) puede incluir además proporcionar al sujeto una segunda terapia que es una terapia contra el cáncer, por ejemplo, la administración de un agente quimioterapéutico, por ejemplo, un agente que antagoniza la señalización a través de una ruta del VEGF, por ejemplo, bevacizumab (AVASTIN®). En una realización, la segunda terapia incluye la administración de 5-FU, leucovorina, y/o irinotecano. En una realización, la segunda terapia incluye la administración de un inhibidor de Tiel (por ejemplo, un anticuerpo anti-Tiel). En una realización, la segunda terapia es un inhibidor de plasmina (por ejemplo, un dominio Kunitz descrito en la patente de los Estados Unidos No. 6.010.880, tal como una proteína o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos MHSFCAFKAEATGPCRARFDRWFFNIFTRQCEEFYGGCEGNQNRFSLEECKK MCTRD (SEQ ID NO:).

Los inhibidores de la MMP-14 (por ejemplo, las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 descritos en este documento) pueden potenciar la actividad de un agente que dirige a Her2 (por ejemplo, un anticuerpo de enlazamiento a Her2 tal como trastuzumab). Por consiguiente, en una realización, la segunda terapia es un agente que se enlaza a Her2, tal como un anticuerpo de enlazamiento a Her2 (por ejemplo, trastuzumab). En algunas de tales realizaciones, la dosis del agente de enlazamiento a Her2 se reduce de la dosis del agente de enlazamiento a Her2 cuando no se administra en combinación con una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, es al menos 10%, 25%, 40%, o 50% menor que la dosis del agente de enlazamiento a Her2 cuando no se administra en combinación con una proteína de enlazamiento a la MMP-14)

En otro aspecto, la divulgación presenta un método para tratar una afección ocular. El método incluye: administrar, a un sujeto, una proteína de enlazamiento a la MMP-14 en una cantidad suficiente para tratar la afección ocular. En una realización, el método incluye además la administración de un segundo agente, un agente que antagoniza la señalización a través de una ruta del VEGF, por ejemplo, bevacizumab o ranibizumab. En una realización en la que el segundo agente es un inhibidor de la ruta del VEGF (por ejemplo, bevacizumab o ranibizumab), la condición ocular es la degeneración macular relacionada con la edad, tal como la degeneración macular húmeda relacionada con la edad.

En otro aspecto, la divulgación presenta un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, sinovitis, artritis reumatoide). El método incluye: administrar, a un sujeto, una proteína de enlazamiento a la MMP-14 en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad inflamatoria. El método puede incluir además proporcionar al sujeto una segunda terapia que es una terapia antiinflamatoria. Por ejemplo, en particular para la artritis reumatoide, la segunda terapia comprende la administración de uno o más de los siguientes agentes: aspirina, naproxeno, ibuprofeno, etodolac, cortisona (corticosteroides), antiácidos, sucralfato, inhibidores de la bomba de protones, misoprostol, oro (por ejemplo, sales de oro, tioglucosa de oro, tiomalato de oro, oro oral), metotrexato, sulfasalazina, D-penicilamina, azatioprina, ciclofosfamida, clorambucil, ciclosporina, leflunomida, etanercept, infliximab, anakinra, adalimumab, y/o hidroxycloquina.

En otro aspecto, la divulgación presenta un método de tratamiento de la osteoartritis. El método incluye: administrar, a un sujeto, una proteína de enlazamiento a la MMP-14 en una cantidad suficiente para tratar la osteoartritis. El método puede incluir además proporcionar al sujeto una segunda terapia que es una terapia contra la osteoartritis.

5 En otro aspecto, la divulgación presenta un método de tratamiento de la diabetes. El método incluye: administrar, a un sujeto, una proteína de enlazamiento a la MMP-14 en una cantidad suficiente para tratar la diabetes. El método puede incluir además proporcionar al sujeto una segunda terapia que es una terapia para la diabetes. Por ejemplo, la segunda terapia comprende la administración de uno o más de los siguientes agentes: sulfonilureas, meglitinidas, biguanidas, metformina, troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona, acarbosa, pramlintida, exenatida, gliburida/metformina (GLUCOVANCE®), rosiglitazona/metformina (AVANDAMET®), y/o glipizida/metformina (METAGLIP®).

10 En otro aspecto, la divulgación presenta un método de tratamiento para la enfermedad de Alzheimer. El método incluye: administrar, a un sujeto, una proteína de enlazamiento a la MMP-14 en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad de Alzheimer. El método puede incluir además proporcionar al sujeto una segunda terapia que es una terapia para la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, el segundo tratamiento comprende la administración de uno o más de los siguientes agentes: tacrina (COGNEX®), donepezil (ARICEPT®), rivastigmina (EXELON®), galantamina (REMINYL®), memantina (NAMENDA^{MR}), los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), estatinas, ácido fólico, ginkgo biloba, vitamina E, vitamina B6 y/o vitamina B12.

20 Otros ejemplos de métodos terapéuticos que incluyen la administración de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 se describen a continuación. Una proteína de enlazamiento a la MMP-14 descrita en la presente invención se puede administrar en combinación con uno o más de otros inhibidores de MMP, por ejemplo, inhibidores de molécula pequeña, por ejemplo, inhibidores de amplia especificidad. En una realización, los inhibidores de molécula pequeña son uno o más de neovastat, marimastat, BAY 12-9566, o prinomastat. En otra realización, los uno o más inhibidores de MMP incluyen otra proteína de enlazamiento a la MMP-14.

25 Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 son útiles para la administración dirigida de un agente a un sujeto (por ejemplo, un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un tumor), por ejemplo, para dirigir el agente a un tumor en el sujeto. Por ejemplo, se puede administrar una proteína de enlazamiento a la MMP-14 que está acoplada a un agente antitumoral (tal como un agente quimioterapéutico, toxina, fármaco, o un radionúclido (por ejemplo, ¹³¹I, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu)) a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un tumor.

30 En otro aspecto, la divulgación presenta un método de formación de imágenes de un sujeto. El método incluye la administración de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 al sujeto. En algunas realizaciones, la proteína es una que no inhibe sustancialmente la actividad catalítica de la MMP-14. La proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede incluir una etiqueta detectable (por ejemplo, un radionucleido o una etiqueta detectable IRM). En una realización, el sujeto tiene o se sospecha que tiene un tumor. El método es útil para el diagnóstico del cáncer, la detección intraoperatoria de tumores, la detección postoperatoria de tumores, o el seguimiento de la actividad invasiva del tumor.

35 En un aspecto, la divulgación presenta el uso de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 descrito en la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno descrito en la presente invención, por ejemplo, un cáncer (por ejemplo, cáncer metastásico, por ejemplo, cáncer metastásico de mama), una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, sinovitis, aterosclerosis), artritis reumatoide, osteoartritis, una afección ocular (por ejemplo, degeneración macular), diabetes, enfermedad de Alzheimer, isquemia cerebral, endometriosis, la actividad invasiva de fibrina, o angiogénesis desregulada o inapropiada. Incluso otros trastornos que pueden ser tratados utilizando un medicamento que comprende una proteína de enlazamiento a la MMP-14 incluyen: aneurismas aórticos, periodontitis, trastornos autoinmunes de la piel con formación de ampollas, fotoenvejecimiento de la piel.

45 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción siguiente. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B muestran una serie de gráficos que representan la determinación de los valores de K_i de proteínas de enlazamiento a la MMP-14.

50 La Figura 2 es una reproducción de una zimograma de gelatina.

La Figura 3 muestra una serie de gráficos que representan el enlazamiento de anticuerpos de línea germinal (línea germinal 539C-539C y línea germinal M0038F01-M0033-H07) a la MMP-14.

La Figura 4 muestra la serie de gráficos que representan la determinación de los valores de IC50 (contra hMMP-14 2 pM) para dos anticuerpos de línea germinal (línea germinal 539C-539C y línea germinal M0038F01-M0033-H07) en comparación con los anticuerpos originales.

5 La Figura 5 muestra reproducciones de zimogramas de gelatina realizados con anticuerpos de la línea germinal 539C-M0038F01 Geneart y 539C-M0033-H07 Geneart.

La Figura 6A muestra fotomicrografías de cultivos tridimensionales de HUVEC tratados con vehículo, M0038 F01 a diferentes dosis, o suramina. La Figura 6B muestra un gráfico que resume las mediciones de longitud del tubo a partir del mismo experimento.

10 Figura 7 muestra un gráfico que resume los resultados de un experimento que examina el efecto de un anticuerpo de enlazamiento a la MMP-14 (M0038-F01) sobre el crecimiento de los tumores derivados de células MDA-MB-231 ortotópicamente inyectados en las almohadillas de grasa mamaria de ratones hembra Balb/c hembra. El eje y es el volumen del tumor (en milímetros cúbicos) y el eje x es el tiempo (en semanas), a partir del inicio de la dosificación.

15 La Figura 8 muestra un gráfico que resume los resultados de un experimento que examina el efecto de un intervalo de dosis de un anticuerpo de enlazamiento a la MMP-14 (M0038-F01) sobre el crecimiento de los tumores derivados de células MDA-MB-231 ortotópicamente inyectadas en las almohadillas de grasa mamaria de ratones Balb / c hembra. El eje y es el volumen del tumor (en milímetros cúbicos) y el eje x es el tiempo (en semanas), a partir de la iniciación de la dosificación.

20 La Figura 9 muestra un gráfico que resume los resultados de un experimento que examina el efecto de un intervalo de dosis de un anticuerpo de enlazamiento a la MMP-14 (M0038-F01) sobre el crecimiento de tumores de mama con GFP de células MDA-MB-435 ortotópicamente trasplantadas en las almohadillas de grasa mamaria de ratones Balb / c hembra (descrito en el Ejemplo 15). El eje y es el volumen del tumor (en milímetros cúbicos) y el eje x es el tiempo (en semanas), a partir de la iniciación de la dosificación.

25 La Figura 10A muestra un gráfico que resume los resultados de un experimento que examina el efecto de un intervalo de dosis de un anticuerpo de enlazamiento a la MMP-14 (M0038-F01) sobre el crecimiento de tumores de melanoma B 16F1 implantados en forma subcutánea (descrito en el Ejemplo 16). El eje y es el volumen del tumor (en milímetros cúbicos) y el eje x es el tiempo (en semanas), a partir de la iniciación de la dosificación.

La Figura 10B muestra la cuantificación de los nódulos pulmonares después del tratamiento con Dox, M0038F01 y un control del anticuerpo emparejado con el isotipo en metástasis de melanoma B16F1. El eje y es el número total de nódulos pulmonares.

30 La Figura 11 muestra un gráfico que resume los resultados de un experimento que examina el efecto de un intervalo de dosis de un anticuerpo de enlazamiento a la MMP-14 (M0038-F01) sobre el crecimiento de los tumores de próstata PC3 en ratones (descrito en el Ejemplo 17). El eje y es el volumen del tumor (en milímetros cúbicos) y el eje x es el tiempo (en semanas), a partir de la iniciación de la dosificación.

35 La Figura 12 muestra un gráfico que resume los resultados de un experimento que examina el efecto de un intervalo de dosis de un anticuerpo de enlazamiento a la MMP-14 (M0038-F01 o "F01") sobre el crecimiento de tumores de mama BT474 en ratones (descrito en el Ejemplo 18). El eje y es el volumen del tumor (en milímetros cúbicos) y el eje x es el tiempo (en días), a partir de la iniciación de la dosificación.

Descripción detallada

40 Las metaloproteinasas de matriz funcionan en la remodelación fisiológica de la matriz extracelular, por ejemplo, durante la morfogénesis de tejidos, el crecimiento, el ciclo uterino y la involución postparto, la reparación de tejidos, y la angiogénesis. Tres proteasas que tienen estas actividades son MMP-14, MMP-16 y MMP-24. La descripción proporciona proteínas de enlazamiento a la MMP-14, incluyendo la proteínas de enlazamiento a la MMP-14 que inhiben la actividad de enlazamiento a la MMP-14. Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 enseñadas por la descripción también se pueden enlazar, y en algunas realizaciones también inhibir, MMP-16 y/o MMP-24.

45 El término "proteína de enlazamiento" se refiere a una proteína que puede interactuar con una molécula objetivo. Este término se usa de manera intercambiable con "ligando". Una "proteína de enlazamiento a la MMP-14" se refiere a una proteína que puede interactuar con MMP-14, e incluye, en particular, proteínas que interactúan preferentemente con y/o que inhiben a la MMP-14. Por ejemplo, la proteína de enlazamiento a la MMP-14 es un anticuerpo.

El término "anticuerpo" se refiere a una proteína que incluye al menos un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de cadena pesada (H) (abreviada en este documento como VH), y una región variable de cadena ligera (L) (abreviada en este documento como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de cadena pesada (H) y dos regiones variables de cadena ligera (L). El término "anticuerpo" abarca fragmentos de enlazamiento a antígeno de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab y sFab, F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fv, scFv, y fragmentos de anticuerpos de dominio (dAb) (de Wildt et al., Eur J Immunol. 1996; 26 (3): 629 - 39)), así como anticuerpos completos. Un anticuerpo puede tener las características estructurales de IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como subtipos de los mismos). Los anticuerpos pueden ser de cualquier fuente, pero se prefieren de primate (primate humano y no humano) y primatizados.

Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" ("FR"). La extensión de la región marco y las CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat, EA, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación del NIH No. 91-3242, y Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901 - 917, véase también www.hgmp.mrc.ac.uk). Se usan aquí las definiciones de Kabat. Cada VH y VL se compone típicamente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Como se usa en este documento, una "secuencia del dominio variable de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede formar la estructura de un dominio variable de inmunoglobulina de tal manera que una o más regiones CDR están posicionadas en una conformación adecuada para un sitio de enlazamiento de antígeno. Por ejemplo, la secuencia puede incluir toda o parte de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la secuencia puede omitir uno, dos o más aminoácidos del terminal N o C, aminoácidos internos, puede incluir una o más inserciones o aminoácidos terminales adicionales, o puede incluir otras alteraciones. En una realización, un polipéptido que incluye la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina se puede asociar con otra secuencia del dominio variable de inmunoglobulina para formar un sitio de enlazamiento de antígeno, por ejemplo, una estructura que interacciona preferentemente con una proteína MMP-14, por ejemplo, el dominio catalítico de MMP-14.

La cadena VH o VL del anticuerpo puede incluir además todo o parte de una región constante de cadena pesada o ligera, para formar de esta manera una cadena de inmunoglobulina pesada o ligera, respectivamente. En una realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, donde las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina están interconectadas, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. En las IgG, la región constante de cadena pesada incluye tres dominios de inmunoglobulina, CH1, CH2 y CH3. La región constante de cadena ligera incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de enlazamiento que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos típicamente median la enlazamiento del anticuerpo a tejidos huésped o factores, incluyendo diferentes células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento. Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de los tipos kappa o lambda. En una realización, el anticuerpo está glicosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para citotoxicidad que depende del anticuerpo y/o citotoxicidad mediada por el complemento.

Una o más regiones de un anticuerpo pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las regiones variables pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDR puede ser humanas, por ejemplo, HC CDRL, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, y LC CDR3. Cada una de las CDR de cadena ligera puede ser humana. HC CDR3 puede ser humana. Una o más de las regiones marco puede ser humana, por ejemplo, FR1, FR2, FR3, y FR4 de la HC o LC. Por ejemplo, la región de Fc puede ser humana. En una realización, todas las regiones marco son humanas, por ejemplo, derivadas de una célula somática humana, por ejemplo, una célula hematopoyética que produce inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En una realización, las secuencias humanas son secuencias de línea germinal, por ejemplo, codificadas por un ácido nucleico de línea germinal. En una realización, los residuos en el marco (FR) de un Fab seleccionado se pueden convertir al del tipo de aminoácido del residuo correspondiente en el gen de línea germinal de primate más similar, especialmente el gen de línea germinal humana. Una o más de las regiones constantes pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, al menos 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98, o 100% de un dominio variable de inmunoglobulina, la región constante, los dominios constantes (CH1, CH2, CH3, CL1), o el anticuerpo completo pueden ser humanos o efectivamente humanos.

Todo o parte de un anticuerpo puede estar codificado por un gen de inmunoglobulina o un segmento del mismo. Ejemplos de genes de inmunoglobulina humana incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon y mu, así como los muchos genes de región variable de inmunoglobulina. Las "cadenas ligeras" de longitud completa de inmunoglobulina (aproximadamente 25 kDa o aproximadamente 214 aminoácidos) son codificadas por un gen de la región variable en el terminal NH2

(aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda en el terminal COOH. Las "cadenas pesadas" de longitud completa de inmunoglobulina (aproximadamente 50 kDa o aproximadamente 446 aminoácidos), están codificadas de manera similar por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de región constante mencionados anteriormente, por ejemplo, gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). La longitud de HC humana varía considerablemente debido a que HC CDR3 varía desde aproximadamente 3 residuos de aminoácidos a más de 35 residuos de aminoácidos.

El término "fragmento de enlazamiento de antígeno" de un anticuerpo de longitud completa se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que retienen la capacidad de enlazarse específicamente a un objetivo de interés. Ejemplos de fragmentos de enlazamiento abarcados dentro de la expresión "fragmento de enlazamiento a antígeno" de un anticuerpo de longitud completa incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544 - 546), que consiste de un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR) que conserva la funcionalidad. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite convertirlas en una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv). Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5.260.203, 4.946.778 y 4.881.175; Bird et al. (1988) Science 242: 423 - 426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU. 85: 5879 - 5883.

Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener usando cualquier técnica apropiada, incluyendo las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. El término "anticuerpo monoespecífico" se refiere a un anticuerpo que muestra una única especificidad de enlazamiento y afinidad por un objetivo particular, por ejemplo, un epítipo. Este término incluye un "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", que tal como se utiliza aquí, se refieren a una preparación de anticuerpos o fragmentos de los mismos de composición molecular única, independientemente de cómo se generó el anticuerpo.

Una región variable de inmunoglobulina "efectivamente humana" es una región variable de inmunoglobulina que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos marco humano de modo que la región variable de la inmunoglobulina no provoca una respuesta inmunogénica en un ser humano normal. Un anticuerpo "efectivamente humano" es un anticuerpo que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos humanos tal que el anticuerpo no provoca una respuesta inmunogénica en un ser humano normal.

Una región variable de inmunoglobulina "humanizada" es una región variable de inmunoglobulina que se modifica para incluir un número suficiente de posiciones de aminoácidos marco humanos de modo que la región variable de inmunoglobulina no provoca una respuesta inmunogénica en un ser humano normal. Descripciones de inmunoglobulinas "humanizadas" están incluidas, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.407.213 y 5.693.762.

Como se utiliza en la presente memoria, "afinidad de enlazamiento" se refiere a la constante de asociación aparente o K_a. La K_a es el recíproco de la constante de disociación (K_d). Una proteína de enlazamiento puede, por ejemplo, tener una afinidad de enlazamiento de al menos 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰ y 10¹¹ M⁻¹ para una molécula objetivo particular, por ejemplo, MMP-14, MMP-16, o MMP-24. Un enlazamiento de afinidad más alta de una proteína de enlazamiento con un primer objetivo con relación a un segundo objetivo puede ser indicado mediante una K_a mayor (o un valor numérico más pequeño de K_d) para el enlazamiento del primer objetivo que la K_a (o valor numérico de K_d) para el enlazamiento del segundo objetivo. En tales casos, la proteína de enlazamiento tiene especificidad por el primer objetivo (por ejemplo, una proteína en una primera conformación o imitación de la misma) con respecto al segundo objetivo (por ejemplo, la misma proteína en una segunda conformación o imitación de la misma, o una segunda proteína). Las diferencias en afinidad de enlazamiento (por ejemplo, para especificidad u otras comparaciones) puede ser de al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, o 10⁵ veces.

La afinidad de enlazamiento puede determinarse mediante una variedad de métodos que incluyen diálisis de equilibrio, enlazamiento de equilibrio, filtración en gel, ELISA, resonancia de plasmón superficial, o espectroscopia (por ejemplo, usando un ensayo de fluorescencia). Ejemplos de condiciones para evaluar la afinidad de enlazamiento están en el amortiguador TRIS (TRIS 50 nM, NaCl 150 nM, CaCl₂ 5 nM a pH 7,5). Estas técnicas pueden usarse para medir la concentración de proteína enlazada y de enlazamiento libre en función de la proteína de enlazamiento (u objetivo). La concentración de la proteína de enlazamiento enlazada ([Enlazada]) se relaciona con la concentración de la proteína de enlazamiento libre ([Libre]) y la concentración de sitios de enlazamiento para la proteína de enlazamiento en el objetivo donde (N) es el número de sitios de enlazamiento por molécula objetivo mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{Enlazada}] = N \cdot [\text{Libre}] / ((1 / K_a) + [\text{Libre}]).$$

No siempre es necesario hacer una determinación exacta de K_a , sin embargo, ya que algunas veces es suficiente obtener una medida cuantitativa de la afinidad, por ejemplo, determinada usando un método tal como ELISA o análisis FACS, es proporcional a K_a , y por lo tanto se puede utilizar para comparaciones, tales como la determinación de si una mayor afinidad es, por ejemplo, 2 veces mayor, para obtener una medición cualitativa de afinidad, o para obtener una inferencia de afinidad, por ejemplo, mediante la actividad en un ensayo funcional, por ejemplo, un ensayo *in vitro* o *in vivo*.

Una "composición aislada" se refiere a una composición al que se le remueve de menos el 90% de al menos un componente de una muestra natural de la que la composición aislada se puede obtener. Las composiciones producidas artificialmente o naturalmente pueden ser "composiciones de al menos" un cierto grado de pureza si la especie o población de especies de interés, es al menos 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98, o 99% pura con base en una relación peso - peso.

Un "epítopo" se refiere al sitio en un compuesto objetivo que está enlazado por una proteína de enlazamiento (por ejemplo, un anticuerpo tal como un fragmento Fab o anticuerpo de longitud completa). En el caso en el que el compuesto objetivo es una proteína, el sitio puede estar compuesto totalmente de los componentes aminoácidos, compuesto en su totalidad de modificaciones químicas de aminoácidos de la proteína (por ejemplo, fracciones glicosilo), o compuesto de combinaciones de los mismos. Los epítopos que se superponen incluyen al menos un residuo aminoácido común, grupo glicosilo, grupo fosfato, grupo sulfato, u otra característica molecular.

Los cálculos de "homología" o de "identidad de secuencia" entre dos secuencias (los términos se utilizan indistintamente en este documento) se realizan de la siguiente forma. Las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para la alineación óptima y pueden ignorarse secuencias no homólogas para propósitos de comparación). La alineación óptima se determina como la mejor puntuación usando el programa GAP en el paquete de software GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por extensión del hueco de 4, y una penalización por hueco en el marco de lectura de 5. Los residuos de aminoácidos o de nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos se comparan luego. Cuando una posición en 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 usa en el presente documento, "identidad" de aminoácidos o de ácidos nucleicos es equivalente a "homología" 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.

En una realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines de comparación es al menos del 30%, preferiblemente al menos del 40%, más preferiblemente al menos del 50%, incluso más preferiblemente al menos del 60%, e aún más preferiblemente al menos del 70%, 80%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, o 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia de referencia puede ser la longitud de la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina.

Tal como se utiliza aquí, el término "sustancialmente idéntica" (o "sustancialmente homóloga") se utiliza aquí para referirse a una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico que contiene una cantidad suficiente de, residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, con una cadena lateral similar, por ejemplo, sustituciones conservadas de aminoácidos) con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de tal manera que la primera y segunda secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico tengan (o codifiquen proteínas que tienen) actividades similares, por ejemplo, una actividad de enlazamiento, una preferencia de enlazamiento, o una actividad biológica. En el caso de anticuerpos, el segundo anticuerpo tiene la misma especificidad y tiene al menos 50%, al menos 25%, o al menos 10% de afinidad con relación al mismo antígeno.

Secuencias similares u homólogas (por ejemplo, al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia) con las secuencias descritas en este documento son también parte de esta solicitud. En algunas realizaciones, la identidad de secuencia puede ser aproximadamente del 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior. Además, existe identidad sustancial cuando los segmentos de ácido nucleico hibridan bajo condiciones de hibridación selectivas (por ejemplo, condiciones de hibridación altamente rigurosas), con el complemento de la hebra. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura.

Tal como se utiliza aquí, el término "hibrida bajo condiciones de baja rigurosidad, rigurosidad media, alta rigurosidad o muy alta rigurosidad" describe condiciones para hibridación y lavado. La guía para la realización de reacciones de hibridación se puede encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1989), 6.3.1 - 6.3.6. Se describen métodos acuosos y no acuosos en esa referencia y, se puede utilizar cualquiera. Las condiciones de hibridación específicas mencionadas en este documento son las siguientes: (1) condiciones de hibridación de baja rigurosidad en 6X cloruro de sodio / citrato de sodio (SSC) aproximadamente a 45 °C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,1% de SDS al menos a 50°C (la temperatura de los lavados se puede

incrementar hasta 55 °C para condiciones de baja rigurosidad); (2) condiciones de hibridación de rigurosidad media en 6X SSC aproximadamente a 45 °C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,1% de SDS a 60 °C; (3) condiciones de hibridación de alta rigurosidad en 6X SSC aproximadamente a 45 °C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,1% de SDS a 65 °C; y (4) condiciones de hibridación de muy alta rigurosidad son fosfato de sodio 0,5 M, 7% de SDS a 65 °C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC, 1% de SDS a 65 °C. Las condiciones de muy alta rigurosidad (4) son las condiciones preferidas y son aquellas que se deben utilizar a menos que se especifique otra cosa. La descripción incluye ácidos nucleicos que hibridan con rigurosidad baja, media, alta, o muy alta con un ácido nucleico descrito en el presente documento o con un complemento del mismo, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican una proteína de enlazamiento descrito en el presente documento. Los ácidos nucleicos pueden ser de la misma longitud o estar dentro del 30, 20, o 10% de la longitud del ácido nucleico de referencia. El ácido nucleico puede corresponder a una región que codifica una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina descrita en este documento.

Una proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede tener mutaciones (por ejemplo, al menos una, dos, o cuatro, y/o menos de 15, 10, 5, o 3) con relación a una proteína de enlazamiento descrito en el presente documento (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos no esenciales o conservadas), que no tienen un efecto sustancial sobre la función de la proteína. Sea o no tolerada una sustitución particular, es decir, que no afecta adversamente las propiedades biológicas, tal como la actividad de enlazamiento, puede ser predicha, por ejemplo, evaluando si se conserva la mutación o por el método de Bowie, et al. (1990) Science 247:1306-1310.

Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolinea, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificado (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Es posible que muchos residuos de aminoácidos de la CDR y del marco incluyan una o más sustituciones conservadoras.

Las secuencias de motivos para biopolímeros pueden incluir posiciones que pueden ser diferentes aminoácidos. Por ejemplo, el símbolo "X" en este contexto se refiere generalmente a cualquier aminoácido (por ejemplo, cualquiera de los veinte aminoácidos naturales o de cualquiera de los diecinueve aminoácidos sin cisteína). Otros aminoácidos permitidos también pueden ser indicados, por ejemplo, usando paréntesis y barras oblicuas. Por ejemplo, "(A / W / F / N / Q)" significa que alanina, triptófano, fenilalanina, asparagina, y glutamina son permitidos en esa posición particular.

Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede ser alterado a partir de la secuencia de tipo silvestre del agente de enlazamiento, por ejemplo, el anticuerpo, sin eliminar o más preferiblemente, sin alterar sustancialmente una actividad biológica, mientras que cambiar un residuo de aminoácido "esencial" da como resultado una pérdida sustancial de actividad.

El término "ligando afín" se refiere a un ligando de origen natural de una MMP-14, que incluye variantes de la misma de origen natural (por ejemplo, variantes de empalme, mutantes de origen natural, e isoformas).

La significancia estadística se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica. Los ejemplos de pruebas estadísticas incluyen: la prueba T de Students, prueba no paramétrica U de Mann Whitney y prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon. Algunas relaciones estadísticamente significativas tienen un valor p de menos de 0,05 o 0,02. Proteínas de enlazamiento particular pueden mostrar una diferencia, por ejemplo, en la especificidad o el enlazamiento, que son estadísticamente significativas (por ejemplo, el valor $p < 0,05$ o $0,02$). Los términos "induce", "inhibe", "potencia", "eleva", "aumenta", "disminuye" o similares, por ejemplo, que denotan diferencias cualitativas o cuantitativas distinguibles entre dos estados, y pueden referirse a una diferencia, por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa, entre los dos estados.

Proteínas de enlazamiento a la MMP-14

La descripción proporciona proteínas que se enlazan a la MMP-14 (por ejemplo, MMP-14 humana) e incluyen al menos una región variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, la proteína de enlazamiento a la MMP-14 incluye una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (HC) y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera (LC). Se describen aquí una cantidad de ejemplos de proteínas de enlazamiento a la MMP-14.

La proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede ser una proteína aislada (por ejemplo, al menos 70, 80, 90, 95, o 99% libre de otras proteínas).

La proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede inhibir adicionalmente la MMP-14, por ejemplo, MMP-14 humana. En una realización, la proteína enlaza al dominio catalítico de MMP-14 humana, por ejemplo, la proteína contacta los residuos en o cerca del sitio activo de MMP-14.

5 En ciertas realizaciones, la proteína de enlazamiento a la MMP-14 también se enlaza a la MMP-16 y/o MMP-24. Adicionalmente, la proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede inhibir también la MMP-16 y/o MMP-24.

Los ejemplos de proteínas de enlazamiento a la MMP-14 incluyen M0031-C02, M0031-F01, M0033-H07, M0037-C09, M0037-D01, M0038-E06, M0038-F01, M0038-F08, M0039-H08, M0040-A06, M0040-A11, y M0043-G02.

10 Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 pueden ser anticuerpos. Los anticuerpos de enlazamiento a la MMP-14 pueden tener sus secuencias de dominio variable de HC y LC incluidas en un solo polipéptido (por ejemplo, scFv), o en diferentes polipéptidos (por ejemplo, IgG o Fab).

Metaloproteinasas de matriz

MMP-14

15 MMP-14 es codificada por un gen denominado como *MMP14*, precursor de la metaloproteinasa-14 de matriz. Los sinónimos para MMP-14 incluyen metaloproteinasa 14 de matriz (insertada en la membrana), metaloproteinasa de matriz tipo 1 de la membrana, metaloproteinasa 1 de matriz tipo membrana, MMP-14, MMP-X1, MT1MMP, MT1-MMP, MTMMP1, MT-MMP 1.

20 Las MT-MMP tienen estructuras similares, incluyendo un péptido señal, un prodominio, un dominio catalítico, una región de bisagra, y un dominio de hemopexina (Wang, et al., 2004, J Biol Chem, 279: 51148 - 55). De acuerdo con el SwissProt entrada P50281, la secuencia señal del precursor de MMP-14 incluye los residuos de aminoácidos 1 - 20. El pro-péptido incluye los residuos 21 - 111. La Cys93 es anotada como un posible interruptor de cisteína. Los residuos 112 a 582 constituyen la proteína activa madura. El dominio catalítico incluye los residuos 112 - 317. Los dominios de hemopexina incluyen los residuos 318 - 523. El segmento transmembrana comprende los residuos 542 a 562.

25 MMP-14 puede ser arrojado por las células o encontrarse en la superficie de las células, sujeta por una única secuencia de aminoácidos transmembrana. Véase, por ejemplo, Osnkowski et al. (2004, J Cell Physiol, 200: 2 - 10).

Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de MMP14 humana se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1: Secuencia de aminoácidos de MMP14 humana

**MSPAPRPPRCLLLPLLLTLGTALASLGSAQSSSFSPPEAWLQQYGYLPPGDLRTHTRQSRP
 QLSLAAIAAMQKQFYGLQVTKADADTMKAMRRPRCGVPDKFGAEIKANVRRKRYAIOG
 LKWQHNEITFCIQNYTPKVGEYATYEAIRKAFRVWESATPLRFREVPYAYIREGHEKQ
 ADIMIFFAEGFPHGDSPTFDGEGGFLAHAYFPGPNIGDTHFDSAEPWTVRNEIDLNGND
 IFLVAVHELGHALGLEHSSDPSAIMAPFYQWMDTENFVLPDDDRRGIQQLYGGESGFP
 TKMPPQPRTTSRPSVPDKPKNPTYGPNICDGNFDTVAMLRGEMFVFKERWFWRVRNNQ
 VMDGYPMPIGQFWRGLPASINTAYERKDGKVFVFKGDKHWVFDEASLEPGYPKHIKEL
 GRGLPTDKIDAALFWMPNGKTYFFRGNKYRFNEELRAVDSEYPKNIKWEGIPESPR
 GSFMGSDDEVFTYFYKGNKYWKFNQKLVKEPGYPKSALRDWMGCPSSGGRPDEGTEEET
 EVIIIEVDEEGGAVSAAAVLPLVLLLLLVAVGLAVVFFRRHGTPRRLLYCQRSLLD
 KV (SEQ ID NO:2; GenBank Acceso No. CAA88372.1)**

30 Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de MMP14 de ratón se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencia de aminoácidos de MMP14 de ratón

MSPAPRPSRSLLLPLLTALASLGWAQGSNFSPEAWLQYGYLPPGDLRTHRTQSPQSLCAA
IAAMQKQFYGLQVTKADLATMMAMRRPRCGVPDKFGTEIKANVRRKRYAIQGLKWQHNEITFCI
QNYTPKVGEYATFEAIRKAFRVWESATPLRFREVPYAYIREGHEKQADIMILFAEGFHGDSTPF
DGEGLFLAHAYFFPGPNIGGDTHFDSAEPWTVQNEIDLNGNDIFLVAVHELGHALGLEHSNDPSAI
MSPFYQWMDTENFVLPDDDRRGIQQLYGSKSGSPTKMPPQPRTTSRPSVPDKPKNPAYGPNICD

GNFDTVAMLRGEMFVFKERWFWVRNNOVMDGYMPPIGQFWRGLPASINTAYERKDGKVFVFKG
DKHWVFDEASLEPGYPKHIKELGRGLPTDKIDAALFWMPNGKTYFFRGNKYYRFNEEFRAVDSE
YPKNIKVWEGIPESPRGSFMGSDEVFTYFYKGNKYWKFNNQKLKVEPGYPKSALRDWMGCPSGR
RPDEGTEETEVIIEVDEEGSGAVSAAAVVLPVLLLLLVAVGLAVFFFRRHGTPKRLLYCQR

5 SLLDKV

SEQ ID NO: 4; GenBank Acceso No. NP_032634.2.

10 Un ejemplo de una proteína MMP-14 puede incluir la secuencia de aminoácidos de MMP-14 humana o de ratón, una secuencia que es 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a una de estas secuencias, o un fragmento de las mismas, por ejemplo, un fragmento sin la secuencia señal o el prodominio.

La Tabla 3 muestra una alineación de secuencia del ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la MMP-14 humana (hMMP-14) con la secuencia de aminoácidos de la MMP-14 de ratón (mMMP-14). Un "-" en las entradas de mMMP14 indica que el aminoácido es el mismo mostrado para hMMP14.

Tabla 3: Comparación de MMP 14 humana y de murino

hMMP14:	1:	50	MSPAPRPPRC	LLLPLLTGLT	ALASLGSAQS	SSFSPEAWLQ	QYGYLPPGDL
mMMP14:	1:	50	-----S-S	-----	-----W-G	-N-----	-----
hMMP14:	51:	100	RTHTQRSPOS	LSAAIAAMQK	FYGLQVTGKA	DADTMKAMRR	PRCGVPDKFG
mMMP14:	51:	100	-----	-----	-----	-LA-M---	-----
hMMP14:	101:	150	AEIKANVRRK	RYAIQGLKWQ	HNEITFCIQN	YTPKVGEYAT	YEAIRKAFRV
mMMP14:	101:	150	T-----	-----	-----	-----	F-----
hMMP14:	151:	200	WESATPLRFR	EVPIYAYIREG	HEKQADIMIF	FAEGFHGDST	PFDGEGGFLA
mMMP14:	151:	200	-----	-----	-----L	-----	-----
hMMP14:	201:	250	HAYFPGPNIG	GDTHFDSAEP	WTVRNEDLNG	NDIFLVAVHE	LGHALGLEHS
mMMP14:	201:	250	-----	-----	---Q-----	-----	-----
hMMP14:	251:	300	SDPSAIMAPF	YQWMDTENFV	LPDDDRRGIQ	QLYGGESGFP	TKMPPQPRTT
mMMP14:	251:	300	N-----S--	-----	-----	---SK--S-	-----
hMMP14:	301:	350	SRPSVPDKPK	NPTYGPNICD	GNFDTVAMLR	GEMFVFKERW	FWRVRNNQVM
mMMP14:	301:	350	-----	--A-----	-----	-----	-----
hMMP14:	351:	400	DGYPMPIGQF	WRGLEPASINT	AYERKDGKQFV	FFKGDKHWVF	DEASLEPGYP
mMMP14:	351:	400	-----	-----	-----	-----	-----
hMMP14:	401:	450	KHIKELGRGL	PTDKIDAALF	WMPNGKTYFF	RGNKYYRFNE	ELRAVDSEYP
mMMP14:	401:	450	-----	-----	-----	-----	-F-----
hMMP14:	451:	500	KNIKVWEGIP	ESPRGSFMGS	DEVFTYFYKG	NKYWKFNNOK	LKVEPGYPKS
mMMP14:	451:	500	-----	-----	-----	-----	-----
hMMP14:	501:	550	ALRDWMGCPS	GGRPDEGTEE	ETEVIIEVD	EEGGGAVSAA	AVVLPVLLLLL
mMMP14:	501:	550	-----	-R-----	-----	---S-----	-----
hMMP14:	551:	582	LVLAVGLAVF	FFRRHGTPRR	LLYCQRSLLD	(SEQ ID NO:2)	
mMMP14:	551:	582	-----	-----K-	-----		

(SEQ ID NO: 3)

5 Estos ejemplos de secuencias de hMMP-14 y mMMP-14 son idénticas a 558 de las 580 posiciones, aproximadamente 96,2% de identidad. A pesar del grado relativamente alto de similitud, su actividad hacia diferentes sustratos, incluyendo proMMP-2 y colágeno tipo I, varía (Wang, et al, 2004, J Biol Chem, 279: 51148 - 55).

10 Se generaron ratones deficientes en MMP-14 por mutagénesis dirigida (Holmbeck, et al, 1999, Cell, 99: 81 - 92). La deficiencia de MMP-14 provoca dismorfia craneofacial, artritis, osteopenia, enanismo, y fibrosis de tejidos blandos, pero los ratones son viables. La expresión de MMP-14 en tumores es revisada en Sato et al. (Sato, et al, 2005, Cancer Sci, 96: 212 - 7), Zucker et al. (Zucker y Vacirca, 2004, Cancer Metastasis Rev., 23: 101 - 17), y Bauvois (Bauvois, 2004, Oncogene, 23: 317 - 29). Previamente se había reportado una mayor expresión de las MT-MMP para correlacionar con un mayor grado de malignidad en gliomas, una relación compartida con alteraciones en la señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Un mecanismo de invasividad mediada por EGFR en gliomas puede implicar la inducción de MT1-MMP (Van metter et al., 2004, Neuro-Oncol, 6 (3): 188 - 99).

20 MMP-14 es regulada por quimiocinas proteína-1/ccl2 quimioatrayente de monocitos e interleucina-8/CXCL8 en células endoteliales durante la angiogénesis (Gálvez et al., 2005, J Biol Chem, 280 (2): 1292 - 8). La actividad de MMP-14 es regulada también por la expresión de TIMP-2 modulada por ERK 1/2 y p38 MAPK que controla la colagenólisis pericelular inducida por TGF-beta (Munshi et al., 2004, J Biol Chem, 279 (37): 39042 - 50). El bloqueo de la ruta ERK suprime la expresión de MMP-3, MMP-9, y MMP-14, y CD44 e inhibe marcadamente la invasividad de las células tumorales (Tanimura et al., 2003, Biochem Biophys Res Commum, 304 (4): 801 - 6).

25 Durante la angiogénesis, MMP-14 contribuye a la sobrerregulación específica de VEGF-A a través de la activación de las rutas de tirosina quinasa Src involucrando quizás la escisión de CD44 (Sounni et al., 2004, J Biol Chem, 279 (14): 13564 - 74).

MMP-14 tiene una serie de inhibidores endógenos. TIMP-2 se enlaza con MMP-14 y ancla MMP-14 a la superficie de la célula y actúa como un "receptor" para proMMP-2 (progelatinasa A), de tal manera que este último puede ser activado eficientemente en una forma localizada (Murphy, et al., 2003, Biochem Soc Symp, 65 - 80). TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 inhiben a MMP-14, pero TIMP-1 no lo hace (Lee, et al., 2003, J Biol Chem, 278: 40224 - 30). Los TIMP típicamente son inhibidores de enlazamiento estricto, lentos.

MMP-14 activa la pro-MMP-2 provocando una cascada de proteólisis que facilita la movilidad y la invasividad de las células tumorales (Berno, et al., 2005, Endocr Relat Cáncer, 12: 393 - 406; Anilkumar, et al., 2005, FASEB J, 19: 1326 - 8; Itoh y Seiki, 2005, J Cell Physiol; López de Cicco, et al., 2005, Cancer Res., 65: 4162 - 71; E1 Bedoui, et al., 2005, Cardiovasc Res, 67: 317 - 25; Cao, et al., 2005, Thromb Haemost, 93: 770 - 8; Sato, et al., 2005, Cancer Sci, 96: 212 - 7; Dong, et al., 2005, Am J Pathol 166: 1173 - 86; Philip, et al., 2004, Glycoconj J, 21: 429 - 41; Guo, et al., 2005, Am J Pathol 166: 877 - 90; Grossman, 2005, Urol Oncol, 23: 222; Gilles, et al., 2001, J Cell Sci, 114: 2967 - 76). Los estudios proponen que este proceso de activación requieren que tanto MT1-MMP como la MT1-MMP enlazada a TIMP-2 sean activas (Strongin et al., 1995, J Biol Chem, 270, 5331 a 5338; Butler et al., 1998, J Biol Chem, 273 : 871 - 80; Kinoshita et al., 1998, J Biol Chem, 273, 16098 - 103). La TIMP-2 en el último complejo enlaza, a través de su dominio del terminal C, con el dominio de hemopexina de pro-MMP-2, que puede localizar el zimógeno cerca de la MT1-MMP activa (Butler et al., 1998, J Biol Chem, 273: 871 - 80; Kinoshita et al., 1998).

Además de proMMP-2, MMP-14 escinde otros sustratos, tales como la estructura de triple hélice del colágeno (Minond, et al., 2004, Biochemistry 43: 11474 - 81), la fibrina (Kluft, 2003, Pathophysiol Haemost Thromb, 33 : 425 - 9), Matrigel (Cao, et al., 2005, Thromb Haemost, 93: 770 - 8), otros componentes de la matriz extracelular (Sato, et al., 2005, Cancer Sci, 96: 212 - 7), CD44 (Suenaga, et al., 2005, Oncogene, 24: 859 - 68), y varias otras proteínas (Hwang, et al., 2004, Biochim Biophys Acta, 1702: 79 - 87). MMP-14 puede promover la activación de la procólagenasa 2 y 3, una potente proteasa colagenolítica (Knauper et al., 1996, J Biol Chem, 271: 17124 - 31; Woessner et Nagase, 2000).

MMP-14 ha sido implicada en muchos estados de enfermedad, incluyendo, por ejemplo: crecimiento tumoral (Trisciuglio, et al., 2005, J Cell Physiol), embolia tumoral (Cao, et al., 1996, J Biol Chem, 271: 30174 - 80), angiogénesis (Haas, 2005, Can J Physiol Pharmacol, 83: 1 - 7; Handsley y Edwards, 2005, Int J Cancer, 115: 849 - 60; Roebuck, et al., 2005, Am J Clin Pathol, 123: 405 - 14; Pilorget, et al., 2005, J Cereb Blood Flow Metab), y proliferación celular (Aoki, et al., 2005, J Biochem (Tokio), 137: 95 - 9). En consecuencia, las proteínas que se enlazan y/o que inhiben MMP-14 se pueden usar para tratar y/o diagnosticar estas condiciones.

Como MMP-14 está implicada en la progresión del cáncer de laringe, MMP-14 puede servir como un marcador fiable en la estimación de la potencia invasiva y metastásica del cáncer de laringe. La supresión de la expresión de MMP-14 puede inhibir la invasión y metástasis de cáncer de laringe (Sun, Li, 2004, Chin Med J Sci, 19 (3): 170 - 3). Por lo tanto, las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 se pueden usar para tratar o prevenir cánceres metastásicos, por ejemplo, cáncer de laringe metastásico.

MMP-14 está implicada en varias enfermedades no oncológicas incluyendo: artritis reumatoide (Itoh y Seiki, 2005, J Cell Physiol; Distler, et al., 2005, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 102: 2892 - 7); osteoartritis (Tchetina, et al., 2005, J Rheumatol, 32: 876 - 86), diabetes (entre otras, (Savinov, et al., 2005, J Biol Chem, 280: 27755 - 8; Giebel, et al., 2005, Lab Invest., 85: 597 - 607; Raymond, et al., 2004, J Vase Surg, 40: 1190 - 8); y aterosclerosis (Stawowy, et al., 2005, Circulation, 111: 2820 - 7; May, et al., 2005, Thromb Haemost, 93: 710 - 5; Rajavashisth, et al., 1999, Circulation, 99: 3103 - 9). El papel de las MMP en el desarrollo, los procesos normales, y el cáncer se revisa en Folgueras et al., Int. J. Dev. Biol. 48: 411 - 424 (2004). En consecuencia, las proteínas que enlazan y/o que inhiben MMP-14 son útiles para tratar y/o diagnosticar estas condiciones.

MMP-16

La metaloproteínasa-16 de matriz (también conocida como MMP-16, metaloproteínasa de matriz tipo 3 de la membrana, o MT3-MMP) se expresa en una variedad de tejidos normales (Takino et al., 1995, J Biol Chem, 270: 23013 - 20; Yoshiyama et al., 1998, Acta Neuropathol, 96: 347 - 50; Shofuda et al., 2001, 947: 337 - 40; Nutall et al., 2003, Mol Cancer Res, 1: 333 - 45) y tejidos tumorales (Nutall et al., 2003, Mol Cancer Res, 1: 333 - 45; Kitagawa et al., 1999, J Urol, 162: 905 - 9; Ohnishi et al., 2001, Eur J Dermatol, 11: 420 - 3). MMP-16 está implicada en la remodelación tanto de la glándula mamaria normal como enferma, ya sea directamente o indirectamente mediante la activación de otras MMP. El cáncer de mama no invasivo (MCF-7) expresa notablemente menos MMP que el cáncer de mama invasivo (MDA-MB-231) (Kousidou et al. 2005, Int J Oncol, 26 (4): 1101 - 9; Szabova et al. 2005, J Cell Physiol, 205 (1): 123 - 32). MMP-16 juega un papel en el recambio de la matriz extracelular no sólo mediante la activación de proMMP-2 sino también actuando directamente sobre las macromoléculas de ECM.

MMP-16 está implicada en la formación del tubo capilar (Lafleur et al., 2002, J Cell Sci, 115 (Pt 17): 3427 - 38; et al. 2004, J Clin Endocrinol Metab, 89 (11): 5828 - 36; et al. 2002, J Cell Sci; Plaisier et al., 2004, J Clin Endocrinol Metab, 89 (11): 5828 - 36) y remodelación de la matriz de los vasos sanguíneos (Shofuda et al. 1997, J Biol Chem,

272 (15): 9749 - 54). MMP-16 es un factor proinvasivo alternativo que impulsa la actividad invasiva de fibrina (Kang et al., 2000, Faseb J, 14 (15): 2559 - 68; 2002, et al. J Exp Med, 195 (3): 295 -308).

5 MMP-16 muestra una mayor expresión en la osteoartritis (a p <0,01) (Kevorkian et al. 2004, Arthritis Rheum, 50 (1): 131 - 41). MMP-16 se expresa intensamente en la sinovia de pacientes con artritis reumatoide (Pap et al. 2000, Arthritis Rheum., 43 (6): 1226 - 32). La expresión de MMP-16 también se incrementa en la placa aterosclerótica humana (Uzui et al. 2002, Circulation, 106 (24): 3024 - 30).

10 MMP-16 se expresa en los cánceres de ovario (Stadlmann et al. 2003, Eur J Cancer, 39 (17): 2499 - 505). La expresión de MMP-2, MMP-16, y VEGF se incrementa en el carcinoma testicular (Konaka et al. 1999, J Urol, 161 (1): 342 - 8), y MMP-16 muestra una mayor expresión en el cáncer testicular asociado con el mayor potencial metastásico (Koshida et al. 2000, Hinyokika Kyo, 46 (10): 775 - 81). La expresión de MMP-16 es mayor en los carcinomas, especialmente carcinoma de células claras, que en el parénquima normal.

15 MMP-16 se expresa en células de melanoma primario y metastásico. La inmunofluorescencia doble demuestra una colocalización consistente de MMP-16 / MMP-2 en células de melanoma metastásico. La colocalización de MMP-16 y MMP-2 en células de melanoma nodular y metastásico indica que las MT-MMP y MMP-2 pueden cooperar en el proceso invasivo y metastásico de células de melanoma (Ohnishi et al. 2001, Eur J Dermatol, 11 (5): 420 - 3; Iida et al. 2001, J Biol Chem, 276 (22): 18786 - 94). Al igual que MMP-14, MMP-16 está implicada en la progresión del cáncer de laringe. Por lo tanto, las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 que también se enlazan y/o inhiben MMP-16 se pueden usar para tratar o prevenir cánceres metastásicos, por ejemplo, cáncer de laringe metastásico.

20 La expresión del ARNm de MMP-16 basal tiene un patrón similar a aquel de la MMP-14, pero no es sobrerregulado por colágeno (Gilles et al. 1997, Lab Invest, 76 (5): 651 - 60). MMP-14 está implicada en la activación de MMP-2 estimulada por colágeno. Este mecanismo puede ser empleado in vivo tanto por fibroblastos asociados a tumores como por células de carcinoma derivadas de EMT para facilitar una mayor invasión y/o metástasis. En los carcinomas de mama invasivos humanos, existe una correlación entre la expresión de MMP-14 y MMP-16, inmunolocalización de MMP-14 y activación de proMMP-2 (Ueno et al. 1997, Cancer Res, 57 (10): 2055 - 60). Las expresiones del ARNm de MMP-16 y TIMP-2 se incrementaron significativamente en los riñones de ratas diabéticas (Wan et al. 2004, Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. 24 (12): 1391 - 4).

MMP-24

30 La metaloproteinasa-24 de matriz (también conocida como MMP-24, metaloproteinasa de matriz tipo 5 de membrana, o MT5-MMP) ha sido identificada y clonada a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro humano (Llano et al., 1999, Cancer Res, 59 (11): 2570 - 6). Aunque comparte una estructura de dominio similar con otra de las MT-MMP, la cola citoplasmática de la MMP-24 es la más divergente, teniendo solamente 50% de identidad con aquellas de MMP-14 y MMP-16 (Pei D, 1999, J Biol Chem, 274, 8925 - 32). MMP-24 se expresa predominantemente en el cerebro y en niveles bajos en el riñón, páncreas y pulmón. Se ha demostrado que MMP-24 desempeñan un papel en el crecimiento axonal (Hayashita-Kinoh et al., 2001, Cell Growth Differ, 12, 573 - 58). Los mapas del gen para MMP-24 humana para 20q11.2, una región frecuentemente amplificada en tumores de diversas fuentes, sugieren que la MMP-24 puede jugar un papel en la progresión del cáncer. El dominio catalítico de MMP-24 exhibe una potente actividad proteolítica contra proMMP-2, dando lugar a la generación de la forma activa Mr 62.000 de esta enzima. MMP-24 puede contribuir a la activación de proMMP-2 en los tejidos tumorales, en los que se sobreexpresa, facilitando de este modo la progresión del tumor (Pei D, 1999, J Biol Chem, 274, 8925 - 32).

40 Los transcritos de MMP-24 se detectan en niveles elevados en comparación con el tejido normal de cerebro en una serie de tumores cerebrales, incluyendo astrocitomas, glioblastomas y gliomas (Van metter et al., 2004, Neuro-oncol, 3: 188 - 99). MMP-24 se expresa predominantemente en el cerebro. (Brain Res. 2000, 31 de marzo; 860 (1 - 2): 174; Biol Chem. 1999, 26 de marzo; 274 (13): 8925 - 32; Lett. 1999, 3 de diciembre; 462 (3): 261 - 6).

45 Los niveles de ARNm de MMP-24 son más altos en una serie de tumores cerebrales, incluyendo astrocitomas y glioblastomas, en comparación con los niveles en el tejido cerebral normal (Llano et al., 1999, Cancer Res, 59 (11): 2570 - 6).

50 Los ratones deficientes en MMP-24 nacen sin anomalías morfológicas evidentes. No se observan defectos histológicos evidentes en el sistema nervioso. Sin embargo, ratones deficientes en MMP-24 no desarrollan dolor neuropático con alodinia mecánica después de una lesión del nervio ciático, aunque las respuestas a estímulos nocivos agudos son normales (Uekita et al., FEBS Lett. 2004, 16 de enero, 557 (1 - 3): 125 - 8).

La expresión de MMP-24 se incrementa en córneas infectadas. Existe una buena correlación entre la sobreexpresión de MMP-24 en las córneas infectadas y la respuesta inflamatoria. Las células inflamatorias, tales como macrófagos y las PMN pueden desempeñar un papel en la sobrerregulación de las MT-MMP durante la

infección corneal, que a su vez puede causar la destrucción de tejido de la córnea (Dong et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001 Dic; 42 (13): 3223 - 7).

La expresión de MMP-24 se incrementa en la diabetes. MMP-24 juega un papel en la patogénesis de la enfermedad renal terminal y atrofia tubular renal (Romanic et al., 2001, Am J Physiol Renal Physiol, Aug; 281 (2): F309 - 17).

- 5 MMP-24 se colocaliza con las placas seniles en un cerebro con Alzheimer, indicando posibles funciones en la regulación de procesos fisiopatológicos asociados con edad avanzada (Sekine-Aizawa, 2001, Eur J Neurosci, 13 (5): 935 - 48).

Bibliotecas de expresión

- 10 Una biblioteca de expresión es una colección de entidades; cada entidad incluye un componente polipeptídico accesible y un componente recuperable que codifica o identifica al componente polipeptídico. El componente polipeptídico es variado de manera que se representan diferentes secuencias de aminoácidos. El componente polipeptídico puede ser de cualquier longitud, por ejemplo, de tres aminoácidos a más de 300 aminoácidos. Una entidad de una biblioteca de expresión puede incluir más de un componente polipeptídico, por ejemplo, las dos cadenas polipeptídicas de una sFab. En un ejemplo de implementación, se puede utilizar una biblioteca de expresión para identificar las proteínas que se enlazan a la MMP-14. En una selección, el componente polipeptídico de cada miembro de la biblioteca se prueba con MMP-14 (por ejemplo, el dominio catalítico de MMP-14 u otro fragmento) y si el componente polipeptídico se enlaza a la MMP-14, se identifica el miembro de la biblioteca de expresión, típicamente mediante retención sobre un soporte.

- 20 Los miembros de la biblioteca de expresión retenidos se recuperan del soporte y se analizan. El análisis puede incluir la amplificación y una posterior selección en condiciones similares o diferentes. Por ejemplo, se pueden alternar selecciones positivas y negativas. El análisis también puede incluir la determinación de la secuencia de aminoácidos del componente polipeptídico y la purificación del componente polipeptídico para caracterización detallada.

Se pueden utilizar una variedad de formatos para bibliotecas de expresión. Los ejemplos incluyen los siguientes.

- 25 Expresión en fago: El componente proteico está normalmente enlazado covalentemente a una proteína de la cubierta del bacteriófago. El enlace resulta de la traducción de un ácido nucleico que codifica el componente proteico fusionado a la proteína de la cubierta. El enlace puede incluir un enlazador peptídico flexible, un sitio de proteasa, o un aminoácido incorporado como resultado de la supresión de un codón de detención. La expresión en fago se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 5.223.409; Smith (1985) Science 228: 1315 - 1317; las publicaciones internacionales Nos. WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; de Haard et al. (1999) J. Biol. Chem 274: 18218 - 30; Hoogenboom et al. (1998) Immunotechnology 4: 1 - 20; Hoogenboom et al. (2000) Immunol Today 2: 371 - 8 y Hoet et al. (2005) Nat Biotechnol. 23 (3): 344 - 8. El bacteriófago que visualiza el componente proteico puede ser cultivado y recolectado utilizando métodos estándar de preparación de fagos, por ejemplo, precipitación con PEG del medio de cultivo.
- 35 Después de la selección de fagos de expresión individuales, el ácido nucleico que codifica los componentes proteicos seleccionados puede ser aislado de células infectadas con los fagos seleccionados o a partir de los mismos fagos, después de la amplificación. Se pueden recoger colonias o placas individuales, aislar el ácido nucleico y secuenciarlo.

- 40 Otros formatos de expresión. Otros formatos de expresión incluyen expresión con base en células (véase, por ejemplo, la publicación internacional WO 03/029456), fusiones de proteína-ácido nucleico (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6.207.446), expresión en ribosomas (véase, por ejemplo, Mattheakis et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91: 9022 y Hanes et al. (2000) Nat Biotechnol. 18: 1287 - 1292; Hanes et al. (2000) Methods Enzymol. 328: 404 - 30; y Schaffitzel et al. (1999) J Immunol Methods. 231 (1-2): 119 - 35), y expresión periplásmica en *E. coli* (J Immunol Methods. 2005, 22 de Nov.; PMID: 16337958).

- 45 Supercóntigos. Los supercóntigos útiles para la expresión incluyen: anticuerpos (por ejemplo, fragmentos Fab, moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de dominio único, anticuerpos de camélidos, y anticuerpos camellizados); receptores de células T; proteínas MHC; dominios extracelulares (por ejemplo, repeticiones de fibronectina de tipo III, repeticiones de EGF); inhibidores de proteasa (por ejemplo, dominios de Kunitz, ecotin, BPTI, y así sucesivamente); repeticiones de TPR; estructuras en forma de trébol; dominios de dedo de zinc; proteínas de enlazamiento a ADN; proteínas de enlazamiento a ADN particularmente monoméricas; proteínas de enlazamiento a ARN; enzimas, por ejemplo, proteasas (particularmente proteasas inactivadas), ARNasa; chaperonas, por ejemplo, proteínas de choque térmico y tioredoxina; dominios de señalización intracelular (tales como los dominios SH2 y SH3); péptidos lineales y constreñidos; y sustratos de péptidos lineales. Las bibliotecas de expresión pueden incluir diversidad sintética y/o natural. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2004 - 0005709.
- 55

- La tecnología de expresión también se puede utilizar para obtener proteínas de enlazamiento (por ejemplo, anticuerpos) que enlazan epítomos particulares de un objetivo. Esto puede hacerse, por ejemplo, mediante el uso de moléculas competidoras no objetivo que carecen del epítomo particular o están mutados dentro del epítomo, por ejemplo, con alanina. Tales moléculas no objetivo se pueden utilizar en un procedimiento de selección negativa como se describe a continuación, como moléculas competidoras cuando se enlazan una biblioteca de expresión con el objetivo, o como un agente elución previa, por ejemplo, para capturar en una solución de lavado miembros de una biblioteca de expresión que se disocian que no son específicos para el objetivo.
- Selección iterativa. En una realización preferida, la tecnología de biblioteca de expresión se utiliza en un modo iterativo. Una primera biblioteca de expresión se utiliza para identificar una o más proteínas de enlazamiento para un objetivo. Estas proteínas de enlazamiento identificadas se variaron luego usando un método de mutagénesis para formar una segunda biblioteca de expresión. Se seleccionan luego proteínas de enlazamiento de mayor afinidad a partir de la segunda biblioteca, por ejemplo, mediante el uso de condiciones de lavado y de enlazamiento más competitivas o de mayor rigurosidad.
- En algunas implementaciones, la mutagénesis es dirigida a las regiones en la interfase de enlazamiento. Si, por ejemplo, las proteínas de enlazamiento identificados son anticuerpos, entonces se puede dirigir la mutagénesis a las regiones CDR de las cadenas pesada o ligera, como se describe en este documento. Además, se puede dirigir la mutagénesis a regiones marco cercanas o adyacente a las CDR. En el caso de anticuerpos, también se puede limitar la mutagénesis a una o a unas pocas de las CDR, por ejemplo, para hacer mejoras precisas en forma escalonada. Los ejemplos de técnicas de mutagénesis incluyen: PCR propensa a error, recombinación, transposición de ADN, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis de casete.
- En un ejemplo de la selección iterativa, los métodos descritos aquí se utilizan para identificar primero una proteína a partir de una biblioteca de expresión que se enlaza a la MMP-14 con al menos una especificidad de enlazamiento mínima para un objetivo o una actividad mínima, por ejemplo, una constante de equilibrio de disociación para el enlazamiento de menos de 1 nM, 10 nM, o 100 nM. La secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas iniciales identificadas se utiliza como un ácido nucleico molde para la introducción de variaciones, por ejemplo, para identificar a una segunda proteína que tiene propiedades mejoradas (por ejemplo, afinidad de enlazamiento, cinética, o estabilidad) con relación a la proteína inicial.
- Selección de la constante de disociación. Dado que una tasa de disociación lenta puede ser predictiva de una alta afinidad, en particular con respecto a las interacciones entre polipéptidos y sus objetivos, los métodos descritos aquí pueden ser utilizados para aislar proteínas de enlazamiento con una velocidad de disociación cinética deseada (por ejemplo, reducida) para una interacción de enlazamiento con un objetivo.
- Para seleccionar proteínas de enlazamiento de disociación lenta a partir de una biblioteca de expresión, se pone la biblioteca en contacto con un objetivo inmovilizado. El objetivo inmovilizado se lava luego con una primera solución que remueve las biomoléculas enlazadas débilmente o en forma no específica. A continuación se eluyen las proteínas de enlazamiento enlazadas con una segunda solución que incluye una cantidad saturante de objetivo libre o un anticuerpo monoclonal que compite con alta afinidad por un objetivo específico, es decir, replicasiones del objetivo que no se unen a la partícula. El objetivo libre se enlaza a las biomoléculas que se disocian del objetivo. Se evita un nuevo enlazamiento en forma efectiva mediante la cantidad saturante de objetivo libre con respecto a la concentración mucho más baja del objetivo inmovilizado.
- La segunda solución puede tener condiciones de solución que son sustancialmente fisiológicas o que son rigurosas. Típicamente, las condiciones de solución de la segunda solución son idénticas a las condiciones de solución de la primera solución. Las fracciones de la segunda solución se recogen en orden temporal para distinguir las primeras fracciones de las fracciones finales. Las fracciones finales incluyen biomoléculas que se disocian a un ritmo más lento del objetivo que las biomoléculas en las primeras fracciones.
- Además, también es posible recuperar miembros de la biblioteca de expresión que permanecen enlazados al objetivo, incluso después de una incubación prolongada. Estos o bien pueden disociarse utilizando condiciones caotrópicas o pueden amplificarse mientras están unidos al objetivo. Por ejemplo, se puede poner en contacto el fago enlazado al objetivo con las células bacterianas.
- Selección o cribado para especificidad. Los métodos de cribado de bibliotecas de expresión descritos en este documento pueden incluir un proceso de selección o cribado que descarta miembros de la biblioteca de expresión que se enlazan a una molécula no objetivo. Los ejemplos de moléculas no objetivo incluyen estreptavidina en perlas magnéticas, agentes de bloqueo tales como albúmina de suero bovino, leche bovina no grasa, cualquier anticuerpo monoclonal de inmovilización del objetivo o de captura, o las células no transfectadas que no expresan al objetivo MMP-14 humana.

En una implementación, se utiliza una etapa denominada de "selección negativa" para discriminar entre el objetivo y la molécula no objetivo relacionada y moléculas no objetivo relacionadas pero distintas. Se pone en contacto la biblioteca de expresión o una combinación de la misma con la molécula no objetivo. Los miembros de la muestra que no se enlazan al no objetivo se recogen y se utilizan en selecciones posteriores para enlazamiento con la molécula objetivo o incluso para posteriores selecciones negativas. La etapa de selección negativa puede ser antes o después de seleccionar los miembros de la biblioteca que se enlazan a la molécula objetivo.

En otra implementación, se utiliza una etapa de cribado. Después de aislar los miembros de la biblioteca de expresión por enlazamiento con la molécula objetivo, cada miembro aislado de la biblioteca se ensaya por su capacidad para enlazarse con una molécula no objetivo (por ejemplo, un no objetivo enlistado más arriba). Por ejemplo, se puede utilizar un cribado por ELISA de alto rendimiento para obtener estos datos. También se puede utilizar el cribado por ELISA para obtener datos cuantitativos para la enlazamiento de cada miembro de la biblioteca con el objetivo, así como para la reactividad cruzada entre especies con objetivos relacionados o subunidades del objetivo (por ejemplo, MMP-14 de ratón) y también bajo diferentes condiciones tales como pH 6 o pH 7,5. Se comparan los datos de enlazamiento con el objetivo y el no objetivo (por ejemplo, mediante el uso de un ordenador y un software) para identificar a los miembros de la biblioteca que se enlazan específicamente con el objetivo.

Otros ejemplos de bibliotecas de expresión

Se pueden usar otros tipos de colecciones de proteínas (por ejemplo, bibliotecas de expresión) para identificar proteínas con una propiedad particular (por ejemplo, la capacidad para enlazarse con MMP-14 y/o la capacidad para modular la MMP-14), incluyendo, por ejemplo, arreglos de proteínas de anticuerpos (véase, por ejemplo, De Wildt et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18: 989 - 994), bibliotecas de lambda gt11, bibliotecas de dos híbridos y así sucesivamente.

Ejemplos de bibliotecas

Es posible inmunizar un primate no humano y recuperar genes de anticuerpos del primate que se pueden expresar en fago (véase más adelante). A partir de tal biblioteca, se pueden seleccionar anticuerpos que se enlazan al antígeno utilizado en la inmunización. Véase, por ejemplo, Vaccine. (2003) 22 (2): 257 - 67 o Immunogenetics. (2005) 57 (10): 730 - 8. Por lo tanto se podrían obtener anticuerpos de primates que se enlacen e inhiban a MMP-14 mediante inmunización de un chimpancé o de un macaco y el uso de una variedad de medios para seleccionar o cribar anticuerpos de primates que se enlazan e inhiben a MMP-14. También se puede elaborar quimeras de los Fab primatizados con regiones constantes humanas, véase Curr Opin Mol Ther. (2004) 6 (6): 675 - 83. Los "anticuerpos PRIMATIZADOS", modificados por ingeniería genética a partir de componentes de mono macaco cynomolgus y humanos, son estructuralmente indistinguibles de anticuerpos humanos. Es menos probable, por lo tanto, que ellos causen reacciones adversas en seres humanos, haciéndolos potencialmente adecuados para tratamiento crónico a largo plazo" Curr Opin Investig Drugs. (2001) 2 (5): 635 - 8.

Un ejemplo de un tipo de biblioteca presenta una combinación diversa de polipéptidos, cada una de las cuales incluye un dominio de inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio variable de inmunoglobulina. De interés son las bibliotecas de expresión en donde los miembros de la biblioteca incluyen dominios de inmunoglobulina de primate o "primatizados" (por ejemplo, tales como primate humano, no humano o "humanizado".) (por ejemplo, dominios variables de inmunoglobulina) o Fab quiméricos primatizados con regiones constantes humanas. Se pueden utilizar bibliotecas de dominios de inmunoglobulina humana o humanizada para identificar anticuerpos humanos o "humanizados", por ejemplo, que reconocen antígenos humanos. Debido a que las regiones constantes y marco del anticuerpo son humanas, estos anticuerpos pueden por sí mismos evitar ser reconocidos y considerados como antígenos cuando se administran a seres humanos. Las regiones constantes también pueden ser optimizados para restablecer funciones efectoras del sistema inmunológico humano. El proceso de selección de expresión in vitro supera la incapacidad de un sistema inmunológico humano normal para generar anticuerpos contra antígenos propios.

Una biblioteca típica de expresión de anticuerpos muestra un polipéptido que incluye un dominio VH y un dominio VL. Un "dominio de inmunoglobulina" se refiere a un dominio del dominio variable o constante de moléculas de inmunoglobulina. Los dominios de inmunoglobulina contienen típicamente dos láminas β formadas por aproximadamente siete hebras β , y un enlace disulfuro conservado (véase, por ejemplo, A. F. Williams y A. N. Barclay, 1988, Ann. Rev. Immunol. 6: 381 - 405). La biblioteca de expresión puede expresar el anticuerpo como un fragmento Fab (por ejemplo, usando dos cadenas de polipéptido) o un Fv de cadena sencilla (por ejemplo, utilizando una única cadena de polipéptido). Otros formatos también pueden ser utilizados.

Como en el caso del Fab y otros formatos, el anticuerpo expresado puede incluir una o más regiones constantes como parte de una cadena ligera y/o pesada. En una realización, cada cadena incluye una región constante, por ejemplo, como en el caso de un Fab. En otras formas de realización, se muestran regiones constantes adicionales.

- Se pueden construir bibliotecas de anticuerpos por un sinnúmero de procesos (véase, por ejemplo, de Haard et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274: 18218 - 30; Hoogenboom et al., 1998, *Immunotechnology* 4: 1 - 20; Hoogenboom et al., 2000, *Immunol. Today* 21: 371 - 378, y Hoet et al. (2005) *Nat Biotechnol.* 23 (3) 344 - 8. Además, se pueden combinar elementos de cada proceso con los de otros procesos. Los procesos pueden ser utilizados de tal manera
- 5 que se introduce la variación en un único dominio de inmunoglobulina (por ejemplo, VH o VL) o en múltiples dominios de inmunoglobulina (por ejemplo, VH y VL). La variación puede ser introducida en un dominio variable de inmunoglobulina, por ejemplo, en la región de uno o más de CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3, y FR4, que se refieren a tales regiones de cualquiera y ambos dominios variables de cadena pesada y ligera. La(s) variación(es) se puede(n) introducir en las tres CDR de un dominio variable dado, o en CDR1 y CDR2, por ejemplo, de un dominio
- 10 variable de cadena pesada. Cualquier combinación es posible. En un proceso, se construyen bibliotecas de anticuerpos mediante la inserción de diversos oligonucleótidos que codifican las CDR en las regiones correspondientes del ácido nucleico. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar utilizando nucleótidos o trinucleótidos monoméricos. Por ejemplo, Knappik et al., 2000, *J. Mol. Biol.* 296: 57 - 86 describen un método para la construcción de CDR que codifican oligonucleótidos utilizando síntesis de trinucleótidos y una plantilla con sitios de restricción
- 15 modificados por ingeniería genética para aceptar los oligonucleótidos.
- En otro proceso, se inmuniza un animal, por ejemplo, un roedor, con MMP-14. El animal opcionalmente recibe un refuerzo con el antígeno para estimular aún más la respuesta. Luego se aíslan las células del bazo del animal, y se amplifica el ácido nucleico que codifica los dominios VH y/o VL y se clonan para la expresión en la biblioteca de expresión.
- 20 En aún otro proceso, se construyen bibliotecas de anticuerpos a partir de ácido nucleico amplificado de genes de inmunoglobulina de línea germinal no modificada. El ácido nucleico amplificado incluye al ácido nucleico que codifica el dominio VH y/o VL. Las fuentes de ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas se describen a continuación. La amplificación puede incluir PCR, por ejemplo, con cebadores que hibridan con la región constante conservada, u otro método de amplificación.
- 25 El ácido nucleico que codifica dominios de inmunoglobulina se puede obtener a partir de las células inmunitarias, por ejemplo, de un primate (por ejemplo, un ser humano), de ratón, conejo, camello, o roedor. En un ejemplo, se seleccionan las células por una propiedad particular. Se pueden seleccionar las células B en las distintas etapas de madurez. En otro ejemplo, las células B no han sido modificadas.
- 30 En una realización, se usa clasificación de las células activadas por fluorescencia (FACS) para clasificar las células B que expresan moléculas de IgM, IgD o IgG enlazadas a la superficie. Además, se pueden aislar las células B que expresan diferentes isotipos de IgG. En otra forma de realización preferida, se cultivan células B o T in vitro. Las células pueden ser estimuladas in vitro, por ejemplo, mediante el cultivo con células alimentadoras o mediante la adición de mitógenos u otros reactivos moduladores, tales como anticuerpos para CD40, ligando de CD40 o CD20, acetato de miristato de forbol, lipopolisacárido bacteriano, concanavalina A, fitohemaglutinina, o mitógeno de hierba
- 35 carmín.
- En otra realización, las células se aíslan de un sujeto que tiene una enfermedad o condición descrita en el presente documento, por ejemplo, un cáncer (por ejemplo, cáncer metastásico, por ejemplo, cáncer metastásico de mama), una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, sinovitis, aterosclerosis), artritis reumatoide, osteoartritis, una afección ocular (por ejemplo, degeneración macular), diabetes, enfermedad de Alzheimer, isquemia cerebral, endometriosis,
- 40 la actividad invasiva de fibrina, angiogénesis, o formación del tubo capilar. En otra realización, las células se aíslan de un animal no humano transgénico que incluye un locus de inmunoglobulina humana.
- En una realización preferida, las células han activado un programa de hipermutación somática. Las células pueden ser estimuladas para experimentar mutagénesis somática de genes de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante tratamiento con anti-inmunoglobulina, anti-CD40 y anticuerpos anti-CD38 (véase, por ejemplo, Bergthorsdottir et al.,
- 45 2001, *J. Immunol.* 166: 2228). En otra realización, las células son no modificadas.
- El ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina se puede aislar a partir de un repertorio natural mediante el siguiente método de ejemplo. En primer lugar, se aísla el ARN de la célula inmune. Se separan los ARNm de longitud total (es decir, protegido) (por ejemplo, mediante la degradación de los ARN no protegidos con fosfatasa de intestino de ternero). Luego se remueve la protección con pirofosfatasa ácida de tabaco y se usa
- 50 transcripción inversa para producir los ADNc.
- La transcripción inversa de la primera hebra (antisentido) se puede hacer de cualquier forma con cualquier cebador adecuado. Véase, por ejemplo, de Haard et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274: 18218 - 30. La región de enlazamiento del cebador puede ser constante entre diferentes inmunoglobulinas, por ejemplo, a fin de transcribir en forma inversa diferentes isotipos de inmunoglobulina. La región de enlazamiento del cebador también puede ser específica para un
- 55 isotipo particular de inmunoglobulina. Típicamente, el cebador es específico para una región que es 3' a una

secuencia que codifica al menos una CDR. En otra realización, se pueden usar cebadores poli-dT (y pueden ser preferidos para los genes de la cadena pesada).

5 Una secuencia sintética puede ligarse al extremo 3' de la hebra transcrita inversa. La secuencia sintética se puede utilizar como un sitio de enlazamiento del cebador para la enlazamiento del cebador directo durante la amplificación por PCR después de la transcripción inversa. El uso de la secuencia sintética puede obviar la necesidad de utilizar una combinación de diferentes cebadores directos para capturar completamente la diversidad disponible.

El gen que codifica para el dominio variable es luego amplificado, por ejemplo, usando una o más rondas. Si se utilizan múltiples rondas, se pueden utilizar cebadores anidados para aumentar la fidelidad. Se clona luego el ácido nucleico amplificado en un vector de una biblioteca de expresión.

10 Métodos de cribado secundario

Después de seleccionar miembros de la biblioteca candidata que se enlazan a un objetivo, cada miembro de la biblioteca candidata puede ser analizado adicionalmente, por ejemplo, para caracterizar aún más sus propiedades de enlazamiento por el objetivo, por ejemplo, MMP-14, o por el enlazamiento con otra proteína, por ejemplo, otra metaloproteínasa. Cada miembro de la biblioteca candidata puede ser sometido a uno o más ensayos de cribado secundarios. El ensayo puede ser para una propiedad de enlazamiento, una propiedad catalítica, una propiedad inhibidora, una propiedad fisiológica (por ejemplo, citotoxicidad, aclaramiento renal, inmunogenicidad), una propiedad estructural (por ejemplo, la estabilidad, conformación, estado de oligomerización) u otra propiedad funcional. El mismo ensayo se puede usar varias veces, pero con diferentes condiciones, por ejemplo, para determinar el pH, la sensibilidad iónica o térmica.

20 Según sea conveniente, los ensayos pueden usar un miembro de la biblioteca de expresión directamente, un polipéptido recombinante producido a partir del ácido nucleico que codifica el polipéptido seleccionado, o un péptido sintético sintetizado con base en la secuencia del polipéptido seleccionado. En el caso de los Fab seleccionados, los Fab pueden ser evaluados o pueden ser modificados y producidos como proteínas de IgG intactas. Los ejemplos de ensayos para las propiedades de enlazamiento incluyen los siguientes.

25 ELISA. Las proteínas de enlazamiento pueden ser evaluadas usando un ensayo ELISA. Por ejemplo, cada proteína se pone en contacto con una placa de microtitulación cuya superficie inferior ha sido recubierta con el objetivo, por ejemplo, una cantidad limitante del objetivo. Se lava la placa con amortiguador para remover los polipéptidos enlazados de forma no específica. Luego se determina la cantidad de la proteína de enlazamiento enlazada al objetivo en la placa mediante el sondeo de la placa con un anticuerpo que puede reconocer la proteína de enlazamiento, por ejemplo, una etiqueta o una porción constante de la proteína de enlazamiento. El anticuerpo se enlaza a un sistema de detección (por ejemplo, una enzima tal como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante (HRP) que produce un producto colorimétrico cuando se proporcionan sustratos apropiados).

35 Ensayos de enlazamiento homogéneo. La capacidad de una proteína de enlazamiento descrita en el presente documento para enlazarse a un objetivo puede ser analizada utilizando un ensayo homogéneo, es decir, después de añadir todos los componentes del ensayo, no se requieren manipulaciones adicionales de fluidos. Por ejemplo, se puede usar transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) como un ensayo homogéneo (véase, por ejemplo, Lakowicz et al., patente de los Estados Unidos No. 5.631.169; Stavrianopoulos, et al., patente de los Estados Unidos No. 4.868.103). Se selecciona una etiqueta de fluoróforo en la primera molécula (por ejemplo, la molécula identificada en la fracción) de tal manera que su energía fluorescente emitida puede ser absorbida por una etiqueta fluorescente en una segunda molécula (por ejemplo, el objetivo) si la segunda molécula se encuentra en la proximidad a la primera molécula. La etiqueta fluorescente en la segunda molécula emite fluorescencia cuando absorbe la energía transferida. Dado que la eficiencia de transferencia de energía entre las etiquetas se relaciona con la distancia que separa las moléculas, se puede evaluar la relación espacial entre las moléculas. En una situación en la que se produce enlazamiento entre las moléculas, la emisión fluorescente de la etiqueta de la molécula 'aceptora' en el ensayo debe ser máxima. Se puede medir convenientemente un evento de enlazamiento que está configurado para seguimiento mediante FRET a través de un medio de detección fluorométrico estándar, por ejemplo, usando un fluorímetro. Mediante la titulación de la cantidad de la primera o la segunda molécula de enlazamiento, se puede generar una curva de enlazamiento para estimar la constante de enlazamiento de equilibrio.

50 Otro ejemplo de un ensayo homogéneo es ALPHASCREEN^{MR} (Packard Bioscience, Meriden CT). ALPHASCREEN^{MR} utiliza dos perlas marcadas. Una perla genera oxígeno singlete cuando es excitado por un láser. La otra perla genera una señal luminosa cuando el oxígeno singlete se difunde desde la primera perla y choca con él. La señal sólo se genera cuando las dos perlas están próximas. Una perla puede estar unida al miembro de la biblioteca de expresión, la otra al objetivo. Se miden las señales para determinar el grado de enlazamiento.

55 Resonancia del plasmón de superficie (SPR). La interacción de la proteína de enlazamiento y un objetivo se puede analizar usando SPR. La SPR o el análisis de interacción biomolecular (BIA) detectan interacciones bioespecíficas

en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes. Los cambios en la masa en la superficie de enlazamiento (indicativos de un evento de enlazamiento) del chip de BIA resulta en alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de resonancia del plasmón de superficie (SPR)). Los cambios en la refractividad generan una señal detectable, que se mide como una indicación de las reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas. Los métodos para utilizar SPR se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 5.641.640; Raether, 1988, Surface Plasmons Springer Verlag; Sjolander y Urbaniczky, 1991, Anal. Chem. 63: 2338 - 2345; Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699 - 705 y recursos en línea proporcionados por BIAcore International AB (Uppsala, Suecia).

La información de la SPR se puede utilizar para proporcionar una medida precisa y cuantitativa de la constante de equilibrio de disociación (K_d), y parámetros cinéticos, incluyendo $K_{activada}$ y $K_{no\ activada}$, para el enlazamiento de una proteína de enlazamiento a un objetivo. Estos datos pueden ser utilizados para comparar diferentes biomoléculas. Por ejemplo, las proteínas seleccionadas de una biblioteca de expresión pueden ser comparadas para identificar las proteínas que tienen alta afinidad por el objetivo o que tienen una $K_{no\ activada}$ lenta. Esta información también puede ser utilizada para desarrollar las relaciones estructura-actividad (SAR). Por ejemplo, los parámetros cinéticos y de equilibrio de enlazamiento de las versiones maduras de una proteína original se pueden comparar con los parámetros de la proteína original. Se pueden identificar variantes de aminoácidos en posiciones dadas que se correlacionan con determinados parámetros de enlazamiento, por ejemplo, una alta afinidad y $K_{no\ activada}$ lenta. Esta información puede combinarse con el modelamiento estructural (por ejemplo, usando modelamiento por homología, minimización de la energía, o determinación de la estructura por cristalografía de rayos X o RMN). Como resultado de ello, se puede formular la comprensión de la interacción física entre la proteína y su objetivo y usarla para guiar otros procesos de diseño.

Ensayos celulares. Se pueden cribar las proteínas de enlazamiento por su capacidad para enlazarse a las células que expresan de forma estable o transitoria y muestran el objetivo de interés en la superficie de la célula. Por ejemplo, las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 pueden ser etiquetadas con fluorescencia y se puede detectar el enlazamiento a la MMP-14 en presencia o ausencia de anticuerpo antagonista por un cambio en la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo, por ejemplo, una máquina de FACS.

Otros ejemplos de métodos para la obtención de anticuerpos de enlazamiento a la MMP-14

Además de la utilización de bibliotecas de expresión, se pueden utilizar otros métodos para obtener un anticuerpo de enlazamiento a MMP-14. Por ejemplo, se pueden utilizar una proteína MMP-14 o una región de la misma como antígeno en un animal no humano, por ejemplo, un roedor.

En una realización, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible modificar por ingeniería genética cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humana. Usando la tecnología de hibridoma, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos del antígeno (Mabs) derivados de los genes con la especificidad deseada. Véase, por ejemplo, XENOMOUSE^{MR}, Green et al., 1994, Nat. Gen. 7: 13 - 21; solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2003-0070185, la publicación internacional WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996 y la publicación internacional WO 96/33735, publicada el 31 de octubre de 1996.

En otra realización, se obtiene un anticuerpo monoclonal a partir del animal no humano, y luego se modifica, por ejemplo, se humaniza o desinmuniza. Winter describe un método de injerto de CDR que puede usarse para preparar los anticuerpos humanizados (publicación de la solicitud de patente del Reino Unido No. GB 2188638A, presentada el 26 de marzo de 1987; la patente de los Estados Unidos No. 5.225.539. Todas las CDR de un anticuerpo humano particular pueden ser reemplazadas con al menos una porción de una CDR no humana o sólo algunas de las CDR pueden ser reemplazadas con las CDR no humanas. Sólo es necesario reemplazar el número de las CDR requeridas para el enlazamiento del anticuerpo humanizado a un antígeno predeterminado.

Los anticuerpos humanizados pueden generarse reemplazando secuencias de la región variable Fv que no están implicadas directamente en el enlazamiento del antígeno con secuencias equivalentes de regiones variables Fv humanas. Los métodos generales para generar anticuerpos humanizados son proporcionados por Morrison, S. L., 1985, Science 229: 1202 - 1207, por Oi et al., 1986, BioTechniques 4: 214, y por Queen et al. patentes de los Estados Unidos Nos. 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762. Esos métodos incluyen aislamiento, manipulación y expresión de las secuencias de ácido nucleico que codifican todo o parte de las regiones variables Fv de inmunoglobulina a partir de al menos una entre una cadena pesada o ligera. Se encuentran disponibles numerosas fuentes de dicho ácido nucleico. Por ejemplo, se pueden obtener los ácidos nucleicos de un hibridoma que produce un anticuerpo contra un objetivo predeterminado, como se describe más arriba. El ADN recombinante que codifica el anticuerpo humanizado, o fragmento del mismo, puede ser luego clonado en un vector de expresión apropiado.

La reducción de la inmunogenicidad de las proteínas de enlazamiento a la MMP-14

Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 de inmunoglobulina (por ejemplo, proteínas de enlazamiento de MMP-14 de IgG o Fab) pueden ser modificadas para reducir la inmunogenicidad. Una inmunogenicidad reducida es deseable en las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 destinadas para ser usadas como agentes terapéuticos ya que reduce la probabilidad de que el sujeto desarrolle una respuesta inmune contra la molécula terapéutica.

5 Técnicas útiles para reducir la inmunogenicidad de las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 incluyen la supresión / modificación de los epítomos de células T humanas potenciales y la 'línea germinal' de las secuencias fuera de las CDR (por ejemplo, el marco y Fc).

10 Un anticuerpo de enlazamiento de MMP-14 puede ser modificado por supresión específica de epítomos de células T humanas o "desinmunización" por los métodos descritos en las publicaciones internacionales WO 98/52976 y WO 00/34317. En resumen, se analizan las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo por los péptidos que se enlazan a MHC de clase II; estos péptidos representan epítomos de células T potenciales (como se define en las publicaciones internacionales WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de epítomos de células T potenciales, se puede aplicar un enfoque de modelamiento por ordenador denominado "enhebrado del péptido", y además, se pueden buscar en una base de datos de péptidos de enlazamiento de MHC de clase II humanas presentes en las secuencias de VH y VL, tal como se describe en las publicaciones internacionales WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos motivos se enlazan con cualquiera de los 18 principales alotipos DR de MHC de clase II, y por lo tanto constituyen epítomos de células T potenciales. Los epítomos de células T potenciales detectados se pueden eliminar mediante la sustitución de un pequeño número de residuos de aminoácidos en las regiones variables, o preferiblemente, mediante sustituciones de aminoácidos individuales. En la medida en que sea posible se hacen sustituciones conservadoras, a menudo pero no exclusivamente, se puede utilizar un aminoácido común en esta posición en secuencias de anticuerpos de línea germinal humana. Se describen secuencias de línea germinal humana en Tomlinson, I. A. et al., 1992, J. Mol. Biol. 227: 776 - 798; Cook, G. P. et al., 1995, Immunol. Today, Vol. 16 (5): 237 - 242; Chothia, D. et al., 1992, J. Mol. Bio. 227: 799 - 817. El directorio V BASE ofrece un amplio directorio de secuencias de regiones variables de inmunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, I. A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido). Después se identifican los cambios de desinmunización, se pueden construir los ácidos nucleicos que codifican VH y VL mediante mutagénesis u otros métodos de síntesis (por ejemplo, síntesis de novo, reemplazo de casete, etc.). Se puede fusionar, opcionalmente, una secuencia variable mutagenizada, a una región constante humana, por ejemplo, IgG1 humana o regiones constantes k.

30 En algunos casos, un epítomo de célula T potencial incluirá residuos que se sabe o se predice que son importantes para la función del anticuerpo. Por ejemplo, los epítomos de células T potenciales son generalmente predispuestos hacia las CDR. Además, los epítomos de células T potenciales pueden ocurrir en los residuos estructurales importantes para la estructura del anticuerpo y el enlazamiento. Los cambios para eliminar estos epítomos potenciales requerirán en algunos casos un mayor escrutinio, por ejemplo, elaborando y probando cadenas con y sin el cambio. Siempre que sea posible, los epítomos de células T potenciales que se superponen a las CDR fueron eliminados por sustituciones fuera de las CDR. En algunos casos, una alteración dentro de una CDR es la única opción, y por lo tanto las variantes con y sin esta sustitución debe ser analizadas. En otros casos, la sustitución que requiere remover un epítomo de célula T potencial se encuentra en una posición de un residuo en el marco que puede ser crítico para el enlazamiento del anticuerpo. En estos casos, se deben analizar las variantes con y sin esta sustitución. Por lo tanto, en algunos casos se diseñaron varias regiones variables diferentes de cadena pesada y ligera desinmunizadas y se analizaron diversas combinaciones de cadena pesada / ligera con el fin de identificar el anticuerpo desinmunizado óptimo. La elección del anticuerpo desinmunizado final puede hacerse luego teniendo en cuenta la afinidad de enlazamiento de las diferentes variantes junto con el grado de desinmunización, es decir, el número de epítomos de células T potenciales que quedan en la región variable. Se puede utilizar la desinmunización para modificar cualquier anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo que incluye una secuencia no humana, por ejemplo, un anticuerpo sintético, un anticuerpo de murino, otro anticuerpo monoclonal no humano, o un anticuerpo aislado de una biblioteca de expresión.

50 Los anticuerpos de enlazamiento a la MMP-14 provienen de "línea germinal" revirtiendo uno o más aminoácidos de línea no germinal en regiones marco en los correspondientes aminoácidos de la línea germinal del anticuerpo, siempre y cuando se retengan sustancialmente las propiedades de enlazamiento. Se pueden utilizar también métodos similares en la región constante, por ejemplo, en dominios de inmunoglobulina constantes.

55 Los anticuerpos que se enlazan a la MMP-14, por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento, pueden ser modificados con el fin de volver las regiones variables del anticuerpo más similar a una o más secuencias de línea germinal. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una, dos, tres, o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, en un marco, CDR, o región constante, para que sea más similar a una secuencia de línea germinal de referencia. Un ejemplo un método de línea germinal puede incluir la identificación de una o más secuencias de línea germinal que sean similares (por ejemplo, más similar en una base de datos en particular) a la secuencia del anticuerpo aislado. Se hacen luego mutaciones (a nivel de los aminoácidos) en el anticuerpo aislado, ya sea en forma incremental o en combinación con otras mutaciones. Por ejemplo, se elabora una biblioteca de ácidos nucleicos que incluye secuencias que codifican algunas o todas las posibles mutaciones de línea germinal.

60

Se evalúan luego los anticuerpos mutados, por ejemplo, para identificar un anticuerpo que tiene uno o más residuos adicionales de línea germinal en relación con el anticuerpo aislado y que aún es útil (por ejemplo, tiene una actividad funcional). En una realización, se introducen tantos residuos de línea germinal en un anticuerpo aislado como sea posible.

- 5 En una realización, se usa la mutagénesis para sustituir o insertar uno o más residuos de línea germinal en un marco y/o región constante. Por ejemplo, un residuo de marco y/o de región constante de línea germinal pueden ser de una secuencia de línea germinal que es similar (por ejemplo, más similar) a la región no variable que está siendo modificada. Después de la mutagénesis, se puede evaluar la actividad (por ejemplo, el enlazamiento u otra actividad funcional) del anticuerpo para determinar si el residuo o residuos de línea germinal son tolerados (es decir, no eliminar la actividad). Se puede llevar a cabo una mutagénesis similares en las regiones marco.

- 15 La selección de una secuencia de línea germinal se puede realizar de diferentes maneras. Por ejemplo, se puede seleccionar una secuencia de línea germinal si reúne unos criterios predeterminados de selectividad o similitud, por ejemplo, al menos un cierto porcentaje de identidad, por ejemplo, al menos 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 99,5% de identidad. La selección puede realizarse utilizando por lo menos 2, 3, 5, o 10 secuencias de línea germinal. En el caso de CDR1 y CDR2, la identificación de una secuencia de línea germinal similar puede incluir la selección de una de tales secuencias. En el caso de CDR3, la identificación de una secuencia de línea germinal similar puede incluir la selección de una de tales secuencias, pero puede incluir el uso de dos secuencias de línea germinal que contribuyen por separado a la porción del terminal amino y la porción del terminal carboxilo. En otras implementaciones se utilizan más de una o dos secuencias de línea germinal, por ejemplo, para formar una secuencia de consenso.

- 25 En una realización, con respecto a una secuencia particular de dominio variable de referencia, por ejemplo, una secuencia descrita en este documento, una secuencia de dominio variable relacionada tiene al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 100% de las posiciones de aminoácidos de la CDR que no son idénticos a los residuos en las secuencias de la CDR de referencia, residuos que son idénticos a los residuos en las posiciones correspondientes en una secuencia de línea germinal humana (es decir, una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de línea germinal humana).

- 30 En una realización, con respecto a una secuencia particular de dominio variable de referencia, por ejemplo, una secuencia descrita en este documento, una secuencia de dominio variable relacionada tiene al menos 30, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% de las regiones de FR idénticas a la secuencia de FR de una secuencia de línea germinal humana, por ejemplo, una secuencia de línea germinal relacionada con la secuencia del dominio variable de referencia.

- 35 Por consiguiente, es posible aislar un anticuerpo que tiene una actividad similar a un anticuerpo determinado de interés, pero es más similar a una o más secuencias de línea germinal, en particular una o más secuencias de línea germinal humana. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 99,5% idéntico a una secuencia de línea germinal en una región fuera de las CDR (por ejemplo, regiones marco). Además, un anticuerpo puede incluir al menos 1, 2, 3, 4, o 5 residuos de línea germinal en una región CDR, siendo el residuo de línea germinal de una secuencia de línea germinal similar (por ejemplo, más similar) a la región variable que está siendo modificada. Las secuencias de línea germinal de interés principal son las secuencias de la línea germinal humana. La actividad del anticuerpo (por ejemplo, la actividad de enlazamiento medida por K_A) puede estar dentro de un factor de 100, 10, 5, 2, 0,5, 0,1, 0,001 del anticuerpo original.

- 40 Las secuencias de la línea germinal de genes de inmunoglobulina humana han sido determinadas y están disponibles en una variedad de fuentes, incluyendo el sistema internacional de información ImMunoGeneTics® (IMGT), disponible a través de la red mundial de información en imgt.cines.fr, y el directorio V BASE (compilado por Tomlinson, I. A. et al. MCR Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido, disponible a través de la red mundial de información en vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk).

- 45 Los ejemplos de secuencias de referencia de línea germinal para V_{κ} incluyen: O12/O2, O18/O8, A20, A30, L14, L1, L15, L4/18a, L5/L19, L8, L23, L9, L24, L11, L12, O11/O1, A17, A1, A18, A2, A19/A3, A23, A27, A11, L2/L16, L6, L20, L25, B3, B2, A26/A10 y A14. Véase, por ejemplo, Tomlinson et al., 1995, EMBO J. 14 (18): 4628 - 3.

- 50 Una secuencia de referencia de línea germinal para el dominio variable de HC se puede basar en una secuencia que tiene estructuras canónicas particulares, por ejemplo, estructuras 1-3 en los bucles hipervariables H1 y H2. Las estructuras canónicas de los bucles hipervariables de un dominio variable de inmunoglobulina se pueden inferir a partir de su secuencia, como se describe en Chothia et al., 1992, J. Mol Biol. 227: 799 - 817; Tomlinson et al., 1992, J. Mol Biol. 227: 776 - 798); y Tomlinson et al., 1995, EMBO J. 14 (18): 4628 - 38. Los ejemplos de secuencias con una estructura 1-3 incluyen: DP-1, DP-8, DP-12, DP-2, DP-25, DP-15, DP-7, DP-4, DP-31, DP-32, DP-33, DP-35, DP-40, 7-2, hv3005, hv3005f3, DP-46, DP-47, DP-58, DP-49, DP-50, DP-51, DP-53 y DP-54.

- 55 Producción de Proteína

- 5 Se pueden utilizar métodos estándar de ácidos nucleicos recombinantes para expresar una proteína que se enlaza a MMP-14. En general, se clona una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína en un vector de expresión de ácido nucleico. Por supuesto, si la proteína incluye múltiples cadenas de polipéptido, cada cadena puede ser clonada en un vector de expresión, por ejemplo, los mismos o diferentes vectores, que se expresan en las mismas o diferentes células.
- 10 Producción de anticuerpos. Algunos anticuerpos, por ejemplo, Fab, se pueden producir en células bacterianas, por ejemplo, células de *E. coli*. Por ejemplo, si el Fab es codificado por secuencias en un vector de expresión en fago que incluye un codón de detención que puede ser suprimido entre la entidad de expresión y una proteína de bacteriófago (o fragmento de la misma), se puede transferir el ácido nucleico del vector a una célula bacteriana que no puede suprimir un codón de detención. En este caso, el Fab no se fusiona a la proteína del gen III y se secreta en el periplasma y/o el medio.
- 15 Los anticuerpos también se pueden producir en células eucariotas. En una realización, los anticuerpos (por ejemplo, de scFv) se expresan en una célula de levadura tal como *Pichia* (véase, por ejemplo, Powers et al., 2001, J. Immunol. Methods. 251: 123 - 35), *Hanseula*, o *Saccharomyces*.
- 20 En una realización preferida, los anticuerpos se producen en células de mamíferos. Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos de clones o fragmentos de enlace a antígeno de los mismos incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr, descritas en Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77: 4216 - 4220, que se utilizan con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp, 1982, Mol. Biol. 159: 601 - 621), líneas de células linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NS0 y células SP2, células COS, células HEK293T (J. Immunol. Methods (2004) 289 (1 -2): 65 - 80), y una célula de un animal transgénico, por ejemplo, un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial mamaria.
- 25 Además de la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de inmunoglobulina diversificada, los vectores de expresión recombinante pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr con selección / amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).
- 30 En un ejemplo de un sistema para la expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de enlace a antígeno del mismo, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en células CHO dhfr mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes para la cadena pesada y ligera del anticuerpo están cada uno operativamente enlazados a elementos reguladores reforzadores / promotores (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tal como un elemento regulador del reforzador de CMV / del promotor de AdMLP o un elemento regulador del reforzador de SV40 / potenciador / promotor de AdMLP) para manejar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección / amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y se recupera el anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se usan técnicas estándar de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, algunos anticuerpos se pueden aislar mediante cromatografía de afinidad con una matriz acoplada a proteína A o proteína G.
- 35 Para los anticuerpos que incluyen un dominio Fc, el sistema de producción de anticuerpos puede producir anticuerpos en los que la región Fc está glicosilada. Por ejemplo, el dominio Fc de las moléculas de IgG está glicosilado en la asparagina 297 en el dominio CH2. Esta asparagina es el sitio para la modificación con oligosacáridos de tipo biantenarico. Se ha demostrado que se requiere esta glicosilación para las funciones efectoras mediadas por los receptores de Fcg y el complemento C1q (Burton y Woof, 1992, Adv. Immunol. 51: 1 - 84; Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163: 59 - 76). En una realización, se produce el dominio Fc en un sistema de expresión de mamífero que glicosila adecuadamente el residuo correspondiente a la asparagina 297. El dominio Fc también puede incluir otras modificaciones postraduccionales eucariotas.
- 40
- 45
- 50
- 55 Los anticuerpos también pueden ser producidos por un animal transgénico. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.849.992 describe un método de expresión de un anticuerpo en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Se construye un transgén que incluye un promotor específico de la leche y ácidos nucleicos que

codifican el anticuerpo de interés y una secuencia señal para secreción. La leche producida por las hembras de tales mamíferos transgénicos incluye, secretada allí, al anticuerpo de interés. El anticuerpo puede ser purificado de la leche, o para algunas aplicaciones, utilizado directamente.

Caracterización de proteínas de enlazamiento a la MMP-14

5

El enlazamiento de las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 a las células que expresan MMP-14 se puede caracterizar en una cantidad de ensayos conocidos en la técnica, incluyendo FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia), inmunofluorescencia e inmunocitoquímica. La proteína de enlazamiento a la MMP-14 se pone en contacto con células y/o tejidos que expresan o contienen MMP-14, y se detecta el enlazamiento de acuerdo con el método que se está utilizando. Por ejemplo, un sistema de detección fluorescente (por ejemplo, un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia) empleado para análisis FACS y de inmunofluorescencia, o un sistema enzimático usado para inmunocitoquímica que son los que generalmente se utilizan en estos ensayos pueden ser llevados a cabo sin permanencia. Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 se pueden caracterizar como para enlazamiento celular por FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia) utilizando células que expresan MMP-14. Las células individuales mantenidas en una corriente fina de fluido se pasan a través de uno o más haces de láser que hacen que la luz se disperse y los colorantes fluorescentes emitan luz a varias frecuencias. Tubos fotomultiplicadores (PMT) convierten la luz en señales eléctricas y se recogen datos de la célula. Se utilizan la dispersión hacia adelante y la dispersión lateral para la identificación preliminar de las células. Se utilizan la dispersión hacia adelante y la dispersión lateral para excluir los desechos y las células muertas. La marcación fluorescente permite la investigación de la estructura y función de la célula. Se genera una célula autofluorescente mediante la marcación de las estructuras de la célula con colorantes fluorescentes. FACS recoge las señales de fluorescencia en uno a varios canales correspondientes a diferentes longitudes de onda de excitación láser y emisión de fluorescencia. La inmunofluorescencia, la aplicación más utilizada, implica la coloración de las células con anticuerpos conjugados con colorantes fluorescentes, tales como fluoresceína y ficoeritrina (PE). Este método se puede utilizar para etiquetar MMP-14 sobre la superficie de la célula de las células MDA-MB-231 utilizando proteínas de enlazamiento a la MMP-14 biotinilada. La biotina se utiliza en estos sistemas de detección de dos etapas junto con estreptavidina conjugada. La biotina se conjuga típicamente con las proteínas a través de aminas primarias (es decir, lisinas). Por lo general, entre 1,5 y 3 moléculas de biotina se conjugan con cada anticuerpo. Se añade un segundo anticuerpo conjugado con fluorescencia (estreptavidina / PE) que es específico para biotina.

Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 se pueden caracterizar en células cultivadas que expresan el antígeno de MMP-14. El método utilizado es generalmente inmunocitoquímica. La inmunocitoquímica implica el uso de anticuerpos que reconocen partes del receptor que están expuestas al ambiente exterior cuando se expresan en la superficie celular (el 'anticuerpo primario'). Si el experimento se lleva a cabo en células intactas, este anticuerpo únicamente se enlazará a receptores expresados en la superficie. Se pueden utilizar proteínas de enlazamiento a la MMP-14 biotiniladas o no biotiniladas. El anticuerpo secundario es entonces o bien un anticuerpo de estreptavidina / HRP (para la proteína de enlazamiento a la MMP-14 biotinilada) o una IgG / HRP anti-humana (para proteínas de enlazamiento a la MMP-14 no biotiniladas). La coloración puede ser luego detectada usando un microscopio invertido. El ensayo se puede realizar en ausencia de proteína de enlazamiento a la MMP-14 y en presencia de 10 µg / mL de proteína de enlazamiento a la MMP-14.

Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 se pueden caracterizar en ensayos que miden su actividad moduladora hacia MMP-14 o fragmentos de las mismas *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, MMP-14 se puede combinar con un sustrato tal como Mca-Pro-Leu-Ala-Cys(Mob)-Trp-Ala-Arg-Dap(DNP)-NH₂ bajo condiciones de ensayo que permitan la escisión por MMP-14. El ensayo se realiza en ausencia de la proteína de enlazamiento a la MMP-14, y en presencia de concentraciones crecientes de la proteína de enlazamiento a la MMP-14. La concentración de proteína de enlazamiento a la que 50% de la actividad de la MMP-14 (por ejemplo, la enlazamiento al sustrato) se inhibe es el valor de IC₅₀ (concentración inhibidora del 50%) o el valor EC₅₀ (concentración efectiva para el 50%) para esa proteína de enlazamiento. Dentro de una serie o grupo de proteínas de enlazamiento, aquellas que tienen valores más bajos de IC₅₀ o EC₅₀ se consideran inhibidores más potentes de la MMP-14 que aquellas proteínas de enlazamiento que tienen valores más altos de IC₅₀ o EC₅₀. Los ejemplos de proteínas de enlazamiento tienen un valor de IC₅₀ de menos de 800 nM, 400 nM, 100 nM, 25 nM, 5 nM o 1 nM, por ejemplo, tal como se mide en un ensayo *in vitro* para la inhibición de la actividad de MMP-14 cuando la MMP-14 está en 2 pM.

Proteínas de enlazamiento a la MMP-14 también se pueden caracterizar con referencia a la actividad de MMP-14 sobre sus sustratos (por ejemplo, la activación de pro-MMP-2 en la superficie de la célula). La escisión de pro-MMP-2 de la superficie de la célula por MMP-14 libera MMP-2 activa, que puede ser detectada por zimografía. El método se basa en un gel de SDS impregnado con un sustrato de proteína, que es degradado por las proteasas resueltas durante el período de incubación. La coloración de los geles con azul de Coomassie revela fragmentos proteolíticos como bandas blancas sobre un fondo azul oscuro. Dentro de un cierto rango, la intensidad de la banda puede estar

relacionada linealmente con la cantidad de la proteasa cargada. Se usan en este ensayo las células que expresan tanto MMP-14 como MMP-2. El ensayo se realiza en ausencia de la proteína de enlazamiento a la MMP-14, y en presencia de concentraciones crecientes de la proteína de enlazamiento a la MMP-14. La concentración de proteína de enlazamiento a la que 50% de la actividad de MMP-2 (por ejemplo, enlazamiento con el sustrato) se inhibe es el valor de IC₅₀ (concentración Inhibitoria del 50%) o el valor de EC₅₀ (concentración efectiva para el 50%) para esa proteína de enlazamiento. Dentro de una serie o grupo de proteínas de enlazamiento, aquellas que tienen valores más bajos de IC₅₀ o EC₅₀ se consideran inhibidores más potentes de la MMP-14 que aquellas proteínas de enlazamiento que tienen valores más altos de IC₅₀ o EC₅₀. Los ejemplos de proteínas de enlazamiento tienen un valor de IC₅₀ de menos de 800 nM, 400 nM, 100 nM, 25 nM, 5 nM o 1 nM, por ejemplo, tal como se mide en un ensayo *in vitro* para la inhibición de la actividad de MMP-14.

Las proteínas de enlazamiento también pueden ser evaluadas por la selectividad hacia MMP-14. Por ejemplo, una proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede ser analizada por su potencia hacia MMP-14 y un panel de las MMP y otras enzimas, por ejemplo, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-16, MMP-17, MMP-24, y TACE, y se puede determinar un valor de IC₅₀ o un valor de EC₅₀ para cada MMP. En una realización, un compuesto que muestra un valor de IC₅₀ o un valor EC₅₀ bajos para la MMP-14, y un valor de IC₅₀ o un valor de EC₅₀ más altos, por ejemplo, al menos 2, 5, o 10 veces más altos, para otra MMP dentro del panel de ensayo (por ejemplo, MMP-1, MMP-10) se considera que es selectivo hacia MMP-14.

Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 pueden ser evaluadas por su capacidad para inhibir la MMP-14 en un ensayo basado en células. La expansión de las células tumorales dentro de una matriz de colágeno tridimensional puede ser mejorada significativamente en respuesta a la sobreexpresión de MMP-14 (Hotary et al., 2003 Cell 114: 33 - 45). La adición de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 a este ensayo se puede usar para determinar las propiedades inhibitorias y otras características de la proteína.

Se puede realizar un estudio de farmacocinética en ratas, ratones o monos con proteínas de enlazamiento a la MMP-14 para la determinación de la vida media de MMP-14 en el suero. Del mismo modo, se puede evaluar el efecto de la proteína de enlazamiento *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal para una enfermedad, para uso como un compuesto terapéutico, por ejemplo, para tratar una enfermedad o condición descrita en este documento, por ejemplo, un cáncer (por ejemplo, cáncer metastásico, por ejemplo, cáncer metastásico de mama), una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, sinovitis, aterosclerosis), artritis reumatoide, osteoartritis, una afección ocular (por ejemplo, degeneración macular), diabetes, enfermedad de Alzheimer, isquemia cerebral, endometriosis, actividad invasiva de fibrina, angiogénesis, o la formación del tubo capilar.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la descripción proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticamente aceptables o composiciones farmacéuticas, que incluyen una proteína de enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, otro polipéptido o péptido identificado como de enlazamiento a la MMP-14 descrito en el presente documento. La proteína de enlazamiento a la MMP-14 se puede formular junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas incluyen composiciones terapéuticas y composiciones de diagnóstico, por ejemplo, composiciones que incluyen proteínas etiquetadas de enlazamiento a la MMP-14 para formación de imágenes *in vivo*.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión), aunque también se contemplan los vehículos adecuados para inhalación y administración intranasal. Dependiendo de la ruta de administración, la proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede estar recubierta en un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

Una sal farmacéuticamente aceptable es una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte efectos toxicológicos no deseados (véase, por ejemplo, Berge, S. M., et al., 1977, J. Pharm. Sci 66: 1 - 19). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso, y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxil alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio, y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína, y similares.

- Las composiciones pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y de infusión), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma puede depender del modo pretendido de administración y la aplicación terapéutica. Muchas composiciones están en la forma de
- 5 soluciones inyectables o de infusión, tales como composiciones similares a aquellas usadas para la administración a humanos con anticuerpos. Un modo de ejemplo de administración es parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En una realización, la proteína de enlazamiento a la MMP-14 se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, la proteína de enlazamiento a la MMP-14 se administra por inyección intramuscular o subcutánea.
- 10 Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se utilizan aquí, significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intrasternal.
- 15 La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración del fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación de la proteína de enlazamiento en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o con una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un
- 20 vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada en forma estéril del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como
- 25 lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.
- Una proteína de enlazamiento a la MMP-14 se puede administrar por una variedad de métodos, aunque para muchas aplicaciones, la ruta / modo de administración preferido es inyección o infusión intravenosa. Por ejemplo,
- 30 para aplicaciones terapéuticas, la proteína de enlazamiento a la MMP-14 se puede administrar por infusión intravenosa a una velocidad de menos de 30, 20, 10, 5, o 1 mg/min hasta alcanzar una dosis de aproximadamente 1 a 100 mg/m² o 7 a 25 mg/m². La ruta y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de
- 35 suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de vinil etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, polioctoésteres, y ácido poliláctico. Se encuentran disponibles muchos métodos para la preparación de tales formulaciones. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., 1978, Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
- 40 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos. Por ejemplo, en una realización, una composición farmacéutica descrita en este documento puede administrarse con un dispositivo, por ejemplo, un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, una bomba, o un implante.
- En ciertas realizaciones, se puede formular una proteína de enlazamiento a la MMP-14 para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente
- 45 hidrofílicos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos descritos en la presente invención cruzan la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más fracciones que son transportadas selectivamente en células u órganos específicos, mejorando así el suministro dirigido de fármacos (véase, por ejemplo, V. V. Ranade, 1989, J. Clin. Pharmacol. 29: 685).
- 50 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo único, pueden administrarse varias dosis divididas en un lapso de tiempo o puede reducirse o aumentarse proporcionalmente la dosis de acuerdo a lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidades de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de
- 55 dosificación como se usa aquí, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación puede ser dictada por y depende directamente de (a) las características

únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en el arte de la formación de las composiciones de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

5 Un ejemplo de un intervalo no limitante para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un anticuerpo descrito en este documento es de 0,1 - 0,2 mg/kg, más preferiblemente 1-10 mg/kg. Se puede administrar un anticuerpo anti-MMP-14, por ejemplo, por infusión intravenosa, por ejemplo, a una velocidad de menos de 30, 20, 10, 5, o 1 mg/min hasta alcanzar una dosis de aproximadamente 1 a 100 mg/m² o aproximadamente 5 a 30 mg/m². Para las proteínas de enlazamiento más pequeñas en peso molecular que un anticuerpo, las cantidades apropiadas pueden ser proporcionalmente menores. Los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección a aliviar. Para un sujeto particular, se pueden ajustar los regímenes de dosificación específicos con el tiempo de acuerdo a la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

15 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 descrita en este documento. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la proteína para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición es superada por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

20 Una "dosis terapéuticamente efectiva" modula preferiblemente un parámetro medible, por ejemplo, los niveles de anticuerpos IgG en circulación en un grado estadísticamente significativo o al menos aproximadamente 20%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 40%, incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente 60%, y aún más preferiblemente en al menos aproximadamente 80% con respecto a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para modular un parámetro medible, por ejemplo, un parámetro asociado a la enfermedad, puede ser evaluada en un sistema de un modelo animal predictivo de la eficacia en los trastornos y condiciones en humanos, por ejemplo, un cáncer (por ejemplo, cáncer metastásico, por ejemplo, cáncer metastásico de mama), una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, sinovitis, aterosclerosis), artritis reumatoide, osteoartritis, una afección ocular (por ejemplo, degeneración macular), diabetes, enfermedad de Alzheimer, isquemia cerebral, endometriosis, actividad invasiva de fibrina, angiogénesis, o la formación del tubo capilar. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede ser evaluada examinando la capacidad del compuesto para modular un parámetro *in vitro*.

35 Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, debido a que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Estabilización y retención

40 En una realización, una proteína de enlazamiento a la MMP-14 está asociada físicamente con una fracción que mejora su estabilización y/o retención en circulación, por ejemplo, en sangre, suero, linfa, u otros tejidos, por ejemplo, por lo menos 1,5, 2, 5, 10 o 50 veces. Por ejemplo, una proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede estar asociada con un polímero, por ejemplo, con polímeros sustancialmente no antigénicos, tales como óxidos de polialquileno u óxidos de polietileno. Los polímeros adecuados variarán sustancialmente en peso. Se pueden utilizar polímeros que tienen pesos moleculares promedio aritméticos que van desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 35.000 (o aproximadamente 1.000 hasta aproximadamente 15.000, y 2.000 hasta aproximadamente 12.500). Por ejemplo, una proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede ser conjugada a un polímero soluble en agua, por ejemplo, polímeros de polivinilo hidrofílicos, por ejemplo alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona. Un listado no limitante de tales polímeros incluye homopolímeros de óxido de polialquileno tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxietilenados, sus copolímeros y copolímeros en bloque de los mismos, siempre que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros en bloque.

50 Una proteína de enlazamiento a la MMP-14 también puede estar asociada con una proteína portadora, por ejemplo, una albúmina de suero, tal como una albúmina de suero humano. Por ejemplo, se puede utilizar una fusión translacional para asociar la proteína portadora con la proteína de enlazamiento a la MMP-14.

Kits

55 Una proteína de enlazamiento a la MMP-14 descrita en este documento puede suministrarse en un kit, por ejemplo, como un componente de un kit. Por ejemplo, el kit incluye (a) una proteína de enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, una composición que incluye una proteína de enlazamiento a la MMP-14, y, opcionalmente (b) material

informativo. El material informativo puede ser descriptivo, de instrucción, de mercadeo u otro material que se refiera a los métodos descritos en el presente documento y/o el uso de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 para los métodos descritos aquí.

5 El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En una realización, el material informativo puede incluir información sobre la producción del compuesto, el peso molecular del compuesto, la concentración, la fecha de caducidad, información sobre el lote o el sitio de producción, y así sucesivamente. En una realización, el material informativo se refiere a la utilización de la proteína de enlazamiento para tratar, prevenir, o para el diagnóstico de trastornos y afecciones, por ejemplo, un cáncer (por ejemplo, cáncer metastásico, por ejemplo, cáncer metastásico de mama), una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, sinovitis, aterosclerosis), artritis reumatoide, osteoartritis, una
10 afección ocular (por ejemplo, degeneración macular), diabetes, enfermedad de Alzheimer, isquemia cerebral, endometriosis, actividad invasiva de fibrina, angiogénesis, o la formación del tubo capilar.

En una realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar una proteína de enlazamiento a la MMP-14 de una manera adecuada para llevar a cabo los métodos descritos aquí, por ejemplo, en una dosis adecuada, forma de dosificación, o el modo de administración (por ejemplo, una dosis, forma de dosificación, o modo de administración descrita en este documento). En otra realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar una proteína de enlazamiento a la MMP-14 a un sujeto adecuado, por ejemplo, un humano, por ejemplo, un humano que tiene, o está en riesgo de padecer un trastorno o condición descrita en el presente documento, por ejemplo, un cáncer (por ejemplo, cáncer metastásico, por ejemplo, cáncer metastásico de mama), una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, sinovitis, aterosclerosis), artritis reumatoide, osteoartritis, una
20 afección ocular (por ejemplo, degeneración macular), diabetes, enfermedad de Alzheimer, isquemia cerebral, endometriosis, actividad invasiva de fibrina, angiogénesis, o la formación del tubo capilar. Por ejemplo, el material puede incluir instrucciones para administrar una proteína de enlazamiento a la MMP-14 a un paciente con un trastorno o condición descrita en el presente documento, por ejemplo, un cáncer (por ejemplo, cáncer metastásico, por ejemplo, cáncer metastásico de mama), una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, sinovitis, aterosclerosis),
25 artritis reumatoide, osteoartritis, una afección ocular (por ejemplo, degeneración macular), diabetes, enfermedad de Alzheimer, isquemia cerebral, endometriosis, actividad invasiva de fibrina, angiogénesis, o la formación del tubo capilar. El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, instrucciones, se proporciona en forma impresa, pero también puede estar en otros formatos, tales como material que puede ser leído por ordenador.

30 La proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede ser proporcionada en cualquier forma, por ejemplo, en forma líquida, seca o liofilizada. Se prefiere que una proteína de enlazamiento a la MMP-14 sea sustancialmente pura y/o estéril. Cuando una proteína de enlazamiento a la MMP-14 se suministra en una solución líquida, la solución líquida preferiblemente es una solución acuosa, siendo preferida una solución acuosa estéril. Cuando una proteína de enlazamiento a la MMP-14 se suministra en forma seca, la reconstitución generalmente es mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, por ejemplo, agua estéril o amortiguador, opcionalmente puede ser suministrado en el kit.
35

El kit puede incluir uno o más envases para la composición que contiene una proteína de enlazamiento a la MMP-14. En algunas realizaciones, el kit contiene recipientes separados, separadores o compartimentos para la composición y el material informativo. Por ejemplo, la composición puede estar contenida en una botella, vial o jeringa, y el material informativo puede estar contenido en asocio con el recipiente. En otras formas de realización, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un único recipiente no dividido. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o jeringa que adherida a la misma el material informativo en forma de una etiqueta. En algunas realizaciones, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de envases individuales, que contienen cada uno una o más formas de dosificación unitaria (por ejemplo, una forma de dosificación descrita en el presente documento) de una proteína de enlazamiento a la MMP-14. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringas, ampollitas, empaques de aluminio, o envases blíster, conteniendo cada uno una única dosis unitaria de una proteína de enlazamiento a la MMP-14. Los envases de los kits pueden ser herméticos, resistentes al agua (por ejemplo, impermeables a los cambios de humedad o evaporación), y/o herméticos a la luz.
40
45

El kit incluye opcionalmente un dispositivo adecuado para la administración de la composición, por ejemplo, una jeringa, inhalador, cuentagotas (por ejemplo, cuentagotas para los ojos), un hisopo (por ejemplo, un hisopo de algodón o un hisopo de madera), o cualquier dispositivo de suministro. En una realización, el dispositivo es un dispositivo implantable que dispensa dosis medidas de la proteína de enlazamiento. La descripción también incluye un método para proporcionar un kit, por ejemplo, mediante la combinación de los componentes descritos en el presente documento.
50

55 Tratamientos

Las proteínas que se enlazan a la MMP-14 e identificadas por el método descrito en el presente documento y/o detalladas aquí tienen utilidades terapéuticas y profilácticas, especialmente en sujetos humanos. Estas proteínas de

enlazamiento se administran a un sujeto para tratar, prevenir y/o diagnosticar una variedad de trastornos, incluyendo, por ejemplo, un cáncer (por ejemplo, cáncer metastásico, por ejemplo, cáncer metastásico de mama), una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, sinovitis, aterosclerosis), artritis reumatoide, osteoartritis, una afección ocular (por ejemplo, degeneración macular), diabetes, enfermedad de Alzheimer, isquemia cerebral, endometriosis, actividad invasiva de fibrina, angiogénesis, o formación del tubo capilar, o incluso para células en cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*. El tratamiento incluye la administración de una cantidad efectiva para mitigar, aliviar, alterar, remediar, medrar, mejorar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad. El tratamiento también puede retrasar la aparición, por ejemplo, prevenir el inicio o prevenir el deterioro de una enfermedad o condición.

Los ejemplos de trastornos incluyen un cáncer (por ejemplo, cáncer metastásico, por ejemplo, cáncer metastásico de mama), una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, sinovitis, aterosclerosis), artritis reumatoide, osteoartritis, una afección ocular (por ejemplo, degeneración macular), diabetes, enfermedad de Alzheimer, isquemia cerebral, endometriosis, actividad invasiva de fibrina, angiogénesis, o la formación del tubo capilar. Algunos de estos trastornos se discuten más arriba. Aún otros trastornos que pueden ser tratados utilizando una proteína de enlazamiento a la MMP-14 incluyen: aneurismas aórticos, periodontitis, trastornos autoinmunes con formación de ampollas en la piel, fotoenvejecimiento cutáneo.

Como se usa aquí, una cantidad de un agente efectivo de enlazamiento al objetivo para prevenir un trastorno, o una cantidad profilácticamente efectiva del agente de enlazamiento se refiere a una cantidad de un agente de enlazamiento al objetivo, por ejemplo, una proteína de enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, un anticuerpo anti-MMP-14 descrito en el presente documento, que sea efectiva, tras la administración de una dosis única o múltiple al sujeto, para prevenir o retrasar la ocurrencia de la aparición o recurrencia de un trastorno, por ejemplo, un trastorno descrito aquí.

Un agente de enlazamiento descrito en la presente memoria puede ser utilizado para reducir la angiogénesis en un sujeto, por ejemplo, para tratar un cáncer (por ejemplo, un tumor sólido) o un trastorno asociado con la angiogénesis. El método incluye la administración del enlazante al sujeto, por ejemplo, en una cantidad efectiva para modular la angiogénesis, un síntoma del trastorno, o la progresión del trastorno. El agente (por ejemplo, una proteína de enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, un anticuerpo anti-MMP-14) se puede administrar varias veces (por ejemplo, al menos dos, tres, cinco o diez veces) antes de alcanzar una cantidad terapéuticamente efectiva.

Los métodos de administración de proteínas de enlazamiento a la MMP-14 y otros agentes son descritos también en "Pharmaceutical Compositions". Las dosis adecuadas de las moléculas utilizadas pueden depender de la edad y el peso del sujeto y del fármaco particular utilizado. Las proteínas de enlazamiento se pueden utilizar como agentes competitivos para inhibir, reducir una interacción indeseable, por ejemplo, entre un agente natural o patológico y la MMP-14. La dosis de la proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede ser la cantidad suficiente para bloquear el 90%, 95%, 99%, o 99,9% de la actividad de la MMP-14 en el paciente, especialmente en el sitio de la enfermedad. Dependiendo de la enfermedad, esta puede requerir 0,1, 1,0, 3,0, 6,0, o 10,0 mg / Kg. Para una IgG que tiene una masa molecular de 150.000 g / mol (dos sitios de enlazamiento), estas dosis corresponden aproximadamente a 18 nM, 180 nM, 540 nM, 1,08 μM, y 1,8 μM de sitios de enlazamiento para un volumen de sangre de 5 L.

En una realización, las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 se utilizan para inhibir una actividad (Por ejemplo, inhibir al menos una actividad de, proliferación reducida, migración, crecimiento o viabilidad) de una célula, por ejemplo, una célula cancerosa *in vivo*. Las proteínas de enlazamiento se pueden usar por sí mismas o conjugadas con un agente, por ejemplo, un fármaco citotóxico, una enzima citotóxica o un radioisótopo. Este método incluye: la administrar la proteína de enlazamiento sola o unida a un agente (por ejemplo, un fármaco citotóxico), a un sujeto que requiera de tal tratamiento. Por ejemplo, las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 que no inhiben sustancialmente a la MMP-14 pueden ser utilizadas para suministrar nanopartículas que contienen agentes, tales como toxinas, a células o tejidos asociados a la MMP-14, por ejemplo, tumores.

Debido a que las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 reconocen las células que expresan MMP-14 y pueden enlazarse a células que están asociadas con (por ejemplo, en la proximidad de, o mezcladas con) células cancerosas, por ejemplo, células cancerosas de pulmón, hígado, colon, mama, ovario, epidérmicas, de laringe, y de cartílago, y particularmente células metastásicas de las mismas, se pueden utilizar proteínas de enlazamiento a la MMP-14 para inhibir (por ejemplo, inhibir al menos una actividad, reducir el crecimiento y la proliferación, o matar) cualquiera de tales células e inhibir la carcinogénesis. La reducción de la actividad de MMP-14 cerca de un cáncer puede inhibir indirectamente (por ejemplo, inhibir al menos una actividad, reducir el crecimiento y la proliferación, o matar) las células cancerosas que pueden ser dependientes de la actividad de MMP-14 para la metástasis, la activación de factores de crecimiento, y así sucesivamente.

Alternativamente, las proteínas de enlazamiento se enlazan a las células en la vecindad de las células cancerosas, pero están lo suficientemente cerca a las células cancerosas para inhibir directa o indirectamente (por ejemplo, inhibir al menos una actividad, reducir el crecimiento y la proliferación, o matar) las células cancerosas. Por lo tanto,

las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, modificadas con una toxina, por ejemplo, una citotoxina) se pueden utilizar para inhibir selectivamente células en el tejido canceroso (incluyendo las propias células cancerosas y células asociadas con o que invaden el cáncer).

5 Las proteínas de enlazamiento se pueden utilizar para administrar un agente (por ejemplo, cualquiera de una variedad de fármacos citotóxicos y terapéuticos) a células y tejidos donde está presente MMP-14. Los ejemplos de agentes incluyen un compuesto que emite radiación, moléculas de plantas, hongos, o de origen bacteriano, proteínas biológicas y mezclas de los mismos. Los fármacos citotóxicos pueden ser fármacos citotóxicos que actúan intracelularmente, tales como toxinas emisoras de radiación de corto alcance, por ejemplo, emisoras α de alta energía de corto alcance.

10 Para dirigir células que expresan a la MMP-14, particularmente células cancerosas, se puede usar un sistema de profármaco. Por ejemplo, una primera proteína de enlazamiento se conjuga con un profármaco que es activado solamente cuando está en estrecha proximidad con un activador del profármaco. El activador del profármaco se conjuga con una segunda proteína de enlazamiento, preferiblemente una que se enlaza a un sitio no competitivo sobre la molécula objetivo. Si dos proteínas de enlazamiento se enlazan a sitios de enlazamiento competitivos o no puede ser determinado mediante ensayos convencionales de enlazamiento competitivo. Los ejemplos de pares de profármaco de fármacos se describen en Blakely et al., (1996) Cancer Research, 56: 3287 - 3292.

15 Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 pueden usarse directamente *in vivo* para eliminar las células que expresan antígeno a través de citotoxicidad que depende del complemento natural (CDC) o citotoxicidad celular que depende del anticuerpo (ADCC). Las proteínas de enlazamiento descritas en este documento pueden incluir al dominio complementario efector del enlazamiento, tal como las porciones Fc de IgG1, 2, o 3 o las porciones correspondientes de IgM que se enlazan al complemento. En una realización, una población de células objetivo es tratada *ex vivo* con un agente de enlazamiento descrito en este documento y células efectoras apropiadas. El tratamiento puede ser complementado mediante la adición de un complemento o de un suero que contiene complemento. Además, la fagocitosis de células objetivo recubiertas con una proteína de enlazamiento descrita en la presente memoria puede ser mejorada mediante el enlazamiento de proteínas del complemento. En otra realización objetivo, las células recubiertas con la proteína de enlazamiento que incluye un dominio efector de enlazamiento del complemento son lisadas por el complemento.

20 Métodos de administración de las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 son descritos en "Pharmaceutical Compositions". Las dosis adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y del fármaco particular utilizado. Las proteínas de enlazamiento pueden ser utilizadas como agentes competitivos para inhibir o reducir una interacción indeseable, por ejemplo, entre un agente natural o patológico y la MMP-14.

25 La proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede ser usada para suministrar macro y micromoléculas, por ejemplo, un gen en la célula para fines de terapia génica en el epitelio o el endotelio o dirigidos sólo a aquellos tejidos que expresan la MMP-14. Las proteínas de enlazamiento pueden ser utilizadas para suministrar una variedad de fármacos citotóxicos incluyendo fármacos terapéuticos, un compuesto que emite radiación, moléculas de plantas, hongos, o de origen bacteriano, proteínas biológicas y mezclas de los mismos. Los fármacos citotóxicos pueden ser fármacos citotóxicos que actúan intracelularmente, tales como emisores de radiación de corto alcance, incluyendo, por ejemplo, emisores α de alta energía de corto alcance, como se describe aquí.

30 En el caso de toxinas polipeptídicas, se pueden utilizar técnicas de ácidos nucleicos recombinantes para construir un ácido nucleico que codifica la proteína de enlazamiento (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de enlazamiento de antígeno del mismo) y la citotoxina (o un componente polipeptídico de la misma) como fusiones transduccionales. El ácido nucleico recombinante se expresa luego, por ejemplo, en células y se aísla el polipéptido de fusión codificado.

35 Alternativamente, se puede acoplar la proteína de enlazamiento a la MMP-14 con emisores de radiación de alta energía, por ejemplo, un radioisótopo, tal como ^{131}I , un emisor γ , que, cuando se localiza en un sitio, da como resultado la muerte de varios diámetros de células. Véase, por ejemplo, S. E. Order, "Analysis, Results and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwin et al., (eds.), páginas 303 - 316 (Academic Press, 1985). Otros radioisótopos adecuados incluyen emisores, tales como ^{212}Bi , ^{213}Bi , y ^{211}At , y emisores β , tales como ^{186}Re y ^{90}Y . Por otra parte, también se puede utilizar ^{177}Lu tanto como agente de formación de imágenes y citotóxico.

40 La radioinmunoterapia (RIT) utilizando anticuerpos marcados con ^{131}I , ^{90}Y y ^{177}Lu está bajo intensa investigación clínica. Existen diferencias significativas en las características físicas de estos tres nucleídos y como resultado, la elección del radionucleido es muy crítica con el fin de suministrar una dosis de radiación máxima a un tejido de interés. Las partículas de mayor energía beta de ^{90}Y pueden ser buenas para tumores voluminosos. Las partículas beta de relativamente baja energía de ^{131}I son ideales, pero la deshalogenación *in vivo* de moléculas radioyodadas es una gran desventaja para la internalización de los anticuerpos. En contraste, ^{177}Lu tiene partículas beta de baja

energía con sólo un intervalo de 0,2 - 0,3 mm y suministra una dosis de radiación mucho menor a la médula ósea en comparación con ⁹⁰Y. Además, debido a una vida media física mayor (en comparación con ⁹⁰Y), los tiempos de residencia son más altos. Como resultado, se pueden administrar actividades más altas (mayor cantidad de mCi) de agente marcados con ¹⁷⁷Lu con dosis de radiación comparativamente menores para la médula. Se han realizado
 5 varios estudios clínicos que investigan el uso de anticuerpos marcados con ¹⁷⁷Lu en el tratamiento de varios tipos de cáncer. (Mulligan T et al., 1995, Clin. Canc. Res. 1: 1447 - 1454; Meredith R. F., et al., 1996, J. Nucl. Med. 37: 1491 - 1496; Alvarez R. D., et al., 1997, Gynecol. Oncol. 65: 94 - 101).

Ejemplos de enfermedades y condiciones

Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 descritas en este documento son útiles para tratar enfermedades o
 10 condiciones en las cuales MMP-14 está implicada, por ejemplo, una enfermedad o condición descrita en el presente documento, o para tratar uno o más síntomas asociados con la misma. En algunas realizaciones, la proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, IgG o Fab de enlazamiento a la MMP-14) inhibe la actividad de MMP-14, y puede inhibir además, MMP-16, y/o MMP-24. Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 que inhiben la MMP-16 y/o MMP-24 son particularmente útiles para el tratamiento de trastornos en los cuales también están implicadas estas metaloproteasas.
 15

Los ejemplos de tales enfermedades y condiciones incluyen un cáncer (por ejemplo, cáncer metastásico, por ejemplo, cáncer metastásico de mama), enfermedad inflamatoria (por ejemplo, sinovitis, artritis reumatoide, osteoartritis), aterosclerosis, enfermedades oculares (por ejemplo, degeneración macular), diabetes, enfermedad de
 20 Alzheimer, isquemia, endometriosis, actividad invasiva de fibrina, angiogénesis y formación del tubo capilar. Se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene un trastorno en el cual está implicada la MMP-14, tratando de este modo (por ejemplo, mejorar o medrar un síntoma o característica de un trastorno, desacelerar, estabilizar o detener la progresión de la enfermedad) el trastorno.

La proteína de enlazamiento a la MMP-14 se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva. Una cantidad
 25 terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 es la cantidad que es efectiva, después de la administración de una dosis única o múltiple a un sujeto, en el tratamiento de un sujeto, por ejemplo, la cura, medrar, aliviar o mejorar al menos un síntoma de un trastorno en un sujeto hasta un grado más allá del esperado en ausencia de tal tratamiento. Una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo, y el peso del individuo, y la capacidad del
 30 compuesto para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la cual cualquiera de los efectos tóxicos o nocivos de la composición es superada por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Se puede administrar una cantidad terapéuticamente, por lo general una cantidad de compuesto que sea efectiva,
 35 después de la administración de una dosis única o múltiple a un sujeto, en el tratamiento de un sujeto, por ejemplo, curar, medrar, aliviar o mejorar al menos un síntoma de un trastorno en un sujeto hasta un grado más allá del esperado en ausencia de tal tratamiento. Una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del compuesto para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición es superada por los efectos
 40 terapéuticamente beneficiosos. Una dosis terapéuticamente efectiva modula preferiblemente un parámetro medible, de manera favorable, con relación a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir un parámetro medible puede ser evaluada en un sistema de un modelo animal predictivo de la eficacia en un trastorno humano.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una
 45 respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o se puede reducir o incrementar proporcionalmente la dosis de acuerdo a lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidades de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosis. La forma unitaria de dosificación como se utiliza aquí, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que van a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para
 50 producir el efecto terapéutico deseado junto con el portador farmacéutico requerido.

Cáncer

Las metaloproteasas de matriz (MMP), tales como MMP-14, MMP-16 y MMP-24, se cree que contribuyen al cáncer
 55 mediante la escisión de los componentes de la membranas basales y ECM, permitiendo de ese modo penetrar las células cancerosas e infiltrar la matriz estromal subyacente. Además, una cantidad de receptores de factores de crecimiento, de moléculas de adhesión celular, quimoquinas, citoquinas, ligandos de apoptosis y factores angiogénicos son sustratos de las MMP. Por lo tanto, la actividad de MMP puede causar la activación de factores de

- crecimiento, supresión de apoptosis de células tumorales, destrucción de gradientes de quimoquinas desarrollados por la respuesta inmune del huésped, o liberación de factores angiogénicos. Las MMP pueden facilitar el crecimiento del tumor mediante la promoción de la liberación de factores de proliferación celular tales como factores de crecimiento similares a la insulina que se enlazan a proteínas de enlazamiento específico (IGFBP) (Manes et al., 1997 J. Biol. Chem. 272: 25706 - 25712).
- 5 Se han encontrado colagenasas, incluyendo MMP-2, en niveles elevados en melanoma y en cánceres de colon, mama, pulmón, próstata y vejiga. Por lo general, estos niveles elevados se correlacionan con un mayor grado tumoral y de invasividad. Los niveles de MMP-2 son significativamente elevados en el suero de pacientes con cáncer de pulmón metastásico, y en aquellos pacientes con niveles altos, se disminuye la respuesta a la quimioterapia.
- 10 Del mismo modo, MMP-14, que escinde proMMP-2 para liberar MMP-2 activa, se eleva en numerosos tipos de cáncer y puede contribuir al crecimiento de tumores, al embolismo tumoral y a la movilidad, invasividad y metástasis del cáncer (por ejemplo, tumores SNC (por ejemplo, gliomas), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de la cavidad oral, cáncer de laringe, condrosarcoma, cáncer de mama).
- 15 MMP-16 y MMP-24 también están elevados en numerosos tipos de cáncer y pueden contribuir tanto al crecimiento de tumores como a la invasividad y metástasis del cáncer (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de laringe, cáncer de ovario, carcinoma testicular, melanoma, tumores cerebrales (por ejemplo, astrocitomas, glioblastomas, gliomas)).
- 20 Por consiguiente, la descripción proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, para desacelerar, eliminar, o revertir el crecimiento del tumor, prevenir o reducir, ya sea en cantidad o tamaño, la metástasis, reducir o eliminar la invasividad de las células tumorales, proporcionando un aumento en el intervalo para el progreso del tumor, o aumentando tiempo de supervivencia libre de la enfermedad) del cáncer (por ejemplo, cáncer de mama, incluyendo el cáncer de mama Her2+, Her2-, ER+, ER-, Her2+ / ER+, Her2+ / ER-, Her2- / ER+, y Her2- / ER-), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cavidad oral, cáncer de laringe, condrosarcoma, cáncer de ovario, carcinoma testicular, melanoma, tumores cerebrales (por ejemplo, astrocitomas, glioblastomas, gliomas)) mediante la administración de una cantidad efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14). En algunas realizaciones, la proteína de enlazamiento a la MMP-14 inhibe la actividad de MMP-14. La proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede inhibir además a la MMP-16 y/o la MMP-24.
- 25 En ciertas realizaciones, se administra la proteína de enlazamiento a la MMP-14 como un tratamiento de un sólo agente. En otras realizaciones se administra la proteína de enlazamiento a la MMP-14 en combinación con un agente anti-cáncer adicional.
- 30 También se proporcionan métodos para prevenir o reducir el riesgo de desarrollar cáncer, mediante la administración de una cantidad efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 a un sujeto con riesgo de desarrollar cáncer, reduciendo así el riesgo del sujeto de desarrollar un cáncer.
- 35 La descripción proporciona además métodos para modular (por ejemplo reducir o prevenir) la angiogénesis en un sitio del tumor mediante la administración de una cantidad efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14, reduciendo o previniendo de este modo la angiogénesis en el sitio del tumor. La proteína de enlazamiento a la MMP-14 se puede administrar como una terapia de un agente único o en combinación con agentes adicionales.
- También se proporcionan métodos para reducir la degradación de la matriz extracelular (ECM) por un tumor, que comprende administrar una cantidad efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 a un sujeto, reduciendo así la degradación de la ECM por un tumor en el sujeto.
- 40 Los métodos descritos son útiles en la prevención y el tratamiento de tumores sólidos, tumores de tejidos blandos, y las metástasis de los mismos. Los tumores sólidos incluyen neoplasias (por ejemplo, sarcomas, adenocarcinomas y carcinomas) de los diversos sistemas de órganos, tales como aquellos de pulmón, de mama, linfoides, gastrointestinales (por ejemplo, colon), y tracto genitourinario (por ejemplo, tumor renal, urotelial, o testicular), faringe, próstata y ovario. Los ejemplos de adenocarcinomas incluyen cánceres colorrectales, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, carcinoma de células no pequeñas del pulmón, y cáncer del intestino delgado. Los ejemplos de tumores sólidos adicionales incluyen: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, carcinomas del sistema genitourinario, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, carcinomas del sistema endocrino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de vejiga,
- 55

carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma. Las metástasis de los cánceres antes mencionados también pueden tratarse o prevenirse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

5 La orientación para la determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva para el tratamiento de cáncer puede obtenerse por referencia a modelos *in vivo* del cáncer a tratar. Por ejemplo, se puede usar la cantidad de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 que es una cantidad terapéuticamente efectiva en un modelo de cáncer de roedor o de cerdo enano de Libechov para guiar la selección de una dosis que sea una cantidad terapéuticamente efectiva. Se encuentran disponibles una cantidad de modelos de roedor de cánceres humanos, incluyendo los sistemas de xenoinjerto de tumor / ratón sin pelo (por ejemplo, xenoinjertos de melanoma; véase, por ejemplo, 10 Trikha et al. Cancer Research 62: 2824 - 2833 (2002)) y modelos murinos de cáncer de mama o de glioma (por ejemplo, Kuperwasser et al., Cancer Research 65, 6130 - 6138, (2005); Bradford et al., Br J Neurosurg. 3 (2): 197 - 210 (1989)). Se encuentra disponible un cerdo enano de Libechov que tiene melanoblastoma (MeLiM) como un modelo animal de melanoma (por ejemplo, Boisgard et al., Eur J Nucl Med Mol Imaging 30 (6): 826 - 34 (2003)).

15 Sinovitis

La sinovitis es una condición caracterizada por la inflamación de la membrana sinovial, un tejido que normalmente sólo tiene unas pocas capas de células de espesor. En la sinovitis, la membrana sinovial puede llegar a engrosarse, tener más células y congestionarse con fluido. La sinovitis puede causar dolor e inflamación en la articulación afectada, y se observa con frecuencia en condiciones artríticas (por ejemplo, artritis reumatoide).

20 La MMP-2 sinovial activa se asocia con erosiones radiográficas en pacientes con sinovitis temprana (Goldbach-Mansky et al., 2000, Arthritis Res, 2: 145 - 153). Las expresiones en tejido sinovial de MMP-2, MMP-14, y TIMP-2 son prácticamente indetectables en muestras normales de tejido sinovial. Las muestras de tejido sinovial de pacientes con enfermedad erosiva tienen niveles significativamente más elevados de MMP-2 activa que aquellos de pacientes sin erosiones. Esto puede reflejar la activación aumentada de MMP-2 por los niveles relativamente altos de MMP-14 y bajos niveles de TIMP-2 observados en estos tejidos. Por lo tanto, la MMP-2 activa puede contribuir al desarrollo y/o progresión de la artritis reumatoide y la osteoartritis.

25 La descripción proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, mejoramiento, estabilización, reducción, o eliminación de un síntoma de la sinovitis tal como dolor, hinchazón de las articulaciones, engrosamiento sinovial, aumento del líquido sinovial) de la sinovitis mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14. También se proporcionan métodos que combinan una terapia de proteína de enlazamiento a la MMP-14 con terapias adicionales. Las terapias actuales para la sinovitis incluyen medicamentos antiinflamatorios (por ejemplo, AINE e ibuprofeno), inyecciones de cortisona en la articulación y tratamiento quirúrgico (por ejemplo, sinovectomía). Uno o más de estos tratamientos puede ser utilizado en combinación con una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora de enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) para tratar esta condición.

30 La orientación para la determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede obtenerse a partir de un modelo animal de sinovitis. Se encuentran disponibles modelos de roedores de la sinovitis, incluyendo un modelo de rata de inflamación similar a la sinovitis (Cirino et al., J Rheumatol 21 (5): 824 - 9 (1994)), y un modelo de sinovitis inducida por carragenina en ratas Wistar macho (Walsh et al. Lab Invest. 78 (12): 1513 - 1521 (1998)).

Artritis reumatoide y condiciones asociadas

35 La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune que causa inflamación de las articulaciones y dolor y normalmente resulta en la destrucción articular. La AR generalmente sigue un curso remitente / recidivante, con "episodios" de actividad de la enfermedad intercalados con remisiones de los síntomas de la enfermedad. La AR se asocia con una serie de trastornos inflamatorios adicionales, incluyendo el síndrome de Sjögren (sequedad de ojos y boca causada por la inflamación de las glándulas lagrimales y salivales), pleuritis (inflamación de la pleura que causa dolor después de una respiración profunda y tos), nódulos reumatoides (sitios nodulares de inflamación que se desarrollan dentro de los pulmones), pericarditis (inflamación del pericardio que causa dolor al acostarse o inclinarse hacia adelante), síndrome de Felty (esplenomegalia y leucopenia observadas en conjunto con la AR, volviendo al sujeto propenso a la infección), y vasculitis (una inflamación de los vasos sanguíneos que puede bloquear el flujo de sangre). MMP-14 y MMP-16 han sido implicados en la artritis reumatoide.

40 Los síntomas de la artritis reumatoide activa incluyen fatiga, falta de apetito, fiebre baja, dolores musculares y articulares y rigidez. La rigidez muscular y de las articulaciones es por lo general más notable en la mañana y después de períodos de inactividad. Durante los episodios, las articulaciones con frecuencia se vuelven rojas, hinchadas, dolorosas, y sensibles, generalmente como consecuencia de la sinovitis.

El tratamiento para la artritis reumatoide implica una combinación de medicamentos, reposo, ejercicios de fortalecimiento de las articulaciones, y protección de las articulaciones. Se usan dos clases de medicamentos en el tratamiento de la artritis reumatoide: "fármacos de primera línea" anti-inflamatorios, y fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (los DMARD). "Los fármacos de primera línea, incluyen los AINE (por ejemplo, aspirina, naproxeno, ibuprofeno y etodolac) y cortisona (corticosteroides). Los DMARD, tal como el oro (por ejemplo, sales de oro, tioglucosa de oro, tiomalato de oro, oro oral), metotrexato, sulfasalazina, D-penicilamina, azatioprina, ciclofosfamida, clorambucil y ciclosporina, leflunomida, etanercept, infliximab, anakinra, y adalimumab, e hidroxicloroquina, promueven la remisión de la enfermedad y previenen la destrucción progresiva de las articulaciones, pero no son agentes antiinflamatorios.

- 5
- 10 La descripción proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, mejoramiento, estabilización, o la eliminación de uno o más síntomas o mejoran o estabilizan la puntuación del sujeto en una escala de AR) de la artritis reumatoide mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la AR. Proporciona adicionalmente métodos para tratar la AR mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14
- 15 y al menos un AINE y/o los DMARD.

Además se proporcionan métodos de tratamiento (por ejemplo, para mejorar, estabilizar, o eliminar de uno o más síntomas) de trastornos asociados con artritis reumatoide (síndrome de Sjogren, pleuritis, nódulos reumatoides pulmonares, pericarditis, síndrome de Felty, y vasculitis) mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14.

- 20 Las escalas útiles para evaluar la AR y los síntomas de la AR incluyen la Escala de Severidad de la Artritis Reumatoide (RASS; Bardwell et al., (2002) *Rheumatology* 41 (1): 38 - 45), el Índice de Salud Específico para la Artritis SF-36 (ASHI; Ware et al., (1999) *Med. Care*. 37 (Suplemento 5): MS40 - 50), Escalas de Medición de Impacto de la Artritis o Escalas de Medición de Impacto de la Artritis 2 (AIMS o AIMS2; Meenan et al. (1992) *Arthritis Rheum.* 35 (1): 1 - 10); el Cuestionario para Evaluación del Estado de Salud de Stanford (HAQ), HAQII o HAQ modificado (véase, por ejemplo, Pincus et al. (1983) *Arthritis Rheum.* 26 (11): 1346 - 1353).
- 25

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 se puede obtener a partir de modelos animales de artritis reumatoide, tales como la artritis inducida por colágeno (CIA), que es inducida, típicamente en roedores, por inmunización con colágeno tipo II autólogo o heterólogo en adyuvante (Williams et al. *Methods Mol Med.* 98: 207 - 16 (2004)).

- 30 Aterosclerosis

La inducción de la MMP-14 está relacionada con la ruptura de placas ateroscleróticas asociadas con el síndrome coronario agudo (ACS) (Ray et al., 2004, *Circ Res*, 95: 1082 - 90). La MMP-14 puede causar la degradación altamente focal de la estructura de capa fibrosa de las placas ateroscleróticas por su ubicación en la membrana celular y la capacidad para activar varios otros miembros de la familia de MMP incluyendo MMP-2. Por consiguiente, la descripción proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, eliminación, mejoramiento, o estabilización de un síntoma de la aterosclerosis, reducción o estabilización del tamaño o el número de las placas ateroscleróticas, incluyendo placas en las arterias coronarias, las arterias carótidas, y la aorta, la reducción o estabilización de la estenosis arterial, incluyendo la estenosis de la arteria carótida y de la arteria coronaria, o la reducción del riesgo de infarto de miocardio) de la aterosclerosis en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene aterosclerosis mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora del enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14).

35

40

Los tratamientos actuales para la aterosclerosis incluyen colestiramina, colestipol, ácido nicotínico, gemfibrozilo, probucol, atorvastatina, lovastatina, aspirina, ticlopidina, clopidogrel (inhibidores de la agregación plaquetaria) y anticoagulantes. La descripción también incluye métodos de tratamiento de la aterosclerosis mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora de enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) además de otra terapia para la aterosclerosis (por ejemplo, colestiramina, colestipol, ácido nicotínico, gemfibrozilo, probucol, atorvastatina, lovastatina, aspirina, ticlopidina, clopidogrel, o anticoagulantes).

45

- 50 La orientación para determinar la dosis de la proteína de enlazamiento a la MMP-14 que proporciona una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede ser obtenida a partir de un modelo animal de aterosclerosis, tal como un conejo hipercolesterolémico (Booth et al. *NMR Biomed.* 3 (2): 95 - 100 (1990)), o un ratón apoE modificado por ingeniería genética (Ozaki et al., *J Clin Invest.* 110 (3): 331 - 340 (2002)).

Condiciones oculares

5 Degeneración Macular. La degeneración macular destruye progresivamente la mácula, la parte central de la retina, afectando la visión central, lo que conduce a la dificultad con la lectura, la conducción, y / u otras actividades diarias que requieren de la visión central fina. Aunque existe una cantidad de diferentes formas de degeneración macular, la más común es la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). La AMD se presenta ya sea como "seca" o "húmeda", siendo de lejos la del tipo húmedo la más común. En la AMD húmeda, la pérdida de líquido de los vasos sanguíneos recién formados por debajo de la retina (neovascularización subretiniana) distorsiona la mácula y dificulta la visión. Los síntomas de la AMD incluyen la pérdida o deterioro de la visión central (generalmente en forma lenta en la AMD seca y rápidamente en la AMD húmeda) y percepción visual anormal de líneas rectas (por ejemplo, las líneas rectas parecen onduladas). Los suplementos de zinc y los antioxidantes vitamina C, vitamina E y beta-caroteno, según se informa, retardan la progresión de la AMD húmeda.

15 La descripción proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, que mejoran la visión, estabilizan la degradación de la visión, o reducen la velocidad de degradación de la visión) AMD (AMD húmeda o AMD seca) mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlace a la MMP-14 (por ejemplo, proteína inhibidora de enlace a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene AMD. También se proporcionan métodos de tratamiento de la AMD mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlace a la MMP-14 con otro tratamiento para la AMD (por ejemplo, zinc, vitamina C, vitamina E y/o beta-caroteno).

20 La orientación respecto a la eficacia y la dosificación de una proteína de enlace a la MMP-14 que suministrará una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína puede ser obtenida a partir de un modelo animal de la degeneración macular, por ejemplo, un modelo de la degeneración macular con *Coturnix coturnix japonica* (codorniz japonesa) (patente de los Estados Unidos No. 5.854.015), o la creación de una herida en la membrana de un ratón C57BL/6J, por ejemplo, con un láser de criptón (publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20030181531).

25 Enfermedad de la córnea. El pico de expresión de MMP-14 y MMP-16 muestra una buena correlación con la respuesta inflamatoria global en las enfermedades intracorneales (Dong et al. 2000, Invest Ophthalmol Vis Sci, 41 (13): 4189 - 94). El queratocono es una enfermedad progresiva donde la córnea se adelgaza y cambia de forma. La distorsión resultante (astigmatismo) causa frecuentemente miopía. El queratocono también puede causar inflamación y cicatrización de la córnea y pérdida de visión.

30 La descripción proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, la mejora o estabilización de la visión, o la mejoría, estabilización, reducción, eliminación, o la prevención de la cicatrización corneal) del queratocono en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene queratocono mediante la administración de una cantidad efectiva de una proteína de enlace a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora de enlace a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14).

35 La orientación respecto a la eficacia y la dosificación de una proteína de enlace a la MMP-14 que suministrará una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína puede ser obtenida a partir de un modelo animal de queratocono, por ejemplo, la línea endogámica de ratón SKC, que sirve como modelo para un subconjunto de queratoconos (Tachibana et al. Invest Ophthalmol Visual Sci, 43: 51 - 57 (2002)).

40 Infección corneal. También se proporcionan métodos de tratamiento (por ejemplo, para prevenir, reducir, estabilizar o eliminar la cicatrización de la córnea como resultado de la infección) de infección corneal mediante la administración de una cantidad efectiva de una proteína de enlace a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora de enlace a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una infección corneal. Adicionalmente, se proporcionan métodos para el tratamiento de la infección corneal mediante la administración de una proteína de enlace a la MMP-14 y un agente terapéutico que trata el agente infeccioso (por ejemplo, un agente antiviral o antibiótico).

45 La orientación respecto a la eficacia y la dosificación de una proteína de enlace a la MMP-14 que suministrará una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína puede ser obtenida a partir de un modelo animal de infección corneal, por ejemplo, un modelo de conejo de la queratocosis experimental, en el que se induce queratitis con un inóculo estandarizado de *Candida albicans* (SC 5314) colocado sobre una córnea desbridada (Goldblum et al. Antimicrob Agents Chemother 49: 1359 - 1363 (2005)).

50 Osteoartritis

55 La osteoartritis, también conocida como artritis degenerativa, se caracteriza por la desintegración y la eventual pérdida del cartílago de una o más articulaciones. La osteoartritis afecta comúnmente a las manos, los pies, la columna vertebral y las articulaciones grandes que soportan peso, como las caderas y las rodillas. MMP-14 y MMP-16 han sido implicadas en la osteoartritis. La descripción proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, estabilización, reducción o eliminación del dolor de las articulaciones, la estabilización o la mejora del desempeño en

las escalas de salud general o de la osteoartritis) para la osteoartritis mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora de enlazamiento a la MMP 14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene osteoartritis.

5 El tratamiento médico actual de la osteoartrosis incluye medidas conservadoras (por ejemplo, descanso, reducción de peso, terapia física y ocupacional) y medicamentos tales como acetaminofén, cremas analgésicas aplicadas a la piel sobre las articulaciones, tales como capsaicina, salicina, salicilato de metilo y mentol, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como aspirina, ibuprofeno, nabumetona, y naproxeno, y los inhibidores de la Cox-2. La descripción proporciona además métodos de tratamiento de la osteoartritis mediante la administración de una
10 cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora del enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) y otra terapia de la osteoartritis (por ejemplo, acetaminofén, una crema tópica para aliviar el dolor, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) tal como aspirina, ibuprofeno, nabumetona o naproxeno, o un inhibidor de la Cox-2).

15 Escalas útiles para la evaluación de la osteoartritis incluyen la escala de resultados para la osteoartritis y lesión de rodilla (KOOS; Roos et al. (1998) J. Orthop. Sports Phys. Ther. 28 (2): 88 - 96), Índice de Osteoartritis de la Universidad del Occidente de Ontario y la Universidad de McMaster (WOMAC; Roos et al. (2003) Health Qual. Life Outcomes 1 (1): 17), y la Escala General de Salud en Forma Abreviada de 36 ítems (SF-36 GHS), así como otras herramientas de evaluación conocidas en la técnica.

20 La orientación respecto a la eficacia y la dosificación de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 que suministrará una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína puede obtenerse a partir de un modelo animal de la osteoartritis, por ejemplo, la inyección de monoyodoacetato (MIA) en la articulación femorotibial de roedores que promueve la pérdida de cartílago articular similar a la observada en la osteoartritis en humanos (Guzmán et al. Toxicol Pathol 31 (6): 619 - 24 (2003)), o la transección del ligamento cruzado anterior (ACL) en caninos para inducir la osteoartritis (Fife y Brandt J Clin Invest. 84 (5): 1432 - 1439 (1989)).

25 Diabetes

Existen dos tipos principales de diabetes mellitus, la llamada de tipo 1 (a veces conocida como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) o diabetes mellitus de aparición en la juventud) y la tipo 2 (a veces conocida como diabetes no dependiente de insulina (NIDDM) o diabetes mellitus que inicia en la edad adulta). MMP-14 y MMP-24 han sido implicadas en la diabetes. Pro-MMP2 se activa de manera eficiente en los tejidos fibrovasculares de la retinopatía diabética proliferativa (PDR), probablemente a través de la interacción con MMP-14 y TIMP2, lo que sugiere que MMP2 y MT1-MMP pueden estar implicadas en la formación de los tejidos fibrovasculares y en la patogénesis de PDR.
30

La descripción proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, para reducir o eliminar la dependencia de la insulina exógena, reduciendo los niveles de glucosa en suero en ayunas, por ejemplo, 6 horas de glucosa en suero en ayunas, por debajo de 150, 140, 130, 126, 120, 110, o 100 mg / dL) de la diabetes (tipo 1 o tipo 2) mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora de enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene diabetes mellitus.
35

La descripción proporciona además métodos de tratamiento de la diabetes mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMMP- 14 además de otro agente de tratamiento de la diabetes mellitus. Se conocen una cantidad de agentes de tratamiento adicionales, incluyendo agentes que aumentan la producción de insulina por el páncreas (por ejemplo, sulfonilureas (por ejemplo, clorpropamida y tolbutamida, gliburida, glipizida, glimepirida) y meglitinidas (por ejemplo, repaglinida y nateglinida), agentes que disminuyen la producción de glucosa hepática (por ejemplo, biguanidas, metformina); agentes sensibilizadores a la insulina (por ejemplo, troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona), agentes que disminuyen la absorción de carbohidratos en el intestino (por ejemplo, acarbosa), agentes que afectan el control glicémico (por ejemplo, pramlintida, exenatida), y una combinación de medicamentos, tales como gliburida / metformina (GLUCOVANCE®), rosiglitazona / metformina (AVANDAMET®), y glipizida / metformina (METAGLIP®).
40
45

También se proporcionan métodos de tratamiento de trastornos secundarios a la diabetes, como la retinopatía diabética proliferativa (PDR) y microangiopatía. Por lo tanto, la descripción proporciona un método de tratamiento (por ejemplo, para la prevención, estabilización, reducción, o eliminación del deterioro de la visión) de la PDR mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora de enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) a un sujeto que tenga o que se sospecha que pueda tener PDR. También se proporcionan métodos de tratamiento (por ejemplo, para prevenir, estabilizar, reducir, o eliminar un síntoma) de microangiopatía mediante la administración de
50
55

una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora de enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) a un sujeto que tenga o que se sospecha que pueda tener microangiopatía.

5 La orientación sobre la eficacia y la dosificación una proteína de enlazamiento a la MMP-14 que suministrará una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína puede ser obtenida a partir de un modelo animal de diabetes, por ejemplo, el ratón ob/ob (Kerouz et al. J. Clin. Invest. 100: 3164 - 3172 (1997)), el ratón db/db (Koenig y Cerami Proc Natl Acad Sci EE.UU. 72 (9): 3687 - 3691 (1975)), la rata sebosa de Zucker (Orci et al. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 87 (24): 9953 - 7 (1990)), o ratas que se han vuelto diabéticas por una dosis diaria baja de estreptozotocina intraperitoneal (STZ) (Nie et al. J Clin Invest. 105: 955 - 965 (2000)).

Enfermedad de Alzheimer

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad progresiva, neurodegenerativa, caracterizada en el cerebro por grumos anormales (placas amiloides) y una masa enredada de fibras (ovillos neurofibrilares) compuestos por proteínas mal ubicadas. Los síntomas de la EA incluyen pérdida de memoria, deterioro del lenguaje, deterioro de la capacidad de manipular mentalmente la información visual, falta de juicio, confusión, inquietud y cambios de humor. La EA finalmente destruye la capacidad de pensar, la personalidad y la capacidad de funcionar. Los primeros
15 síntomas de la EA, que incluyen el olvido y pérdida de concentración, a menudo se pierden porque parecen signos naturales del envejecimiento. Los tratamientos médicos actuales para la EA incluyen tacrina (COGNEX®), donepezilo (ARICEPT®), rivastigmina (EXELON®) y galantamina (REMINYL®), memantina (NAMENDA^{MR}), otros fármacos que pueden afectar a la progresión de la EA incluyen medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), estatinas, ácido fólico, ginkgo biloba y vitaminas E, B6 y B12.

20 La descripción proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, para estabilización, mejoría, eliminación, o prevención de un síntoma de EA o el retardo o eliminación de la progresión de la enfermedad) mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora de enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene EA. También se proporcionan métodos para el tratamiento de la EA
25 mediante la administración a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene EA de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 y un tratamiento adicional para la EA (por ejemplo, tacrina COGNEX®, donepezilo (ARICEPT®), rivastigmina (EXELON®), y galantamina (REMINYL®), memantina (NAMENDA^{MR})).

30 La orientación respecto a la eficacia y la dosificación de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 que suministraría una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína puede obtenerse a partir de un modelo animal de la EA. Por ejemplo, se pueden usar ratones transgénicos que expresan una APP o presenilina humana o de ratón. Algunos de estos ratones transgénicos desarrollan un desorden neurológico progresivo generalmente dentro de un año desde el nacimiento (véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.877.399; 6.037.521; 5.894.078; 5.850.003; y 5.898.094). Se han descrito ciertos modelos de animales transgénicos, por ejemplo, en las
35 patentes de los Estados Unidos Nos. 5.612.486; 5.387.742; 5.720.936; 5.877.015, y 5.811.633, y en Ganes et al. (1995) Nature 373: 523.

Remodelación de la glándula mamaria

40 La morfogénesis mamaria implica "invasión" epitelial de tejido adiposo, un proceso similar a la invasión por células del cáncer de mama, aunque el primero es un proceso de desarrollo altamente regulado. La morfogénesis de ramificación de la glándula mamaria depende, en parte, de la matriz extracelular (ECM), de los receptores de la ECM (por ejemplo, integrinas), de las enzimas que degradan la ECM (por ejemplo, MMP) y de los inhibidores de MMP (inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP)). El aumento de la expresión de MMP-14 se asocia con un aumento de la carcinogénesis mamaria y MMP-2 contribuye a la morfogénesis de ramificación de la glándula mamaria durante la pubertad. En consecuencia, en este documento se proporcionan métodos de inhibición de la
45 remodelación inapropiada de la glándula mamaria y para la profilaxis o tratamiento de lesiones / actividad precancerosa en el tejido mamario.

50 La descripción proporciona métodos para inhibir (por ejemplo, prevenir, reducir, o eliminar) la remodelación inapropiada de la glándula mamaria mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora de enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una remodelación inapropiada de la glándula mamaria. También se proporcionan métodos para la profilaxis o el tratamiento (por ejemplo, para la reducción del riesgo de desarrollar cáncer de mama, o prevenir, eliminar, reducir o estabilizar las lesiones precancerosas en las mamas) de lesiones o actividad precancerosa en las mamas mediante la
55 administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora de enlazamiento a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene lesiones o actividad precancerosa en el tejido mamario.

La orientación respecto a la eficacia y la dosificación de una proteína de enlace a la MMP-14 que suministrará una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína puede ser obtenida a partir de un modelo animal de carcinogénesis mamaria, tal como ratones transgénicos que sobreexpresan MMP-14 en la glándula mamaria bajo el control del promotor de repetición de la terminal larga del virus del tumor mamario de ratón (Ha et al. Cancer Research 61: 984 - 990, (2001)), o se puede utilizar un modelo de ratón transgénico en el que se aumenta la expresión de estromelina-1 de rata en el tejido mamario (Lochter et al. J Biol Chem 272: 5007 - 5015 (1997)).

Isquemia cerebral

La expresión de MMP-2, MMP-14 y MMP-16 se incrementan en el lapso de 1 hora después de la oclusión de la arteria cerebral media en el núcleo isquémico (Chang et al. 2003, J Cereb Blood Flow Metab., 23 (12): 1408 - 1419). Los patrones de expresión son consistentes con la secreción de proMMP-2 y sus activadores en el núcleo isquémico, tal vez de compartimentos de células separados. La rápida y coordinada aparición de pro-MMP-2 y su aparato de activación sugieren que en el cuerpo estriado de primate esta proteasa puede participar en la lesión de la matriz durante la isquemia cerebral focal.

La descripción proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, para la reducción o eliminación de un síntoma de una isquemia cerebral, tal como un déficit / deterioro en el habla, el movimiento, la visión, o la comprensión) de la isquemia cerebral mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlace a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora del enlace a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene isquemia cerebral.

El tratamiento médico actual de la isquemia cerebral incluye anticoagulación con heparina y agentes similares a la heparina (heparina de bajo molecular y heparinoides), y aspirina. La descripción proporciona además métodos de tratamiento de la isquemia cerebral mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlace a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora de enlace a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14) y tratamiento adicional para una isquemia cerebral a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene isquemia cerebral.

La orientación respecto a la eficacia y la dosificación de una proteína de enlace a la MMP-14 que suministrará una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína puede ser obtenida a partir de un modelo animal de isquemia cerebral, por ejemplo, el modelo de accidente cerebrovascular agudo por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) y el modelo de MCAO distal directa (Schneider et al. J. Clin. Invest. 115: 2083 - 2098 (2005); Taguchi et al. J. Clin. Invest. 114: 330 - 338 (2004)).

Endometriosis

La endometriosis implica la proliferación de tejido endometrial fuera de la cavidad endometrial, típicamente a través del peritoneo, y puede causar dolor significativo (por ejemplo, dolor pélvico, dolor en la defecación, dispareunia) e infertilidad. Las lesiones pueden ser "clásicas" (pigmentada, por ejemplo, azul oscuro, marrón oscuro o negro y pueden ser quísticas) o "no clásicas" (en general, no pigmentada). Las lesiones no clásicas se encuentran comúnmente en los pacientes con enfermedad más 'agresiva' (por ejemplo, dolor significativo). Los niveles de expresión del ARNm de MMP-2 y MMP-14 en las lesiones pigmentadas clínicamente agresivas son significativamente más altos que aquellos de endometrio normal eutéptico.

Los tratamientos actuales de la endometriosis incluyen los agentes progestágenos, incluyendo acetato, noretinodrel, acetato de megestrol, didrogesterona, noretisterona, y linestrenol; danazol, un derivado sintético de 3-isoxazol de 17-etinil-testosterona, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), para la destrucción de las lesiones, por ejemplo, con laparoscopia.

La descripción proporciona métodos para el tratamiento (por ejemplo, para reducir, estabilizar, o eliminar un síntoma de la endometriosis como el dolor o la infertilidad) de la endometriosis en un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene endometriosis mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlace a la MMP-14 (por ejemplo, una proteína inhibidora de enlace a la MMP-14, por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14). También se proporcionan métodos para el tratamiento de la endometriosis en un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene endometriosis mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlace a la MMP-14 y un tratamiento adicional de la endometriosis (por ejemplo, un agente progestacional (acetato, noretinodrel, acetato de megestrol, didrogesterona, noretisterona, y linestrenol), danazol, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), o la remoción / destrucción laparoscópica de la lesión).

La orientación respecto a la eficacia y la dosificación de una proteína de enlace a la MMP-14 que suministrará una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína puede obtenerse a partir de un modelo animal de endometriosis, por ejemplo, endometriosis inducida quirúrgicamente que implica autotrasplante de biopsias de útero en el abdomen (Berkley et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 11094 - 98).

Actividad invasiva de fibrina

- La fibrina entrecruzada se deposita en los tejidos que rodean las heridas, sitios inflamatorios o tumores y no sólo sirve como un sustrato de soporte para las células de tráfico, sino también como una barrera estructural a la invasión. Las células invasoras pueden utilizar proteinasas para acceder a la matriz de fibrina con la proteólisis restringida a propósito al medio pericelular de las células que ingresan. MMP-14 puede participar en eventos invasivos de fibrina, a medida que los fibroblastos de ratones sin MMP-14 muestran un defecto temprano en la invasión. Sin embargo, los fibroblastos a los que se les suprimió MMP-14 pueden eludir esta deficiencia temprana y exhibir actividad invasiva fibrina compensatoria. El proceso independiente de MMP-14 es sensible a los inhibidores de MMP que se dirigen a las MMP ancladas a la membrana (Hotary et al., 2002 J Exp Med. 195 (3): 295 - 308).
- 5
- 10 La descripción proporciona métodos de modulación de la actividad invasiva de fibrina mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlace a la MMP-14 (por ejemplo, un Fab o una IgG, que inhiben la MMP-14) a un sujeto que requiere de la modulación de la actividad invasiva de la fibrina. En algunas realizaciones, la proteína de enlace a la MMP-14 enlaza además MMP-16, o se enlaza además e inhibe a la MMP-16.
- 15 La orientación respecto a la eficacia y la dosificación de una proteína de enlace a la MMP-14 que suministrará una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína puede obtenerse a partir de un modelo de la actividad invasiva de fibrina, por ejemplo, un ensayo de invasión celular (Tripathi et al. Cancer Research 62: 2824 - 2833 (2002)).

Angiogénesis y formación del tubo capilar

- El papel de las MMP en la angiogénesis es dual y complejo. La relevancia de estas enzimas como reguladores positivos de la angiogénesis tumoral ha sido demostrada en gran medida. Sin embargo también se han reportado que las MMP actúan como inhibidores de la angiogénesis, mediante las recientes descripciones de mecanismos por medio de los cuales estas enzimas que regulan negativamente la angiogénesis han contribuido a aumentar la complejidad funcional de este sistema proteolítico en el cáncer. Un cierto número de las MMP son capaces de escindir los precursores de angiostatina y endostatina, y generar las formas activas de estos inhibidores endógenos de la angiogénesis (Cornelius et al., 1998; Ferreras et al., 2000). La formación del tubo celular endotelial humano (CE) inducida por el quimiocinas CCL2 y CXCL8 es altamente dependiente de la actividad de MMP-14.
- 20
- 25 La descripción proporciona métodos para modular (por ejemplo, inhibir) la angiogénesis inapropiada o la formación del tubo capilar mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de enlace a la MMP-14 (por ejemplo, una IgG o Fab anti-MMP-14 que inhibe la MMP-14) a un sujeto que requiera de la modulación de la angiogénesis inapropiada o la formación del tubo capilar. También se proporcionan métodos en los que la angiogénesis inapropiada o la formación del tubo capilar es modulada por la administración de una proteína de enlace a la MMP-14 y una angiogénesis adicional o un agente modulador de la formación de un tubo capilar, tal como un inhibidor de VEGF o de Tiel.
- 30
- 35 La orientación respecto a la eficacia y la dosificación de una proteína de enlace a la MMP-14 que suministrará una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína puede obtenerse a partir de un modelo de la angiogénesis, por ejemplo, un ensayo de angiogénesis basado en Matrigel en ratas sin pelo, o en un modelo de formación del tubo capilar, por ejemplo, un ensayo de brotación basado en MC endotelial (Tripathi et al. Cancer Research 62: 2824 - 2833 (2002)) o un ensayo de formación del tubo capilar o un ensayo de angiogénesis como se describe en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2006/0057138 y la publicación internacional WO 2006/020706 ambas presentadas el 9 de agosto de 2005.
- 40

Terapias de combinación

- La proteínas de enlace a la MMP-14 descritas en este documento, por ejemplo, las Fab o IgG anti-MMP-14, se pueden administrar en combinación con una o más de las otras terapias para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la actividad de MMP-14, por ejemplo, una enfermedad o condición descrita en el presente documento. Por ejemplo, una proteína de enlace a la MMP-14 puede utilizarse terapéuticamente o profilácticamente con la cirugía, otro inhibidor de MMP-14, por ejemplo, un inhibidor de molécula pequeña, otra Fab o IgG anti-MMP-14 (por ejemplo, otra Fab o IgG descrita en este documento), un inhibidor de péptido, o un inhibidor de molécula pequeña. Ejemplos de inhibidores de MMP-14 que se pueden utilizar en terapia de combinación con una proteína de enlace a la MMP-14 descrita en el presente documento incluyen neovastat, marimastat, BAY 12-9566 y prinomastat.
- 45
- 50

Se pueden utilizar uno o más inhibidores de MMP de molécula pequeña en combinación con una o más proteínas de enlace a la MMP-14 descritas en este documento. Por ejemplo, la combinación puede resultar en una dosis más baja requerida del inhibidor de molécula pequeña, de tal manera que se reducen los efectos secundarios.

Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 descritas en este documento puede administrarse en combinación con uno o más de las otras terapias para el tratamiento de cánceres, incluyendo, pero sin limitarse a: cirugía; terapia de radiación, y quimioterapia. Por ejemplo, las proteínas que inhiben MMP-14 o que inhiben un evento más adelante de la actividad de MMP-14 (por ejemplo, la escisión de pro-MMP-2 hasta MMP-2) también se puede utilizar en combinación con otras terapias contra el cáncer, tales como terapia de radiación, quimioterapia, cirugía, o la administración de un segundo agente. Por ejemplo, el segundo agente puede ser un inhibidor de Tie-1 (por ejemplo, proteínas de enlazamiento a Tie-1; véase, por ejemplo, la publicación de patente de los Estados Unidos No. 2006/0057138 y la publicación internacional WO 2006/020706 ambas presentadas el 9 de agosto de 2005). Como otro ejemplo, el segundo agente puede ser uno que dirija o regule negativamente la ruta de señalización de VEGF. Ejemplos de esta última clase incluyen antagonistas de VEGF (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF tales como bevacizumab) y antagonistas del receptor de VEGF (por ejemplo, anticuerpos del receptor anti-VEGF). Una combinación particularmente preferida incluye bevacizumab. Como un ejemplo adicional, el segundo agente es un inhibidor de plasmina, tal como una proteína que contiene el dominio de Kunitz o un polipéptido (por ejemplo, un dominio de Kunitz que inhibe la plasmina descrito en la patente de los Estados Unidos No. 6.010.880, tal como una proteína o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos MHSFCFAKAEATGRCRFRDRWF-FNIFTRQCEEFYGGCEGNQRNFESLEECKK MCTRD (SEQ ID NO:)). Como otro ejemplo, el segundo agente es un agente que se enlaza a Her2, tal como un anticuerpo de enlazamiento a Her2 (por ejemplo, trastuzumab). La combinación puede incluir además, 5-FU y leucovorina, y/o irinotecano.

Los inhibidores de MMP-14 (por ejemplo, las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 descritas en este documento) pueden potenciar la actividad de un agente que dirige a Her2 (por ejemplo, un anticuerpo de enlazamiento a Her2 tal como trastuzumab). Por consiguiente, en una terapia de combinación para el tratamiento de cáncer de mama, la segunda terapia es un agente que se enlaza a Her2, tal como un anticuerpo de enlazamiento a Her2 (por ejemplo, trastuzumab). Cuando se utiliza una proteína de enlazamiento a la MMP-14 en una terapia de combinación con un agente de enlazamiento a Her2, la dosis del agente de enlazamiento a Her2 se puede reducir de la dosis del agente de enlazamiento a Her2 cuando no se administra en combinación con una proteína de enlazamiento a la MMP-14 (por ejemplo, es al menos 10%, 25%, 40%, 50% o menos que la dosis del agente de enlazamiento a Her2 cuando no se administra en combinación con una proteína de enlazamiento a la MMP-14). Por ejemplo, la dosis de trastuzumab, cuando se administra en una terapia de combinación con una proteína de enlazamiento a la MMP-14 es menor que aproximadamente 4,0, 3,6, 3,0, 2,4, o 2 mg/kg como una dosis inicial (carga), y menos de aproximadamente 2,0, 1,8, 1,5, 1,2, o 1 mg/kg en dosis posteriores.

Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 descritas en este documento también pueden administrarse en combinación con una o más de otras terapias para el tratamiento de trastornos oculares, tales como terapias quirúrgicas o médicas (por ejemplo, la administración de un segundo agente). Por ejemplo, en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (por ejemplo, degeneración macular húmeda relacionada con la edad), una proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede administrarse junto con (por ejemplo, antes, durante, o después de) la cirugía con láser (fotocoagulación con láser o terapia de fotocoagulación). Como otro ejemplo, la proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede administrarse en combinación con un segundo agente, tal como un antagonista de VEGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF tal como bevacizumab o ranibizumab) o un antagonista del receptor de VEGF (por ejemplo, anticuerpos del receptor anti-VEGF).

El término "combinación" se refiere a la utilización de los dos o más agentes o terapias para tratar el mismo paciente, en donde el uso o la acción de los agentes o terapias se superponen en el tiempo. Los agentes o las terapias pueden administrarse al mismo tiempo (por ejemplo, como una única formulación que se administra a un paciente o como dos formulaciones separadas administradas simultáneamente) o secuencialmente en cualquier orden. Las administraciones secuenciales son las administraciones que se dan en diferentes momentos. El tiempo entre la administración de un agente y otro agente puede ser de minutos, horas, días o semanas. El uso de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 descrita en este documento también se puede utilizar para reducir la dosis de otra terapia, por ejemplo, para reducir los efectos secundarios asociados con otro agente que se está administrando, por ejemplo, para reducir los efectos secundarios de un anticuerpo anti-VEGF tal como bevacizumab. En consecuencia, una combinación puede incluir la administración de un segundo agente en una dosis al menos 10, 20, 30, o 50% menor que la que se utiliza en ausencia de la proteína de enlazamiento a la MMP-14.

Además, un sujeto puede ser tratado por un trastorno asociado con la angiogénesis, por ejemplo, un cáncer, mediante la administración al sujeto de un primero y un segundo agente. Por ejemplo, el primer agente modula la angiogénesis en etapa temprana y el segundo agente modula una etapa posterior de la angiogénesis o también modula la angiogénesis en etapa temprana. Los primero y segundo agentes se pueden administrar usando una sola composición farmacéutica o se pueden administrar por separado. En una realización, el primer agente es un antagonista de la ruta de VEGF (por ejemplo, un inhibidor de un VEGF (por ejemplo, VEGF-A, VEGF-B, o VEGF-C) o un receptor de VEGF (por ejemplo, KDR o del receptor de VEGF III (F1t4)) o un antagonista de la ruta de bFGF (por ejemplo, un anticuerpo que enlaza a bFGF o a un receptor de bFGF). Otros antagonistas de la ruta de VEGF se describen también aquí y en otros lugares. En una realización, el segundo agente inhibe o disminuye la movilidad o invasividad de las células tumorales. Por ejemplo, el segundo agente comprende una proteína de enlazamiento a la

MMP-14. Por ejemplo, el segundo agente es una proteína de enlazamiento a la MMP-14 descrita en el presente documento.

Una vez que un tumor alcanza un tamaño determinado (por ejemplo, ~ 1-2 mm), el tumor requiere nueva vasculatura antes de aumentar su masa. Una etapa temprana de la angiogénesis tumoral puede incluir una señal del tumor, por ejemplo, la secreción de VEGF, para estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos desde el huésped y la infiltración del tumor por los vasos. VEGF puede, por ejemplo, estimular la proliferación de células endoteliales que luego se ensamblan en los vasos sanguíneos. Una etapa tardía de crecimiento del tumor puede incluir metástasis, movilidad y la invasividad de las células tumorales. Esta movilidad y la invasividad pueden involucrar la acción de metaloproteinasas de matriz, por ejemplo, MMP-14, MMP-16, o MMP-24. Por lo tanto, una terapia efectiva para tratar los trastornos relacionados con la angiogénesis puede implicar una combinación de un agente que modula la angiogénesis en una etapa temprana (por ejemplo, antagonistas de la ruta de VEGF, por ejemplo, anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab) o anticuerpos del receptor anti-VEGF (por ejemplo, anti-KDR); o antagonistas de otras rutas de pro-angiogénicos, por ejemplo, anticuerpos anti-bFGF o anticuerpos del receptor anti-bFGF (por ejemplo, del receptor 1, 2 o 3 anti-bFGF)) y un agente que modula una etapa tardía de crecimiento del tumor puede incluir metástasis, movilidad y la invasividad de las células tumorales (por ejemplo, antagonistas de MMP-14, MMP-16 o MMP-24 (por ejemplo, anticuerpos anti-MMP-14 (por ejemplo, un anticuerpo descrito en este documento)), de MMP-16 (por ejemplo, anticuerpos anti-MMP-14 que reaccionan en forma cruzada con MMP-16), o de MMP-24 (por ejemplo, anticuerpos anti-MMP-14 que reaccionan en forma cruzada con las MMP-24). Uno o más de estos agentes pueden ser utilizados en combinación. Uno o más de estos agentes también pueden utilizarse en combinación con otras terapias contra el cáncer, tales como radioterapia o quimioterapia.

Ejemplos de antagonistas del receptor de VEGF incluyen inhibidores de un VEGF (por ejemplo, VEGF-A, VEGF-B, o VEGF-C, por ejemplo bevacizumab), moduladores de la expresión de VEGF (por ejemplo, INGN-241, tetratiomolibdato oral, 2-metoxiestradiol, dispersión de nanocristales de 2-metoxiestradiol, bevasiranib sódico, PTC-299, Veglin), inhibidores de un receptor de VEGF (por ejemplo, KDR o el receptor de VEGF III (Flt4), por ejemplo, anticuerpos anti-KDR, anticuerpos VEGFR2 tales como CDP-791, IMC-1121B, bloqueadores de VEGFR2, tales como CT-322), anticuerpos VEGFR3 tales como mF4-31C1 de Imclone Systems, moduladores de la expresión de VEGFR (por ejemplo, el modulador de la expresión de VEGFR1 Sima-027) o inhibidores de la señalización más abajo del receptor de VEGF.

Los ejemplos de inhibidores de VEGF incluyen bevacizumab, pegaptanib, ranibizumab, NEOVASTAT®, AE-941, VEGF Trap, y PI-88.

Los ejemplos de antagonistas del receptor de VEGF incluyen inhibidores de la actividad de la tirosina quinasa del receptor de VEGF. 4-[4-(1-amino-1-metiletil)fenil]-2-[4-(2-morfolin-4-il-etil)fenilamino]pirimidina-5-carbonitrilo (JNJ-17029259) es uno de una clase estructural de 5-cianopirimidinas que son inhibidores nanomolares selectivos disponibles por vía oral, del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-R2). Ejemplos adicionales incluyen: PTK-7871ZK222584 (Astra-Zeneca), SU5416, SU11248 (Pfizer) y ZD6474 ([N-(4-bromo-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinazolin-4-amina]), vandetanib, cediranib, AG-013958, CP-547632, E-7080, XL-184, L-21649, y ZK-304709. Otros agentes antagonistas de VEGF son inhibidores de tirosina quinasa de amplia especificidad, por ejemplo, SU6668 (véase, por ejemplo, Bergers, B. et al., 2003 J. Clin. Invest. 111: 1287 - 1295), sorafenib, sunitinib, pazopanib, vatalanib, AEE-788, AMG-706, axitinib, BTBF-1120, SU-14813, XL-647, XL-999, ABT-869, BAY-57-9352, BAY-73-4506, BMS-582664, CEP-7055, CHIR-265, OSI-930, y la TKI-258. También son útiles los agentes que subregulan a los receptores de VEGF en la superficie de la célula, tales como fenretinida, y agentes que inhiben la señalización más abajo del receptor de VEGF, tales como escualamina.

El segundo agente o terapia también puede ser otro agente contra el cáncer o terapia. Ejemplos no limitantes de agentes contra el cáncer incluyen, por ejemplo, agentes anti-microtúbulos, inhibidores de la topoisomerasa, antimetabolitos, inhibidores de la mitosis, agentes alquilantes, agentes de intercalación, agentes capaces de interferir con una ruta de transducción de señales, agentes que promueven la apoptosis, radiación, y anticuerpos contra otros antígenos asociados a tumores (incluyendo los anticuerpos desnudos, inmunotoxinas y radioconjugados). Ejemplos de las clases particulares de agentes contra el cáncer se proporcionan en detalle de la siguiente manera: antitubulina / antimicrotúbulo, por ejemplo, paclitaxel, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, taxotere; inhibidores de la topoisomerasa I, por ejemplo, irinotecano, topotecano, camptotecina, doxorubicina, etopósido, mitoxantrona, daunorubicina, idarrubicina, tenipósido, amsacrina, epirubicina, merbarona, clorhidrato de piroxantrona; antimetabolitos, por ejemplo, 5 fluorouracilo (5 FU), metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, citarabina / Ara C, trimetrexato, gemcitabina, acivicina, alanosina, pirazofurina, N-fosforacetil-L-aspartato = PALA, pentostatina, 5 azacitidina, 5 Aza 2' desoxicitidina, ara A, cladribina, 5 fluorouridina, FUDR, tiazofurina, N-[5-[N-(3,4-dihidro-2-metil-4-oxoquinazolin-6-ilmetil)-N-metilamino]-2-tenoil]-ácido L-glutámico; agentes alquilantes, por ejemplo, cisplatino, carboplatino, mitomicina C, BCNU = Carmustina, melfalán, tiotepa, busulfán, cloramubicil, plicamicina, dacarbazina, fosfato de ifosfamida, ciclofosfamida, mostaza de nitrógeno, mostaza de uracilo, pipobromán, 4 ipomeanol; agentes que actúan a través de otros mecanismos de acción, por ejemplo, dihidrolenperona, espiromustina y desipeptido; modificadores de la respuesta biológica, por ejemplo, para

mejorar las respuestas anti-tumorales, tales como el interferón; agentes apoptóticos, tales como actinomicina D; y anti-hormonas, por ejemplo anti-estrógenos tales como tamoxifeno o, por ejemplo antiandrógenos tales como 4'-ciano-3-(4-fluorofenilsulfonil)-2-hidroxi-2-metil-3'-(trifluorometil) propionanilida.

5 Una terapia de combinación puede incluir la administración de un agente que reduce los efectos secundarios de otras terapias. El agente puede ser un agente que reduce los efectos secundarios de los tratamientos contra el cáncer. Por ejemplo, el agente puede ser leucovorina.

10 Las terapias de combinación que incluyen la administración de una proteína de enlazamiento a la MMP-14 u otra proteína de enlazamiento descrita en el presente documento también pueden usarse para tratar a un sujeto que tiene o que está en riesgo de otro trastorno relacionado con angiogénesis (por ejemplo, un trastorno diferente del cáncer, por ejemplo, trastornos que incluyen proliferación celular endotelial indeseada o inflamación no deseable, por ejemplo, artritis reumatoide).

Usos diagnósticos

15 Las proteínas que se enlazan a la MMP-14 e identificadas por el método descrito en el presente documento y/o que se detallan en este documento tienen utilidades diagnósticas *in vitro* e *in vivo*. Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 descritas en este documento (por ejemplo, las proteínas que se enlazan e inhiben, o las proteínas que se enlazan pero no inhiben MMP-14) se pueden utilizar, por ejemplo, para formación de imágenes *in vivo*, por ejemplo, durante un curso de tratamiento para una enfermedad o condición en la que la MMP-14 es activa, por ejemplo, una enfermedad o condición descrita en el presente documento, o en el diagnóstico de una enfermedad o condición descrita en el presente documento.

20 En un aspecto, la descripción proporciona un método de diagnóstico para detectar la presencia de una MMP-14, *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, formación de imágenes *in vivo* en un sujeto). El método puede incluir la localización de MMP-14 en un sujeto o en una muestra de un sujeto. Con respecto a la evaluación de la muestra, el método puede incluir, por ejemplo: (i) poner en contacto una muestra con una proteína de enlazamiento a la MMP-14; y (ii) detectar la ubicación de la proteína de enlazamiento a la MMP-14 en la muestra.

25 Una proteína de enlazamiento a la MMP-14 también se puede utilizar para determinar el nivel cualitativo o cuantitativo de la expresión de MMP-14 en una muestra. El método también puede incluir poner en contacto una muestra de referencia (por ejemplo, una muestra de control) con la proteína de enlazamiento, y determinar una evaluación correspondiente de la muestra de referencia. Un cambio, por ejemplo, un cambio estadísticamente significativo, en la formación del complejo en la muestra o en el sujeto con relación a la muestra de control o el
30 sujeto puede ser indicativa de la presencia de MMP-14 en la muestra. En una realización, la proteína de enlazamiento a la MMP-14 no reacciona en forma cruzada con otra metaloproteinasa.

35 Las proteínas de enlazamiento a la MMP-14 también son útiles para formación de imágenes de tumores *in vivo*. Se necesitan mejores criterios clínicos de valoración para supervisar la eficacia de los fármacos, tal como los inhibidores de MMP, que están diseñados para bloquear la función enzimática (Zucker et al., 2001, Nature Medicine 7: 655 - 656). La formación de imágenes de tumores *in vivo* mediante el uso de proteínas marcadas de enlazamiento a la MMP-14 podría ser de ayuda para dirigir el suministro de la proteína de enlazamiento a los tumores para el diagnóstico del cáncer, la detección intraoperatoria de tumores, y para las investigaciones del suministro del fármaco y la fisiología del tumor. Se pueden usar proteínas de enlazamiento a la MMP-14 para hacer seguimiento a la actividad enzimática nativa *in vivo* en sitios invasivos. Otro método de ejemplo incluye: (i) la administración de la
40 proteína de enlazamiento a la MMP-14 a un sujeto; y (iii) detectar la ubicación de la proteína de enlazamiento a la MMP-14 en el sujeto. La detección puede incluir la determinación de la ubicación o el tiempo de formación del complejo.

45 La proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede ser marcada directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo enlazado o no enlazado. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos.

50 La formación de complejos entre la proteína de enlazamiento a la MMP-14 y MMP-14 puede ser detectada mediante la evaluación de la proteína de enlazamiento enlazada a la MMP-14 o proteína de enlazamiento no enlazada. Se pueden usar ensayos de detección convencionales, por ejemplo, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejidos. Además de la marcación de la proteína de enlazamiento a la MMP-14, se puede analizar la presencia de MMP-14 en una muestra mediante un inmunoensayo de competición utilizando estándares marcados con una sustancia detectable y una proteína de enlazamiento a la MMP-14 no marcado. En un ejemplo de este ensayo, se combinan la muestra biológica, los estándares marcados, y la proteína de enlazamiento a la MMP-14 y se determina la cantidad del patrón marcado enlazado a la proteína de enlazamiento no marcado. La cantidad de MMP-14 en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de
55 patrón marcado enlazado a la proteína de enlazamiento a la MMP-14.

Se pueden preparar proteínas marcadas con fluoróforo y cromóforo. Debido a que los anticuerpos y otras proteínas absorben luz que tiene longitudes de onda de hasta aproximadamente 310 nm, las fracciones fluorescentes deben seleccionarse para tener una absorción sustancial a longitudes de onda superiores a 310 nm y preferiblemente por encima de 400 nm. Se describen una variedad de agentes que fluorescen y de cromóforos adecuados por parte de Stryer, 1968, Science 162: 526 y Brand, L. et al., 1972, Annu. Rev. Biochem. 41: 843 - 868. Las proteínas pueden marcarse con grupos cromóforos fluorescentes mediante procedimientos convencionales tales como los descritos en las patentes de los Estados Unidos Nos. 3.940.475, 4.289.747, y 4.376.110. Un grupo de agentes que fluorescen que tienen varias de las propiedades deseables descritas anteriormente son los colorantes de xanteno, que incluyen las fluoresceínas y rodaminas. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilaminas. Una vez marcada con un fluoróforo o cromóforo, se puede usar la proteína para detectar la presencia o la localización de la MMP-14 en una muestra, por ejemplo, usando microscopía de fluorescencia (como la microscopía confocal o de deconvolución).

Análisis histológico. Se puede realizar la inmunohistoquímica utilizando las proteínas descritas en el presente documento. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, el anticuerpo se puede sintetizar con una etiqueta (como una etiqueta de purificación o de un epitopo), o puede ser marcado de manera detectable, por ejemplo, mediante la conjugación de una etiqueta o de un grupo de enlazamiento a la etiqueta. Por ejemplo, se puede unir un agente de quelación al anticuerpo. Se pone en contacto luego el anticuerpo con a una preparación histológica, por ejemplo, una sección fijada de tejido que está en un portaobjetos de microscopio. Después de incubación para el enlazamiento, se lava la preparación para eliminar el anticuerpo no enlazado. A continuación, se analiza la preparación, por ejemplo, mediante microscopía, para identificar si el anticuerpo se enlazó a la preparación.

Por supuesto, el anticuerpo (u otro polipéptido o péptido) pueden quedar sin marcar en el momento del enlazamiento. Después del enlazamiento y del lavado, se marca el anticuerpo con el fin de hacerlo detectable.

Matrices de proteínas. La proteína de enlazamiento a la MMP-14 también puede ser inmovilizada en una matriz de proteína. La matriz de proteína se puede utilizar como una herramienta de diagnóstico, por ejemplo, para cribar muestras médicas (tales como células aisladas, sangre, suero, biopsias, y similares). Por supuesto, la matriz de proteína también puede incluir otras proteínas de enlazamiento, por ejemplo, que se enlazan a la MMP-14 o a otras moléculas objetivo.

Los métodos para producir matrices de polipéptidos se describen, por ejemplo, en De Wildt et al., 2000, Nat. Biotechnol. 18: 989 - 994; Lueking et al., 1999, Anal. Biochem. 270: 103 - 111; Ge, 2000, Nucleic Acids Res. 28, e3, 1-VII; MacBeath y Schreiber, 2000, Science 289: 1760 - 1763; las publicaciones internacionales WO 01/40803 y WO 99 / 51773A1. Los polipéptidos para la matriz se pueden observar a gran velocidad, por ejemplo, usando aparatos robóticos comercialmente disponibles, por ejemplo, de Genetic MicroSystems o BioRobotics. El sustrato de la matriz puede ser, por ejemplo, nitrocelulosa, plástico, vidrio, por ejemplo, vidrio modificado en la superficie. La matriz también puede incluir una matriz porosa, por ejemplo, acrilamida, agarosa, u otro polímero.

Por ejemplo, la matriz puede ser una matriz de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en De Wildt, ver más arriba. Las células que producen las proteínas pueden ser cultivadas en un filtro en un formato organizado. Se induce la producción del polipéptido, y se inmovilizan los polipéptidos expresados en el filtro en la ubicación de la célula. Se puede poner en contacto una matriz de proteína con un objetivo marcado para determinar el grado de enlazamiento del objetivo con cada polipéptido inmovilizado. La información sobre el grado de enlazamiento en cada sentido de la matriz se puede almacenar como un perfil, por ejemplo, en una base de datos informática. La matriz de proteína puede ser producida en varias réplicas y se utilizan para comparar los perfiles de enlazamiento, por ejemplo, de un objetivo y un no objetivo.

FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia). La proteína de enlazamiento a la MMP-14 puede ser usada para marcar las células, por ejemplo, células en una muestra (por ejemplo, una muestra de un paciente). La proteína de enlazamiento también se une (o puede ser unida) a un compuesto fluorescente. Luego se pueden clasificar las células usando clasificador de células activado por fluorescencia (por ejemplo, utilizando un clasificador disponible a través de Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose CA, véase también las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.627.037; 5.030.002 y 5.137.809). Como las células pasan a través del clasificador, un haz de luz láser excita al compuesto fluorescente, mientras un detector cuenta las células que pasan a través suyo y determina si un compuesto fluorescente se une a la célula mediante la detección de fluorescencia. La cantidad de marcador enlazado a cada célula se puede cuantificar y analizar para caracterizar la muestra.

El clasificador también puede desviar la célula y separar las células enlazadas mediante la proteína de enlazamiento a partir de aquellas células que no estén enlazadas por la proteína de enlazamiento. Las células separadas pueden ser cultivadas y/o caracterizadas.

Formación de imágenes *in vivo*. También se presenta un método para detectar la presencia de una MMP-14 que expresa tejidos *in vivo*. El método incluye (i) administrar a un sujeto (por ejemplo, un paciente que tiene, por ejemplo, un cáncer (por ejemplo, cáncer metastásico, por ejemplo, cáncer metastásico de mama), una enfermedad

5 inflamatoria (por ejemplo, sinovitis, aterosclerosis), artritis reumatoide, osteoartritis, una afección ocular (por ejemplo, degeneración macular), diabetes, enfermedad de Alzheimer, isquemia cerebral, endometriosis, actividad invasiva de fibrina, angiogénesis, o la formación del tubo capilar) un anticuerpo anti-MMP-14, conjugado con un marcador detectable; (ii) exponer el sujeto a un medio para detectar dicho marcador detectable para los tejidos o células que expresan MMP-14. Por ejemplo, se forman imágenes del sujeto, por ejemplo, por medio de RMN u otro medio tomográfico.

10 Los ejemplos de marcadores útiles para el diagnóstico por formación de imágenes incluyen marcadores radiactivos tales como ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{125}I , ^3H , ^{14}C , y ^{188}Rh , marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, marcadores activados por resonancia magnética nuclear, isótopos emisores de positrones detectables mediante un escáner por tomografía de emisión de positrones ("PET"), quimioluminiscentes tales como luciferina y marcadores enzimáticos tales como peroxidasa o fosfatasa. También se pueden emplear emisores de radiación de corto alcance, tales como isótopos detectables por sondas detectoras de corto alcance. La proteína puede ser marcada con tales reactivos; por ejemplo, véase Wensel y Meares, 1983, Radioimmunoimaging and radioimmunotherapy, Elsevier, Nueva York para las técnicas relacionadas con la marcación radioactiva de anticuerpos y D. Colcher et al., 1986, Meth. Enzymol. 121: 802 - 816.

15 La proteína de enlazamiento puede ser marcada con un isótopo radioactivo (tal como ^{14}C , ^3H , ^{35}S , ^{125}I , ^{32}P , ^{131}I). Se puede usar una proteína de enlazamiento marcada en forma radioactiva para pruebas de diagnóstico, por ejemplo, un ensayo *in vitro*. La actividad específica de una proteína de enlazamiento marcada isotópicamente depende de la vida media, la pureza isotópica del marcador radiactivo, y cómo se incorpora el marcador en el anticuerpo.

20 En el caso de una proteína de enlazamiento marcada en forma radioactiva, se administra la proteína de enlazamiento al paciente, se localiza en células que portan el antígeno con el que reacciona la proteína de enlazamiento, y se detecta o se "forma una imagen" *in vivo* usando técnicas conocidas tales como barrido radionuclear usando, por ejemplo, una cámara gamma o tomografía de emisión. Véase, por ejemplo, A. R. Bradwell et al., «Developments in Antibody Imaging», Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwin et al., (Eds.), páginas 65 - 85 (Academic Press, 1985). Alternativamente, se puede utilizar un escáner de tomografía transaxial de emisión de positrones, tal como el denominado Pet VI situado en el Laboratorio Nacional Brookhaven, donde el marcador radiactivo emite positrones (por ejemplo, ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , y ^{13}N).

30 Agentes de contraste para IRM. La formación de imágenes de resonancia magnética (IRM) utiliza RMN para visualizar las características internas de un sujeto vivo, y es útil para el pronóstico, diagnóstico, tratamiento y cirugía. La IRM puede utilizarse sin compuestos trazadores radiactivos por un beneficio obvio. Algunas técnicas de IRM se resumen en el documento EP-A-0 502 814. Generalmente, las diferencias relacionadas con las constantes del tiempo de relajación T1 y T2 de los protones del agua en diferentes entornos se utilizan para generar una imagen. Sin embargo, estas diferencias pueden ser insuficientes para proporcionar imágenes nítidas de alta resolución.

35 Las diferencias en estas constantes de tiempo de relajación se pueden mejorar mediante agentes de contraste. Ejemplos de tales agentes de contraste incluyen una cantidad de agentes magnéticos, agentes paramagnéticos (que alteran principalmente a T1) y ferromagnéticos o superparamagnéticos o (que alteran principalmente la respuesta de T2). Los quelatos (por ejemplo, los quelatos EDTA, DTPA y NTA) pueden ser utilizados para la unión (y reducción de la toxicidad) de algunas sustancias paramagnéticas (por ejemplo, Fe^{+3} , Mn^{+2} , Gd^{+3}). Otros agentes pueden estar en forma de partículas, por ejemplo, de menos de 10 nm hasta aproximadamente 10 nm de diámetro). Las partículas pueden tener propiedades ferromagnéticas, antiferromagnéticas o superparamagnéticas. Las partículas pueden incluir, por ejemplo, magnetita (Fe_3O_4), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ferritas, y otros compuestos minerales magnéticos de elementos de transición. Las partículas magnéticas pueden incluir: uno o más cristales magnéticos con y sin material no magnético. El material no magnético puede incluir polímeros sintéticos o naturales (tales como sefarsa, dextrano, dextrina, almidón y similares).

45 La proteína de enlazamiento a la MMP-14 también puede marcarse con un grupo indicador que contiene el átomo ^{19}F activo en la RMN, o una pluralidad de dichos átomos en la medida en que (i) sustancialmente todos los átomos de flúor predominantes en la naturaleza sean el isótopo ^{19}F y, por lo tanto, sustancialmente todos los compuestos que contienen flúor son activos en la RMN; (ii) muchos compuestos polifluorados químicamente activos tales como anhídrido trifluoroacético están disponibles comercialmente a un costo relativamente bajo; y (iii) se han encontrado muchos compuestos fluorados médicamente aceptables para su uso en humanos tal como los poliéteres perfluorados utilizados para transportar oxígeno como sustitutos de la hemoglobina. Después de permitir dicho tiempo de incubación, se lleva a cabo una IRM de cuerpo entero usando un aparato tal como uno de los descritos por Pykett, 1982, Sci. Am. 246: 78 - 88 para localizar y tomar imágenes de los tejidos que expresan MMP-14.

Ejemplos

55 **Ejemplo 1:** Selección y cribado de los Fab e IgG anti-MMP-14

Se emplearon dos estrategias para identificar anticuerpos anti-MMP-14.

5 Estrategia I: Se agota un exceso de 100 veces de la biblioteca de FAB310 (por ejemplo, una cantidad de la biblioteca que debe contener 100 copias de cada miembro de la biblioteca) de anticuerpos de enlazamiento a estreptavidina mediante la incubación de la biblioteca con 200 μ L de perlas de estreptavidina durante 1 hora a temperatura ambiente (RT) con rotación. Se acoplaron 500 nM de MMP-14 biotinilada a perlas de estreptavidina mediante incubación con 100 μ L de perlas de estreptavidina. Se incubaron luego las perlas de MMP-14 con la biblioteca agotada en estreptavidina durante 1 hora a temperatura ambiente con rotación. Se enjuagaron luego las perlas tres veces con MTRIS al 2% / Tween al 0,1%, se transfirieron a un tubo nuevo y se lavaron otras tres veces con MTRIS al 2% / Tween al 0,1%, y se transfirieron a un tubo nuevo y se lavaron una última vez con la Ronda 1 de amortiguador Tris (TRIS 50 mM; CaCl_2 50 mM; NaCl 150 mM, pH 7,5).

15 Se eluyeron los anticuerpos que se enlazan a MMP-14 de las perlas mediante resuspensión en 1 mL de MTRIS al 2% que contiene TIMP-2 2,5 μ M y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con rotación. Se lavaron luego las perlas tres veces con MTRIS al 2% / Tween al 0,1%, se transfirieron a un tubo nuevo y se lavaron tres veces con TRIS / Tween al 0,1%, y se transfirieron a un tubo nuevo y se lavaron una última vez con TRIS. Se uso 1 ml del producido para la infección de 9 mL de bacterias TGL (cultivadas hasta una $\text{DO}_{600} = 0,5$). Se eluyeron adicionalmente las perlas por suspensión en 1 mL de TEA 100 mM durante 10 minutos. Se neutralizó el sobrenadante con 500 μ l de TRIS / HCl pH 7,5. Se uso 1 mL de la segunda elución para la infección de 9 mL de bacterias TG1 (cultivadas hasta una $\text{DO}_{600} = 0,5$).

20 Se llevaron a cabo las infecciones durante 30 minutos a 37°C en baño de agua, luego se amplificaron en un volumen total de 25 mL 2x TY/AG a 30°C durante la noche con agitación a 250 rpm.

Se llevaron a cabo dos rondas de selección adicionales bajo las mismas condiciones que la primera ronda, excepto porque se cargaron las perlas de estreptavidina con MMP-14 biotinilada 100 nM y se duplicó el número de lavados (6 veces con MTRIS al 2% / Tween al 0,1%, 6 veces con TRIS / Tween al 0,1% y 2 veces con TRIS), y se uso la Ronda 2/3 amortiguador Tris (TRIS 50 mM; CaCl_2 5 mM; NaCl 150 mM pH = 7,5) para la incubación y el lavado.

25 Estrategia II: Ronda 1 - estrategia II en bMMP-14 con agotamiento sobre el complejo perlas carboxílicas - TIMP-2-bMMP-14.

30 Se acopló TIMP-2 a perlas carboxílicas, a continuación, se acomplejaron con una combinación de MMP-14 biotinilada (500 nM cada uno). Se incubaron las perlas acomplejadas con un exceso de 100 veces de la biblioteca de FAB310 que había sido agotada previamente por incubación con perlas de estreptavidina y perlas carboxílicas. Se llevó a cabo la elución / lavado como para la Estrategia I.

Se llevaron a cabo dos rondas adicionales de selección, esencialmente como se describe para Estrategia I, excepto porque se usaron sólo 100 nM de cada MMP-14 en los complejos con perlas.

Precibado por ELISA de fagos

35 Se recubrieron placas de 384 pozos con BSA biotinilada (2 μ g / ml en TRIS 50 mM; CaCl_2 5 mM; NaCl 150 mM, pH 7,5), después se lavó 3 veces con TRIS 50 mM; CaCl_2 5 mM; NaCl 150 mM, pH 7,5; Tween al 0,1%. Se capturó la estreptavidina en las placas recubiertas por incubación con 10 μ g / ml de estreptavidina en TRIS 50 mM; CaCl_2 5 mM; NaCl 150 mM pH 7,5; gelatina al 0,5%, seguido de un lavado con TRIS 50 mM; CaCl_2 5 mM; NaCl 150 mM pH = 7,5; Tween al 0,1%. En el día que se iba a realizar el ensayo, se capturó MMP-14 biotinilada (1 μ g / ml) en TRIS 50 mM; CaCl_2 5 mM; NaCl 150 mM, pH 7,5.

40 Se recogieron 95 clones de cada Ronda 2 y Ronda 3 de cada estrategia de selección, produciendo 12 placas maestras. Se corrió un ELISA en la cubierta MiniTrak-5 de acuerdo con SOP.

Tabla 4: Fago en la preselección por ELISA de Fab

Ronda	Estrategia	Hitrato >3BG
M0003 - R2	I - elución con TIMP	61/95
M0004 - R2	I - elución con TEA	32/95
M0006 - R2	II	27/95
M0009 - R3	I - elución con TIMP	86/95
M0010 - R3	I - elución con TEA	73/95
M0012 - R3	II	63/95

Ejemplo 2: Secuencias de ADN de los Fab anti-MMP-14 de enlazamiento a la MMP-14

5 Se identificaron ejemplos de Fab que se enlazan a MMP-14 humana y se designaron como: M0030-A04, M0030-D08, M0031-A02, M0031-A04, M0031-C02, M0031-F01, M0031-H10, M0032-B07, M0032-B09, M0033-F02, M0033-H07, M0035-F02, M0036-D02, M0036-F02, M0036-H08, M0037-A08, M0037-B10, M0037-C03, M0037-C09, M0037-D01, M0037-H09, M0038-B06, M0038-C05, M0038-C06, M0038-D06, M0038-E05, M0038-E06, M0038-E12, M0038-F01, M0038-F08, M0038-H06, M0039-B07, M0039-D02, M0039-D10, M0039-G05, M0039-G07, M0039-H08, M0040-A03, M0040-A06, M0040-A08, M0040-A11, M0040-B06, M0040-B08, M0040-C10, M0040-D08, M0040-F03, M0040-G04, M0040-H04, M0040-H09, M0041-A05, M0041-B03, M0041-B11, M0041-C11, M0041-D03, M0041-D08, M0041-E11, M0041-H09, M0041-H11, M0042-B07, M0042-G12, M0043-A09, M0043-C03, M0043-F01, M0043-G01, M0043-G02, M0044-B03, M0044-D08, M0044-E01, and M0044-E05. Las secuencias de ADN de estas regiones variables de cadena ligera de Fab (LV) y las regiones variables de cadena pesada (HV) se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Secuencias de ADN de regiones variables de anticuerpos de enlazamiento a la MMP-14

15 > M0030-A04 LV
CAG AGC GAA TTG ACT CAG CCA CCC TCA GCG TCT GGG ACC CCC GGG
CAG AGG GTC ACT ATC TCT TGT TCT GGA AGC AGC TCC AAC ATC GGA

ATT AAT TTT GTT ACC TGG TAC CAG CAG CTC CCA GGA ACG GCC CCC
 AAA CTC CTC ATC TAT ACT AAT AAT CAG CGG CCC TCT GGG GTC CCT
 GAC CGA TTC TCT AGC TCC AAG TCT GGC GCC TCA GCC TCC CTG GCC
 ATC AGT GGG CTC CAG TCT GAG GAT GAG GCT GCT TAT TAC TGT GCA
 GCA TGG GAT GAC AAC CTG AAC GGT CCG GTG TTC GGC GGC GGG ACC
 AAG CTG ACC GTC CTA

> M0030-A04 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 GTT TAC GAG ATG AAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TAT TCT TCT GGT GGC CGT ACT GAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG GCC CAT TAC TAT GAT AGT
 AGT GGT CCG CCT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC
 TCA AGC

> M0030-D08 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATG ACT TGC CGG GCA GGT CAG AAC ATT
 AAA TCC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGG AAA GCC CCT
 CAG GTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC ACT TTA CAA AGT GGG GTC TCA
 TCA AGG TTC CGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA CAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC GAT CTG CAA CCT GGA GAT TCT GCG ACT TAC TAC TGT CAA
 CAA AGT TTC AGT ACC CCT CGC AGT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG
 GAG ATC AAA

> M0030-D08 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 ATT TAC CAG ATG TAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC GTT CCT TCT GGT GGC CTT ACT AAG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG AGA TTA CGA TAT TTT GAC
 TGG TCA GAT CGT GTG GGG GAA TCG GGT GAC TAC TGG GGC CAG GGA
 ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0031-A02 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC GTC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT
 AGC AGT TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAA CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA
 CAG AGT TAC AGT ATC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG
 GCG ATC AAA

> M0031-A02 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 AAT TAC TGG ATG CTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GGT ATC GTT TCT TCT GGT GGC CGT ACT AAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG TTT AGC AGC TCG TTA GGG GCT
 TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0031-A04 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCA TTG TCT
 CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT CTT
 AGG AAC AGC TAC TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT
 CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC
 CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC
 ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT
 CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCT CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC
 AAG CTG GAG ATC AAA

> M0031-A04 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 AAT TAC GTT ATG CTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC CGT CCT TCT GGT GGC CCT ACT AAG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGG GAC TGG CCC TCT TAC TAC TAC
 TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCA
 AGC

> M0031-C02 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC GTC ACC
 CCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC AGG TCT AGT CAG AGC CTC
 CTG CAT AGT AAT GGA TAC TAC TAT TTG GAT TGG TAC CTG CAG AAG
 CCA GGG CAG TCT CCA CAA CTC CTG ATC TAT TTG GGT TCT TAT CGG
 GCC TCC GGG GTC CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA
 GAT TTT ACA CTG AAA ATC AGC AGT GTG GAG GCT GAA GAT GTT GGG
 GTT TAT TAC TGC ATG CAA GCT CTA CAA ACT CCT CTC ACT TTC GGC
 GGA GGG ACC AGG GTG GAC ATC AAA

> M0031-C02 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CCT TAC CCT ATG GGT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC GTT TCT TCT GGT GGC CTT ACT CTT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACT GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGA CGG CTT TAC GAT ATT
 TTG ACT GGT CAA GGG GCC CCG TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC
 CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0031-F01 LV

CAG AGC GAA TTG ACT CAG CCA CCC TCA GTG TCT GGG ACC CCC GGG
 CAG AGG GTC ACC ATC TCT TGT TCT GGA ACC AGC GCC AAC ATC GGA
 CGT AAT GCT GTA CAC TGG TAC CAG CAG CTC CCA GGA ACG GCC CCC
 AAA CTC CTC ATT CAT AGT AAT AAC CGG CGG CCC TCA GGG GTC CCT
 GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC CTG GCC
 ATC AGT GGG CTC CAG TCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT GCA
 GCA TGG GAG AAC AGC CTG AAT GCC TTT TAT GTC TTC GGA ACT GGG
 ACC AAG GTC ACC GTC CTA

> M0031-F01 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 ACT TAC GAG ATG CAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TAT TCT TCT GGT GGC TGG ACT GGT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA TCT CAA CAG TAT TAC GAT TTT
 TCC TCT CGC TAC TAC GGC ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG

GTC ACC GTC TCA AGC

> M0031-H10 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT
 AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACC TAC TTC TGC CAA
 CAG AGT TAT AGT AAT CCT TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG
 GAT ATC AAA

> M0031-H10 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CAG TAC GTT ATG TGG TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC GTT CCT TCT GGT GGC GTT ACT AAG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AAA GAC GTC TTC GGT AGT ATT GGT
 TAT TAC TAC GTA CCG TTT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG
 GTC ACC GTC TCA AGC

> M0032-B07 LV

CAG AGC GTC TTG ACT CAG GAG CCC TCA TTG ACT GTG TCC CCA GGA
 GGG ACA GTC ACT CTC ACC TGT GCT TCC AAC ACT GGA GCA GTC ACC
 AGT GGT TCC TAT GCA AAC TGG TTC CAG CAA AAA CCT GGA CTA ACA
 CCC AGG GCA CTG ATT TAT AGT GGA ACT AAC AAA TAT TCG TGG ACC
 CCT GCC CGA TTC TCA GGC TCC CTC TTT GGG GGC AAG GCA GCC CTG
 ACA CTG TCA GGT GTG CTG CCT GAG GAC GAG GCT GAG TAT TAC TGC
 CTC GTC TAC TAT GGT GGT GTT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG
 CTG ACC GTC CTA

> M0032-B07 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CCT TAC CTT ATG CAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TAT CCT TCT GGT GGC ATT ACT CAG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA TTT TTC CCT AGT CAC AGG GAC
 TAT ACG GCG TTC GAC ACC TGG GGC CGG GGA ACC CTG GTC ACC GTC
 TCA AGC

> M0032-B09 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC GTG TCT GCA TCT
 GTT GGA GAC ACA GTC ACC ATC ACC TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT
 AGC ACC TGG TTA GCC TGG TAT CAG CAC AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAA CTC CTC ATA TAT GCT GGA CCC AGT TTG CAG AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAA TTC ACT CTC ACA
 ATC AGC AGC CTG CAC CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA
 CAA CTT AAT CAC TAC CCG ATG ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG
 GAG ATT AAA

> M0032-B09 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 ATT TAC AAG ATG GTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC GGT TCT TCT GGT GGC CAT ACT CGT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT

AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GCT CCT TAC TAC TAC TAC ATG
 GAC GTC TGG GGC AAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0033-F02 LV

CAG AGC GTC TTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA
 CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT
 GGT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAA CAC CCA GGC AAA GCC
 CCC AAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT AAT GGG CCC TCA GGG GTT
 TCT AAT CGC CTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG
 ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC
 AGC TCA TAT ACA AGC AGC AGC ACA GGT GTT CGG CGG AGG GAC CAA
 GCT GAC CGT CCT A

> M0033-F02 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CAG TAC GCT ATG AAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TGG ATC GTT TCT TCT GGT GGC TAT ACT CAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ATG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGC CTC GTA GCA GCT CGT AAA CTT
 GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0033-H07 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCG AGT CAG GGC ATT
 AGG AAT TTT TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GTT CCT
 AAG CTC CTG GTC TTT GGT GCA TCC GCT TTG CAA TCG GGG GTC CCA
 TCT CGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC GGC CTG CAG CCT GAG GAT GTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA
 AAG TAT AAC GGT GTC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG
 GAG ATC AAA

> M0033-H07 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 GTT TAC GGT ATG GTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GTT ATC TCT TCT TCT GGT GGC TCT ACT TGG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACC GCC TTG TAT TAC TGT GCG AGA CCG TTC AGT AGA AGA TAC GGC
 GTC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0035-F02 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT
 CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT
 AGC AAT TAC TTA GCC TGG TAC CAA CAA AAA CCT GGC CAG GCT CCC
 AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA
 GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG
 CAG CGT AGC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG
 GAG ATC AAA

> M0035-F02 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TTT TAC CGT ATG GAG TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC GTT CCT TCT GGT GGC TTT ACT CGT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT

AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA TTT CAC GTA TTA CGA TAT TTT
 GAC TGG TTT GGT AAC ACC CAG GAT ACT GAT GCT TTT GAT ATC TGG
 GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0036-D02 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT
 CCA GGG GAA AAA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG ACT GTT
 TAC AAC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAA AAA CCT GGC CAG GCT CCC
 AGG CTC CTC ATC TAT GAC GCA TTC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCT
 GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGC CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG
 CAG CGT GGC AAC TGG CCC CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG
 GAA ATC AAA

> M0036-D02 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TTT TAC AAG ATG ACT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GGT ATC TAT CCT TCT GGT GGC CGT ACT GTT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCA AGA GGG CCC CAT TAC TAT GAT AGC
 CCG GGT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC
 TCA AGC

> M0036-F02 LV

CAG TAC GAA TTG ACT CAG CCA CCC TCG TTG TCC GTG TCC CCA GGA
 CAG ACA GCC AGC ATC ACC TGC TCT GGA GAG AAA TTG GGG GAA AAA
 TTT GCT TCC TGG TAT CAA CGG AGG CCC GGC CAG TCT CCT CTA TTG
 ATC ATC TAT CAG GAT AAC AAG CGG CCC TCA GGG ATC CCT GAG CGG
 TTC TCT GGC TCC AAT TCT GGA AAC ACA GCC GCT CTG ACC ATC ACC
 GGG ACC CAG GCT ATG GAT GAC GCT GAC TAT TAC TGT CAG GCG TGG
 GAG AGC ACC ACA GCG GTC TTC GGC GGA GGG ACC AAG TTG ACC GTC
 CTA

> M0036-F02 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CGT TAC ACT ATG GGT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT CGT ATC TAT TCT TCT GGT GGC AAT ACT GTT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCA CGG ACC CGT AGA GAT GGC TAC AAC
 CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0036-H08 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT
 AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA
 CAG AGT TAC AGT CTC CCC GTG ACG TTT GGC CAA GGG TCC AAG GTG
 GAA ATC AAA CGA ACT

> M0036-H08 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CGT TAC TGG ATG GTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG

GAG TGG GTT TCT TAT ATC TAT TCT TCT GGT GGC ATG ACT GGT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA AGG GGG GGG GAA TAT AGT GGT TTC
 TTA GGG GTT TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0037-A08 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC GTG TCT GCT TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT GTT
 AGC AGT TAC TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAT GGT GCA TCC ACT TTG CAA AAT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCG ACT TAC CAT TGT CAA
 CAG GTT CAC AGT TTC CCT CCG ACG TTC GGT CAG GGG ACC AAG GTG
 GAA ATC AAA

> M0037-A08 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CAT TAC ATG ATG ATG TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GGT ATC TCT TCT TCT GGT GGC CGT ACT GGT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGT TTC GGG AAT AGT GGG AGC TAC
 TCT TGG CGT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC
 GTC TCA AGC

> M0037-B10 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTG GGA GAC AGA GTC GCC ATC ACT TGC CGC GCA AGT CAG AGC ATC
 GAC ACC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAA CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AAG TTG GAA GAC GGG GTC CCA
 TCA AGA TTC AGT GGC AGT GGA ACT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGA AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA AGT TAT TTC TGT CAA
 CAG AGC TAC TCT AGT CCA GGG ATC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAG
 GTG GAG ATC AAA

> M0037-B10 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 GTT TAC TAT ATG GGT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TAT ATC GGT TCT TCT GGT GGC TGG ACT GAG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAC CTC TCG GCA GTG GCT GGT
 CTA GGG GGT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC
 GTC TCA AGC

> M0037-C03 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC GTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT
 AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAT TGT CAA
 CAG GCT AAC AGT TTC CCC TTC GTA ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG
 CTG GAG ATC AAA

> M0037-C03 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT

GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 ATG TAC CTT ATG ATT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GTT ATC TCT TCT TCT GGT GGC CAG ACT AAA TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA ACC GAT TTG ACT GGT TAT TCA
 GCG GGA GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC
 TCA AGC

> M0037-C09 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC GTC ACC
 CTT GGA GAG TCG GCC TCC GTC TCC TGC AGG TCT AGT CAG AGC CTC
 CTT CAT GAA AAT GGA CAC AAC TAT TTG GAT TGG TAC CTG CAG AAG
 CCA GGG CAG TCT CCA CAG CTC CTG ATC TAT TTG GGT TCT AAT CGG
 GCC TCC GGG GTC CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA
 GAT TTT ACA CTG AAA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG
 GTT TAT TAC TGC ATG CAA TCT CTA AAG ACT CCT CCG ACG TTC GGC
 CCA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

> M0037-C09 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CAT TAC GAG ATG TTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TCT CCT TCT GGT GGC CAG ACT CAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACT GCC GTG TAT TAC TGT GCC ACA GAT CGG ACG TAT TAC GAT TTT
 TGG AGT GGT TAT GGG CCC CTG TGG TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG
 GTC ACC GTC TCA AGC

> M0037-D01 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTC GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT
 AGA AAT GAT TTA GGC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAG CGC CTG ATC TAT GTT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAA TTC ACT CTC ACA
 ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CTA
 CAG CAT AAT AGT TAC CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG
 GAA ATC AAA

> M0037-D01 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 ATG TAC ATG ATG ATT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TAT CCT TCT GGT GGC AAT ACT ATG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCC ACA GGT GTA TTA CGA TAT TTT GAC
 TGG GAT GCT GGG AGC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG
 GTC ACC GTC TCA AGC

> M0037-H09 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC GTC ACC
 CCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC AGG TCT AGT CAG AGC CTC
 CTG CAT GGT AAT GGA AAC AAC TAT TTG GAT TGG TAC CTG CAG AAG
 CCA GGG CAG TCT CCA CAA CTC CTG ATC TAT TTG GGT TCC AAT CGG
 GCC TCC GGG GTC CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA
 GAT TTT ACA CTG AAA ATC AGC AGT GTG GAG GCT GAA GAT GTT GGC
 GTT TAT TAC TGC ATG CAA GGT CTA CAA ACT CCT CAC ACT TTT GGC
 CAG GGG ACC CAG CTG GAG ATC AAA

> M0037-H09 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CGT TAC TGG ATG GAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC CGT TCT TCT GGT GGC ATG ACT GGT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA CAC CGT ACG GGC CGC GGG GCT
 TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0038-B06 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT
 AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC CGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC AGT CTC ACC
 ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA
 CAG ACT TAC AGT GGC CTT CCC ACT TTT GGT GGA GGG ACC GTG GTG
 GAG ATC AAA

> M0038-B06 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TCT TAC GTT ATG GGT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GTT ATC TCT CCT TCT GGT GGC TGG ACT ACT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCG AGT CGG GGA GTG GTT ACC AAC CTT
 GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0038-C05 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT
 AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAT TGT CAG
 CAG TAT GGT AGC TCA CCC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA
 ATC AAA

> M0038-C05 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TCT TAC ATT ATG GTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GTT ATC TAT CCT TCT GGT GGC CCT ACT TAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG GAC CCC CGG CTG GAA CGT TTC
 TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0038-C06 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT
 CCA GGG GAC AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT
 GGC AGC GAC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT
 CCC AGG CTC CTC ATC TTT GCT GCG TCC ACC AGG GCC ACC GGC ATC
 CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GCG ACA GAC TTC ACT CTC
 ACC ATC AGC AGC CTG GAA CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TTC TGT
 CAG CAG TAT GCT AGC CCA CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG
 GTG GAA ATC AAA

> M0038-C06 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 ATG TAC GGT ATG CAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TAT TCT TCT GGT GGC TAT ACT GGT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG GGG AGG GCC GTT GAC CTC TGG
 GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0038-D06 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT
 CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT
 AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC
 AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA
 GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG
 CAG CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG
 GAG ATT AAA

> M0038-D06 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TGG TAC TAT ATG GGT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TAT ATC GGT TCT TCT GGT GGC ATG ACT GGT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCG ATG GTG GGC TTC CTC CCG ACC GTT
 GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0038-E05 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCT GTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CCG GCG AGT CAG CAT ATT
 AGC AAC TGG CTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG GAG GCC CCT
 AAA CTC CTG ATC TCT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA
 CAG AGT TAC AGT ACC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG
 GAG ATC AAA

> M0038-E05 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CCT TAC CAT ATG ACT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TCT TCT TCT GGT GGC CAT ACT GAG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG ACA GCA TGG GCG GGA TTT ACT TTT
 AAC GTC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0038-E06 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCC TTG TCT
 CCA GGG GAC AGA GCC ACC CTC TCC TGC GGG GCC AGC CAG CTT GTT
 GTC AGC AAC TAC ATA GCC TGG TAC CAG CAA AAA CCT GGC CAG GCT
 CCC AGA CTC CTC ATG TAT GCT GGA TCC ATC AGG GCC ACT GGC ATC
 CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC
 ACC ATC AGC AGA CTA GAA CCT GAA GAT TTT GCA ATA TAT TAC TGT
 CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCT TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG
 GTG GAA ATC AAA

> M0038-E06 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CCT TAC GTT ATG CAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TCT CCT TCT GGT GGC TGG ACT TAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ATG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG ACT GGA GCC TAC GGT ATG
 GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0038-E12 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGC GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AAC ATT
 AAC AGT TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA AAA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAT GTT GCA TCC AAT TTG CAA AGG GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC GGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC ACC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TCC TGT CAG
 CAG ACT TAC AGT ACC CCC CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG
 GAG ATC AAA

> M0038-E12 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 AAG TAC TGG ATG ATG TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GTT ATC TAT CCT TCT GGT GGC ATT ACT TAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACT GCA GTC TAC TAT TGT GCG AGA CTA CCT TCT TGG GGG TTT GAT
 GCT CTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0038-F01 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TTT
 GTA GGA GAC AAA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGT GTT
 GGC ACC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA GCA GGG AAA GCC CCT
 GAG CTC CTG ATC TAT GCT ACA TCC AAT TTG CGA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AAC ACT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA
 CAG AGT TAC AGT ATC CCT CGG TTT ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA
 GTG GAT ATC AAA

> M0038-F01 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CTT TAC TCT ATG AAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TAT TCT TCT GGT GGC TCT ACT CTT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGT CGG GCT TTT GAT ATC TGG
 GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0038-F08 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT
 CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT
 AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT
 CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC
 CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC
 ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT
 CAG CAC TAT GGT GGC TCA CAG GCT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG
 GAG ATC AAA

> M0038-F08 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CGT TAC AAG ATG TGG TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GGT ATC CGT CCT TCT GGT GGC CTT ACT CGT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA CGC GGT GAC TAC GTC GGG GGG
 TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0038-H06 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT
 CCA GGG GAA GGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG ATT ATA
 AAT CCT TTT TAC GTA GCC TGG TAT CAA CAG AGA CCT GGC CAG GCT
 CCC AGG CTC CTC ATC TAT GCT TCA TCC AGG AGG GCC GGT GGC ATC
 CCA GAC AGA TTC AGT GGC AGT GCG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC
 ACA ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTC TAT TAC TGT
 CAA TAC TTT TAT AAC TCC ATG TGG ACG TTC GGC CAA GGG GCC AAG
 GTG GAG ATC AGA

> M0038-H06 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TGG TAC AAT ATG ACT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT CGT ATC TCT CCT TCT GGT GGC GAT ACT TTT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GCT GCG ATA GCA CCT CGT CCG
 TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCA
 AGC

> M0039-B07 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA CTC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCG AGT CAG GGC ATT
 AGC AAT TAT TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GTT CCT
 AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC ACT TTG CAA TCA GGG GTC CCA
 TCT CGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGT CTG CAG CCT GAA GAT GTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA
 AAG TAT AAC AGT GCC CGC CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG
 GAG ATC AAA

> M0039-B07 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CTT TAC CCT ATG CTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GGT ATC TCT CCT TCT GGT GGC CAG ACT TTT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA AGG ATG GCT TAT TAC TCT GGA TAC
 TTC GAT CTC TGG GGC CGT GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0039-D02 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT
 AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAC GAT GCA TCC AAT TTG GAA ACA GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGT GGA AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTT ACT TTC ACC
 ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT ATT GCA ACA TAT TAC TGT CAA
 CAG TTT GAT GAT CTC CCG CTC ACT TTC GCC GGA GGG ACG AAG GTG

GAG CTC AAA CGA ACT

> M0039-D02 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CTT TAC GTT ATG ATT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GGT ATC TAT TCT TCT GGT GGC GAT ACT TAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG GGG CAG CAG CTG GGG GGG GGT
 GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0039-D10 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GAC ACC GTG TCT TTC TCT
 CCA GGG GAA AGA GCC TCC CTC TCA TGC CGG GCC AGT CAG AGT GTC
 CGC AGC GAC TTA GCC TGG TAC CAA CAG AAG CCT GGC CAG GCT CCC
 AGG CTG CTC ATC TAT GGT GCA TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA
 GTC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG
 CAG TAT GGT AGC TCA CCC CTA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA
 GTG GAT ATC AAA

> M0039-D10 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 ATG TAC AAT ATG GCT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TGG ATC TAT TCT TCT GGT GGC CTT ACT TTG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAA GGC TCC AAT ACG TAC TAC TTT
 GAT GCT AGT GGC CTC GGT GCT TTT AAT ATG TGG GGC CAA GGG ACA
 ATG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0039-G05 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TTC CTG TCT GCA TCT
 ATA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCC AGT CAG GGC ATT
 AAC ACT TTT TTA GCC TGG TAT CAG CAA AAA CCA GGG ATA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC ACT CTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAA TTC ACT CTC ACA
 ATC AGC AGT CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAG
 CAG CTT AAT GGT TAC CGC AGC TTC GGA CAA GGG ACA CGA CTA GAG
 ATG AAA

> M0039-G05 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 AAT TAC GAG ATG GGT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TGG ATC TAT TCT TCT GGT GGC TAT ACT TCT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACA GCC ACG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CCG TAT TAC TAT GAT AGT
 AGT GGT TAT TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC ATG GAC GTC TGG GGC
 AAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0039-G07 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT
 CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT
 AAC AGC AGG TTC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT
 CCC AGG CTC CTC ATC TAT AGT ACA TCC ACC AGG GCC ACT GGC ATC
 CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCC GGG ACA GAC TTC ACT CTC

ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCG GTG TAT TAC TGT
 CAG CGA TAT GGT AGC TCA CCT ACG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC
 AAG GTG GAA ATC AAA

> M0039-G07 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CGT TAC GTT ATG GAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT CGT ATC TCT CCT TCT GGT GGC CAT ACT GAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCC AGA GAA ACG GTT CGG GGA GTT TAC
 TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0039-H08 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT GTG TCT
 CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT GAG AGT GTT
 AAA AAC AAC TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC
 AGG CTC CTC ATC TAT GGT GTT TCC ACC AGG GCC CCT GGT ATC CCA
 GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG
 CAG CGT AGC AAC TGG CCT CCG GTC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA
 CTG GAG ATT AAA

> M0039-H08 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 GCT TAC AAT ATG GGT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TCT TCT TCT GGT GGC TAT ACT GGT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CTT TAC AGG GGC TTT GAC
 TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0040-A03 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TTT GTG TCT GCA TCT
 GTC GGA GAC AGA GTC ACC ATC TCT TGT CGG GCG AGT CAC AAT ATT
 AAC ACC TGG TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAC CTC CTG ATC TAT TCT GCA TCC AAT TTG CAA GGT GGG GTC CCA
 TCT AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACT
 ATC AGC AGC CTG CAG CCT GGA GAT TTT GCG ACT TAC TAT TGT CAA
 CAG GCT AGC AGT TTC CCT ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG
 GAG ATT AAA

> M0040-A03 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 AAT TAC ATG ATG ATT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TGG ATC TCT CCT TCT GGT GGC TAT ACT TTT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGA TAT TAC GAT ATT TTG ACT
 GGT ATG GTG GGC GGC GGT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACC
 ACG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0040-A06 LV

CAG GAC ATC GTC ATG ACT CAA ACC CCT CCT AGT TTA CCG GTT AAC
 CCG GGT GAA CCT GCC TCC ATC TCC TGC AGG TCT AGT CAG AGC CTC
 CTG CAT AGA AAT GGA TAC AAC TAT TTG GAT TGG TAC CTG CAG AAG
 CCA GGG CAG TCT CCA CAG CTC CTG ATC CAT TTG GGT TCT TAT CGG

GCC TCC GGG GTC CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA
 GAT TTT ACA CTG AAA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG
 GTT TAT TAC TGC ATG CAA CCT CTA CAA ACT CCA TTC ACT TTC GGC
 CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

> M0040-A06 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TAT TAC GGT ATG TAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TCT TCT TCT GGT GGC TAT ACT GAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA AGG AGG ATT AAG TAT TAC GAT ATT
 GAA GGG GAA GGT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC
 ACC GTC TCA AGC

> M0040-A08 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC GTC ACC
 CCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC AGG TCT AGT CAG AGC CTC
 CTG CAT AGT AAT GGA TAC AAC TAT TTG GAT TGG TAC CTG CAG AAG
 CCA GGG CAG TCT CCA CAG CTC CTG ATC TAT TTG GGT TCT AAT CGG
 GCC TCC GGG GTC CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA
 GAT TTT ACA CTG AAA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG
 GTT TAT TAC TGC ATG CAA GCT CTA CAA CCT TTC ACT TTC GGC GGA
 GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

> M0040-A08 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 GCT TAC ATG ATG GGT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GGT ATC TCT TCT TCT GGT GGC CTT ACT TCT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA CCA GCG CTG ATT TAT TAT GAT
 AGT AGT GGC CCA AGT GAT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA
 ATG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0040-A11 LV

CAG AGC GCT TTG ACT CAG CCT CCC TCC GCG TCC GGG TCT CCT GGA
 CAG TCA GTC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT
 GCT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GAC AAA GCC
 CCC AAA CTC ATT ATT TAT AAT GTC AAT GAG CGG CCC TCA GGG GTC
 CCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG
 ACC GTC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT
 ACC TCA TAT GCA GGC AGC AAC AAA ATC GGG GTC TCC GGA ACT GGG
 ACC AAG GTC ACC GTC CTA

> M0040-A11 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CAT TAC GTT ATG TTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT CGT ATC GTT CCT TCT GGT GGC GCT ACT ATG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CGA CCG CTC TAT GAT AGT
 AGT GGT TAC GTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC
 TCA AGC

> M0040-B06 LV

CAG TAC GAA TTG ACT CAG CCA CCC TCA GCG TCT GGG ACC CCC GGG

CAG AGG GTC ACC ATC TCT TGT TCT GGA AGC AGC TCC AAC ATC GGA
 AGG AAT TAT GTA TAC TGG TAC CAG CAG GTC CCA GGA ACG GCC CCC
 AAA CTC CTC ATC TAT AGT AAT AAT CAG CGG CCC TCA GGG GTC CCT
 GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC CTG GTC
 ATC AGT GGG CTC CGG TCC GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT GCA
 GCA TGG GAT GCC AGC CTG CGT GGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG
 CTG ACC GTC CTA

> M0040-B06 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 GTT TAC CCT ATG GTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TAT ATC TCT CCT TCT GGT GGC TTT ACT TTT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTG CCC GGG GGC AGC AGA CAG
 GAT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0040-B08 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT
 AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA
 CAG AGT TAC AGT ACC CCT CGA ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG
 GAA ATC AAA

> M0040-B08 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TAT TAC AAT GAT ATG GCT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT
 TTG GAG TGG GTT TCT TCT ATC TCT CCT TCT GGT GGC AAG ACT GAG
 TAT GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC
 TCT AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG
 GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG AGT GGA AGC TAC ACT CAA
 CAT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0040-C10 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG ACC ATT
 AGC ACC TAT TTA AAT TGG TAT CAA CAC AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 GAG CTC CTG ATT TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC CGC
 ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA
 CAG AGT TAC ACT ACC CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG
 GAA ATC AAA

> M0040-C10 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CGT TAC ATG ATG GTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC GTT TCT TCT GGT GGC AAG ACT TGG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCC AGA TGG GAC TGG GGA CCT TTT GAC
 TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0040-D08 LV

CAG AGC GCT TTG ACT CAA TCA CCC TCT GCC TCT GCT TCA CTG GGA

TCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACT CTG GCC AGT GAG CAC AGT GGC
TAC ATC ATC GCA TGG CAT CAG CAG CAA CCA GGG AAG GCC CCT CGG
TTC TTG ATG AAA CTT GAC GGT ACT GGC AAC TTC AAC AAG GGC AGC
GGA GTT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TAC AGC TCT GGG GCT GAC CGC
TAC CTC ACC ATC TCC AAC CTC CAG TCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT
TAC TGT GAG ACC TGG GAC AGT ACC ACT CTT TGG GTG TTC GGC GGG
GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA

> M0040-D08 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
CAT TAC GGT ATG ACT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
GAG TGG GTT TCT TCT ATC GTT CCT TCT GGT GGC TAT ACT GCT TAT
GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
ACA GCC GTG TAT TAC TGT ACC ACA GGT CTC AGC AGC AGC GGT ACA
CGG TGG TTC GAC GCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA
AGC

> M0040-F03 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC GTC ACC
CCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC AGG TCT GGT CAG AGC CTC
CTG CAT AGT AAT GGA TAC AAC TAT TTG AAT TGG TAC CTG CAG AAG
CCA GGG CAG TCT CCA CAG CTC CTG ATC TAT TTG GGT TCT TAT CGG
GCC TCC GGG GTC CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA
GAT TTT ACA CTG AAA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG
CTT TAT TAC TGC ATG CAA GCT CTA CAA ACT CCT CTC ACT TTC GGC
GTA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

> M0040-F03 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
ATG TAC GTT ATG TCT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
GAG TGG GTT TCT TCT ATC TCT TCT TCT GGT GGC AAT ACT GGT TAT
GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AAG AGT TCG TTA TAT TAC GAT ATT
TTG GCT GGC CCT GGG TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC
ACC GTC TCA AGC

> M0040-G04 LV

CAG AGC GTC TTG ACT CAG CCA CCC TCA GCG TCT GGG ACC CCC GGG
CAG AGG GTC ACC ATC TCA TGT TCT GGA AGC AGG ACC AAC ATC GGA
AGT GAT TAT GTA TAT TGG TAC CAG CAA CTC CCA GGA ACG GCC CCC
AAA CTC CTC ATC TAT AGG AAT AAT GAG CGG CCC TCA GGG GTC CCT
GAC CGA TTC TCT GGC TTC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC CTG GCC
ATC AGT GGG CTC CGG TCC GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT GCA
TCA TGG GAT GAC AGG CTG AGT GGT CCG GTT TTC GGC GGA GGG ACC
AAG CTG ACC GTC CTA

> M0040-G04 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
CAG TAC CAT ATG CTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
GAG TGG GTT TCT GTT ATC GTT TCT TCT GGT GGC TTT ACT TTT TAT
GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA AGC TAC GGT GGA GAT GCT TTT
GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0040-H04 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT GTG TCT
 CTG GGC GAG AGG GCC ACC CTC AAC TGC AGG TCC AGC CAG AGT GTT
 TTA TAC AGC CCC AAC AAT AAG AAC TAC TTA GCT TGG TAC CAG CAG
 AAA GCA GGA CAG CCA CCT AAG CTG CTC ATT TAC TGG GCA TCT TTC
 CGG GAA TCC GGG GTC CCT GAG CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG
 ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG
 GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAA TAT CAT ACT CCT CCC TGG ACC TTC
 GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

> M0040-H04 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TCT TAC GAT ATG GTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TCT CCT TCT GGT GGC AAT ACT CAG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AAA GTG GCA GCT ATG GCC CCG TGG
 TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0040-H09 LV

CAG AGC GAA TTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA
 CAG GCA GTC ATC ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA ACC TAT
 TAT CCA AGC TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT ACA CTT
 CTC GTC TAT GGT AAA AAC AAG CGG CCC TCA GGG GTC CCA GAC CGA
 TTC TCT GGC TCC AGG TCA GGA GAC ACA GCT TCC TTG ATC ATC ACT
 GGG GCT CAG GCG GAA GAT GAC GCT GAC TAT TAT TGT AAC TCC CGG
 GAC GGC AGT GGT CAC CTT TTT GTC TTC GGA CCT GGG ACC ACC GTC
 ACC GTC CTC

> M0040-H09 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CTT TAC CCT ATG CAG TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TAT ATC CGT TCT TCT GGT GGC AAG ACT CAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTA GGA ATG GGC AGT GGC TGG
 TAC ACG GGG TAC TTC GAT CTC TGG GGC CGT GGC ACC CTG GTC ACC
 GTC TCA AGC

> M0041-A05 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AAC ATT
 AAC AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GTA ACT TAC TAC TGT CAA
 CAG AGT TAC AGT ACC CCT AAG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG
 GAA ATC AAA

> M0041-A05 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 GTT TAC ACT ATG CAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GTT ATC TAT CCT TCT GGT GGC CTT ACT ATT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA CGG AAT AGG GGT TAC TAT GCC CCT
 ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0041-B03 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC TCT TGC CGG GCC AGT CAG AAT ATT
 AGT AAT TGG TTG GCC TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGC AAA GCC CCT
 AAA CTC CTC ATC TAC ACT GCA TCC ACT TTG CAC CGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACT
 ATC ACC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAT TGT CAA
 CAG GCT AAC ACT TTC CCT TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG
 GAA ATC AAA

> M0041-B03 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 ATG TAC ATG ATG TGG TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GTT ATC TCT TCT TCT GGT GGC TTT ACT TCT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA CTA AGG TAC AGT AAT TTC GTA
 GGC GGT CTG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCA
 AGC

> M0041-B11 LV

CAG AGC GTC TTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA
 CAG ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT
 TCT GCA AGT TGG TAC CAG CGG AAG CCA GGA CAG GCC CCT TTA CTT
 GTC ATC TAT CGT AAA ACC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGG
 TTC TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT
 GGG GCT CAG GCG GAA GAT GAG TCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG
 GAC AGC AGT GGT AAC CAC CTA TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC
 GTC CTA

> M0041-B11 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CAG TAC TCT ATG CAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC GTT CCT TCT GGT GGC ATG ACT GCT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AAA ATT TCA CGG GGA AAT GAT GCT
 TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0041-C11 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 GTT GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG CGA ATT
 GGC AGC TAC TTG AAT TGG TAT CAG CAA AAT TCG GGA AAA GCC CCA
 AGG CTC CTG ATC TAT GGT GCA TCC AAT TTG GAA AGT GGG GTC CCT
 TCA AGG TTC AGT GGC CGT GGA TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCG ACT TAC TAC TGT CAA
 CAG AGT AAC AGT ACC CCT CAC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG
 GAA ATC AAA

> M0041-C11 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CAG TAC CCT ATG TCT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC GGT CCT GGT GGC TGG ACT TGG TAT GCT
 GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG
 AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACT
 GCA GTC TAC TAT TGT GCG AGG ACC GCT ACA CGG ATT TTT GGA GTG

GTT ATT ATG GGT CGC GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG
 GTC ACC GTC TCA AGC

> M0041-D03 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCA CTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA ATC ACC GTC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT
 ACC AAC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC ACT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTA TAT TAC TGT CAG
 CAG TAT GGT AGC TCA CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA
 GTC AAA

> M0041-D03 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TTT TAC AAT ATG ACT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TAT TCT TCT GGT GGC AAT ACT GAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCT AGA GAT TCC CTC TCC CAC TAC TAC
 TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCA
 AGC

> M0041-D08 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT
 CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT
 AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT
 CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC
 CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC
 ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT
 CAG CAG TAT GGT ACC TCA TCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG
 GAA ATC AAA

> M0041-D08 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TCT TAC CGT ATG TCT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GGT ATC TCT TCT TCT GGT GGC TTT ACT ATG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG GAT ATT TTG ACT GGT TAT TCC
 TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACG ACG GTC ACC GTC TCA
 AGC

> M0041-E11 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC CTG TCT GCA TTT
 GTA GGA GAC AGA GTC ATC ATC ACT TGC CGG GCA AGC CAG GAC ATT
 AGT GTT TAT GTA AAT TGG TAT CAG CAG AGC TCA GGC AAA GCC CCT
 AAA CTC CTA ATC TAT GGT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA AGT TAC TTC TGT CAA
 CAG AGT TAT AAT TTG CCT TTC ACC TTC GGC GGA GGA ACC AAC GTG
 CAG ATC AAA

> M0041-E11 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CAG TAC AAT ATG CAG TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GGT ATC GTT CCT TCT GGT GGC TGG ACT CCT TAT

GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA AGA GGG GTG CGC TAC GGG CTT GAC
 TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0041-H09 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT
 CCA GGG GAG AGA GCC ACC CTT TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT CTT
 AGC GGC GAC TAC TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA ATT GGC CAG GCT
 CCC AGG CTC CTC ATA TTT GGT GCA TCT AGG AGA CCC ACT GGC ATC
 CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC GCT CTC
 ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT
 CAG CAG TAT GGT AGT TTA ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGG CTG
 GAG ATT AAA

> M0041-H09 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 GTT TAC GAG ATG ACT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GGT ATC GGT TCT TCT GGT GGC ATG ACT TTT TAT
 GCC GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCC CGG ATA AGG TAT AGT GGG AGC TAT
 GGG TGG CAC TAC ATG GAC GTC TGG GGC AAA GGG ACC ACG GTC ACC
 GTC TCA AGC

> M0041-H11 LV

CAG AGC GAA TTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA
 CAG ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT
 TAT GCA AGC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT
 GTC ATC TAT GGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA
 TTC TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT
 GGG GCT CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG
 GAC AGC AGT GGT AAC CAT GTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG
 ACC GTC CTA

> M0041-H11 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 ATG TAC CCT ATG AAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TCT TCT TCT GGT GGC TGG ACT AAG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTT TTT TTC GGC TAT GAT AGT
 AGT GGT TAC CCT TAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA
 GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0042-B07 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCC GTC ACC
 CCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC TCC TGC AGG TCT AGT CAG AGC CTC
 CTA CAT AGT AAT GGA TAC AAC TAT TTG GAT TGG TAT GTG CAG AAG
 CCA GGA CAG TCT CCA CAG CTC CTG ATC TAT TTG GGT TCT GGT CGG
 GCC TCC GGG GTC CCT GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA
 GAT TTT ACA CTG AAA ATC AAC AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG
 GTT TAT TAC TGC ATG CAA GCT CTA CAA ACT CCG TGG ACG TTC GGC
 CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

> M0042-B07 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT

CCT TAC TCT ATG TTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GTT ATC TAT CCT TCT GGT GGC GGT ACT ATT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA AGT AGA GAG TCT TGT GAT GCT
 GAT ACT TGC TAC CAA TAT TTC CAG GAG TGG GGC CAG GGC ACC CTG
 GTC ACC GTC TCA AGC

> M0042-G12 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT
 CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT
 AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT
 CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC ATC AGG GCC ACT GGC ATC
 CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC
 ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT
 CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC
 AAG CTG GAG ATC AAA

> M0042-G12 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CAT TAC CCT ATG TTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GGT ATC TCT TCT TCT GGT GGC TAT ACT ATT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGA AGA CGA CAG ACG CGG
 CGT ACC AGC GAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG
 ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0043-A09 LV

CAG AGC GTC TTG ACT CAG CCA CCC TCG GTG TCC AAG GAC TTG AGA
 CAG ACC GCC ACA CTC ACC TGC ACT GGG AAC AGC AAC AAT GTT GGC
 TAC CAA GGA GCA GCT TGG CTG CAG CAG CAC CAG GGC CAC CCT CCC
 AAA GTC CTT TCG TAC AGG AAT AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC TCA
 GAG AGA TTT TCT GCG TCC AGG TCA GGA AAT ACA GCC TCC CTG ACC
 ATT ACT GGA CTC CAG CCT GAG GAC GAG GCT GAC TAT TAC TGC TCA
 GCG TGG GAC AGC AGC CTC ACT GCT TGG GTC TTC GGC GGA GGG ACC
 AAG CTG ACC GTC CTA

> M0043-A09 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TTT TAC GAT ATG ACT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TGG TCT TCT GGT GGC GTT ACT GAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACA GCC GTG TAT TAC TGT ACG AGA GCT AGT AGT GGT TAT TAT GAT
 GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0043-C03 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GCC TCC CTG TAT TTG TCT
 CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT
 AGC AGC AAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC
 AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC ACC AGG GCC ACT GGT ATC CCA
 GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAG TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGC CTG CAG TCT GCA GAT TTT GCC GTT TAT TAC TGT CAG
 CAG TAT GAT AAC TGG CCT CCC CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG
 GTG GAG ATC AAA

> M0043-C03 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TAT TAC GCT ATG GAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC GGT TCT TCT GGT GGC GAT ACT GTT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACA GCC ACG TAT TAC TGT GCG AGA GAC CCT CGG CAG CCC GGA GTC
 TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0043-F01 LV

CAG AGC GCT TTG ACT CAG CCT GCT TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA
 CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC ATT GGT
 GCT TAT AGG TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CGC CCA GGC AAA GCC
 CCC AAA CTC ATG ATT TTT GAT GTC ACT AAG CGG CCC TCA GGG GTT
 TCT AAT CGC TTC TCT GGT TTC AAG TCT GGC AAC ACG GCT TCC CTG
 ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCC GAT TAT TAC TGC
 AGC TCA TTT ACA AGT GGC AGC ACT TTC GTC TTC GGA ACT GGG ACC
 AAG GTC ACC GTC CTA

> M0043-F01 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 AAG TAC TCT ATG TAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TCT TCT TCT GGT GGC TAT ACT GCT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACT GCC GTG TAT TAC TGT GCG ATT CCT TGG GGT AGT GGG AGT TCC
 TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0043-G01 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT GCC ATG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT
 AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAT TGT CAA
 CAG GCT AAC AGT TTC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG
 GAG ATC AAA

> M0043-G01 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TTT TAC TCT ATG CAT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GGT ATC TCT TCT TCT GGT GGC GTT ACT AAG TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GCA CGG TCA ACT CGT GGC TTT
 GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0043-G02 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT
 CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT
 AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT
 CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC
 CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC
 ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT
 CAG TCG GGG GTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

> M0043-G02 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT

GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 TGG TAC CCT ATG TTT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT GGT ATC TAT TCT TCT GGT GGC CCT ACT GAT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA AAA GAT ACC CTA GGG AGG TAT TAC
 GAT TTT TGG AGT GGT TAT TCC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA
 GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0044-B03 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC GTG TCT GCA TCT
 GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT AGG GCG AGT CAG AAT ATT
 TAC AGT TGG TTA GCC TGG TAT CAG CAG AGA CCA GGG AAA GCC CCT
 AAG CTC CTG ATC TAC GCT GCA TCC AGT TTA CAT AGT GGG GTC CCA
 TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAT TGT CAA
 CAG GCT AAG AGT TTC CCT GTG ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG
 GAA ATC AAA

> M0044-B03 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 CAG TAC CAT ATG ATG TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC GGT TCT TCT GGC TAT ACT AAG TAT GCT
 GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT AAG
 AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC ACG
 GCC GTG TAT TAC TGT GCG GGA GCA GTG GCT GGT ACC GGG GCC TTT
 GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0044-D08 LV

CAG TAC GAA TTG ACT CAG CCA CTC TCA GTC TCA GTG GCC CTG GGA
 CAG ACG GCC AGT ATT TCC TGT TGG GGA CAT AAC ATT AGA ATT AAA
 AAT GTA CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC CAG GCC CCT GTG GTG
 GTC ATG TAT ATC CCT GAG CGG TTC TCT GGC TCC ACC TCG GGG AAC
 ACG GCC ACC CTG ACC ATC AGT GGA GCC CAA GCC GGG GAT GAG GCT
 GAC TAT TAT TGT CAA GTG TGG GAC AGC AGC ACT GTG GTG TTC GGC
 GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA

> M0044-D08 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
 GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
 AAG TAC CCT ATG TCT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
 GAG TGG GTT TCT TCT ATC TGG CCT TCT GGT GGC CAT ACT TTT TAT
 GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
 AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AAA AAT CCC GGG CTA CGG TAT GCT
 TTT GAT AAC TGG GGC CGA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0044-E01 LV

CAG TAC GAA TTG ACT CAG CCA CCC TCA ACG TCT GGG ACC CCC GGG
 CAG ACG GTC ACC ATC TCT TGT TCT GGA AGC ATC TCC AAC ATC GGA
 AGA AAT TCT GTA AAC TGG TAC CAG CAG CTC CCA GGA ACG GCC CCC
 AAA CTC CTC ATG TTT AGG AAT AAT GAG CGG CCC TCA GGG GTC CCT
 GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC ACC TCG GCC TCC CTG GCC
 ATC AGT GGG CTC CGG TCC GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT GCA
 GCA TGG GGT GAC AGC CTG AGT GGT TCT TAT GTC TTC GGA ACT GGG
 ACC AAG GTC ACC GTC CTA

> M0044-E01 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT

GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
TAT TAC GCT ATG GGT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
GAG TGG GTT TCT TAT ATC GTT CCT TCT GGT GGC GAG ACT CGT TAT
GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GGT TAT TAC GAT TTT TGG
AGT GGT TAT TGG TCC TAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC
CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCA AGC

> M0044-E05 LV

CAA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
GTG GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CCG GCA AGT CAG AGC ATT
AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAA AAA CCA GGG GAA GCC CCT
AAG CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC GCT TTG CAA AGT GGG GTC CCG
TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA CTT GGG ACA GTT TTC ACT CTC ACC
ATC ACC AGC CTG CAA CCT GAA GAT TCT GCA ACT TAC TAT TGT CAA
CAG AGT TAC AGT CCC CCG GTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG
GAT ATC AAA

> M0044-E05 HV

GAA GTT CAA TTG TTA GAG TCT GGT GGC GGT CTT GTT CAG CCT GGT
GGT TCT TTA CGT CTT TCT TGC GCT GCT TCC GGA TTC ACT TTC TCT
CGT TAC CCT ATG TCT TGG GTT CGC CAA GCT CCT GGT AAA GGT TTG
GAG TGG GTT TCT CGT ATC TCT TCT TCT GGT GGC TGG ACT CAG TAT
GCT GAC TCC GTT AAA GGT CGC TTC ACT ATC TCT AGA GAC AAC TCT
AAG AAT ACT CTC TAC TTG CAG ATG AAC AGC TTA AGG GCT GAG GAC
ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG GGT TCT AGT GGG AGC CGT
CGT GGT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCA AGC

Ejemplo 3: Secuencias de ADN de los Fab anti-MMP-14 que inhiben MMP-14

5 Los ejemplos de Fab que se enlazan e inhiben MMP-14 humana fueron identificados e incluyen: M0031-C02, M0031-F01, M0033-H07, M0037-C09, M0037-D01, M0038-E06, M0038-F01, M0038-F08, M0039-H08, M0040-A06, M0040-A11, y M0043-G02. Las secuencias de ADN de estos anticuerpos se muestran en la Tabla 5.

Ejemplo 4: Secuencias de aminoácidos de los Fab que se enlazan a MMP-14 que inhiben MMP-14

10 Las secuencias de aminoácidos de ejemplos de regiones variables de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) de Fab que se enlazan e inhiben a MMP-14 humana, la secuencia de ADN que se proporciona en el Ejemplo 3, se muestran en la Tabla 6. En la Tabla 6, se muestra la numeración estándar del dominio V de HC. La longitud de CDR3 de HC varía considerablemente. Por convención, la segunda cisteína se numera como 92 y el W del motivo
15 WG conservado de FR4 es el número 103. Si hay más de 9 residuos entre C92 y W103, los residuos después de 102 se numeran como 102a, 102b, etc. La Tabla 7 muestra las asignaciones de Vligera y Jligera de línea germinal (GL).

20 La Tabla 8 muestra las LC de los 12 Fab inhibitorios alineados con sus genes VJ de línea germinal. En la secuencia de la línea germinal, las regiones FR están en negrita. En las secuencias aisladas, se muestran en negrita las desviaciones de GL. La Tabla 9 muestra las desviaciones de GL como mutaciones a partir del aislado de GL, es decir, la mutación que se necesita para restablecer la secuencia de GL para el aislado. En una realización, las desviaciones de la línea germinal en las regiones FR se revierten a GL. Los residuos en o cerca de las uniones FR-
25 CDR pueden estar implicados en la interacción con el antígeno y por lo tanto es más probable que las reversiones de estos residuos afectan afinidad que es la reversión de los residuos lejos de las uniones.

30

Tabla 6: Secuencias de aminoácidos de los Fab que enlazan e inhiben a MMP-14 humana

1 M0031-C02 SC=SC-001 Ronda =SC-001-SR-003
 HC (SEQ ID NO: 144)
 1 5 0 5 0 5 0 5 0 5 0
 1 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS PYPMGWVRQA PGKGLEWVSS
 5 5 6 6 7 7 8 8 8 8 8 8 9 9
 1 a 5 0 5 0 5 0 2abc3 5 7 9 2 5
 51 IVSSGGLTLY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG
 1 1 1
 9 0 0 0 1
 7 2abcd efghi3 5 0
 101 RLYDILTGGG APFDYWGQGT LVTVSS

LC (SEQ ID NO: 145)
 1 QDIQMTQSPL SLPVTPGEP A SISCRSSQSL LHSNGY YYLD WYLQKPGQSP
 51 QLLIYLGSYR ASGVPDRFSG SSGSDFTLK ISSVEAEDVG VYYCMQALQT
 101 PLTFGGGTRV DIK

2 M0031-F01 SC=SC-001 Ronda =SC-001-SR-003
 HC (SEQ ID NO: 146)
 1 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYEMHWVRQA PGKGLEWVSS
 51 IYSSGGWTGY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARSQ
 101 QYDFSSRY Y GMDVWGQGT VTVSS
 LC (SEQ ID NO: 147)
 1 QSELTQPPSV SGTPGQRVTI SCSGTSANIG RNAVHWYQQL PGTAPKLLIH
 51 SNNRRPSGVP DRFSGSKSGT SASLAISGLQ SEDEADY YCA AWENSLNAFY
 101 VFGTGTKVTV L

3 M0033-H07 SC=SC-001 Ronda =SC-001-SR-003
 HC (SEQ ID NO: 148)
 1 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS VYGMVWVRQA PGKGLEWVSV
 51 ISSSGGSTWY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TALYYCARPF
 101 SRRYGVFDYW GQGLVTVSS
 LC (SEQ ID NO: 149)
 1 QDIQMTQSPS SLSASV GDRV TITCRASQGI RNFLAWYQOK PGKVPKLLVF
 51 GASALQSGVP SRFSGSGSGT DFTLTISGLQ PEDVATYYCQ KYNGVPLTFG
 101 GGTKVEIK

4 M0037-C09 SC=SC-001 Ronda =SC-001-SR-003
 HC (SEQ ID No: 150)
 1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYEMFWVRQA PGKGLEWVSS
 51 ISPSGGQTHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCATDR
 101 TYYDFWSGYG PLWYWGQGTL VTVSS
 LC (SEQ ID No: 151)
 1 QDIQMTQSPV SLPVTLGESA SVSCRSSQSL LHENGHNYLD WYLQKPGQSP
 51 QLLIYLGSNR ASGVPDRFSG SSGGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCMQSLKT
 101 PPTFGPGTKV EIK

 5 M0037-D01 SC=SC-001 Ronda =SC-001-SR-003
 HC (SEQ ID No: 152)
 1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS MYMMIWVRQA PGKGLEWVSS
 51 IYPSGGNTMY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCATGV
 101 LRYFDWDAGS GMDVWGQGT VTVSS
 LC (SEQ ID No: 153)
 1 QDIQMTQSPS SLSASVGDV TITCRASQGI RNDLGWYQQK PGKAPKRLIY
 51 VASSLQSGVP SRFSGSGSGT EFTLTISLQ PEDFATYYCL QHNSYPWTFG
 101 QGTKVEIK

 6 M0038-E06 SC=SC-001 Ronda =SC-001-SR-003
 HC (SEQ ID No: 154)
 1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS PYVMHWVRQA PGKGLEWVSS
 51 ISPSGGWTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED MAVYYCARGT
 101 GAYGMDVWGQ GTTVTVSS
 LC (SEQ ID No: 155)
 1 QDIQMTQSPG TSLSPGDRA TLSCGASQLV VSNYIAWYQQ KPGQAPRLLM
 51 YAGSIRATGI PDRFSGSGSG TDFTLTISRL EPEDFAIYYC QQRSNWPFWF
 101 GQGTKVEIK

 7 M0038-F01 SC=SC-001 Ronda =SC-001-SR-003
 HC (SEQ ID No: 156)
 1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS LYSMNWVRQA PGKGLEWVSS
 51 IYSSGGSTLY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
 101 AFDIWGQGT VTVSS
 LC (SEQ ID No: 157)
 1 QDIQMTQSPS SLSAFVGDV TITCRASQSV GTYLNWYQQK AGKAPELLIY
 51 ATSNLRSGVP SRFSGSGSGT DFTLTINTLQ PEDFATYYCQ QSYSIPRFTF
 101 GPGTKVDIK

 8 M0038-F08 SC=SC-001 Ronda =SC-001-SR-003
 HC (SEQ ID No: 158)
 1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYKMWWVRQA PGKGLEWVSG
 51 IRPSGGLTRY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARRG
 101 DYVGGFDYWG QGTLVTVSS
 LC (SEQ ID No: 159)
 1 QDIQMTQSPG TSLSPGERA TLSCRASQSV SSSYLAWYQQ KPGQAPRLLI
 51 YGASSRATGI PDRFSGSGSG TDFTLTISRL EPEDFAVYYC QHYGGSQAFG
 101 GGTKVEIK

 9 M0039-H08 SC=SC-001 Ronda =SC-001-SR-003
 HC (SEQ ID No: 160)
 1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS AYNMGWVRQA PGKGLEWVSS
 51 ISSSGGYTGY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL
 101 YRGFDYWGQ TLVTVSS

LC (SEQ ID NO: 161)

1 QDIQMTQSPA TLSVSPGERA TLSCRASESV KNNLAWYQOK PGQAPRLLIY
 51 GVSTRAPGIP ARFSGSGSGT DFTLTISSE PEDFAVYYCQ QRSNWPPVTF
 101 GQGTRLEIK

10 M0040-A06 SC=SC-001 Ronda =SC-001-SR-003
 HC (SEQ ID NO: 162)

1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS YGYMYWVRQA PGKGLEWVSS
 51 ISSSGGYTDY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARRI
 101 KYDIEGEGA FDIWGQGMV TVSS

LC (SEQ ID NO: 163)

1 QDIVMTQTPP SLPVNPGEPA SISCRESSQSL LHRNGYNYLD WYLQKPGQSP
 51 QLLIHLGSYR ASGVPDFRFSG SSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCMQPLQT
 101 PFTFGPGTKV DIK

11 M0040-A11 SC=SC-001 Ronda =SC-001-SR-003
 HC (SEQ ID NO: 164)

1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYVMFWVRQA PGKGLEWVSR
 51 IVPSSGATMY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR
 101 PLYDSSGYVD YWGQGLVTVV SS

LC (SEQ ID NO: 165)

1 QSALTQPPSA SGSPGQSVTI SCTGTSSDVG AYNVSWYQQ HPDKAPKLII
 51 YNVNERPSGV PDRFSGSKSG NTASLTVSGL QAEDDEADYYC TSYAGSNKIG
 101 VSGTGTKVTV L

12 M0043-G02 SC=SC-001 Ronda =SC-001-SR-003
 HC (SEQ ID NO: 166)

1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS WYPMFWVRQA PGKGLEWVSG
 51 IYSSGGPTDY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDT
 101 LGRYYDFWSG YSYGMDVWGQ GTTVTVSS

LC (SEQ ID NO: 167)

1 QDIQMTQSPG TSLSPGERA TLSCRASQSV SSSYLAWYQQ KPGQAPRLLI
 51 YGASSRATGI PDRFSGSGSG TDFTLTISRL EPEDFAVYYC QSGVTFGGGT
 101 KVEIK

Tabla 7: Tipos de las cadenas ligeras de los Fab inhibidores

	Aislado	J	Clase V
1	M0031-C02	JK4	VK-A3-VK2_8_A3
2	M0031-F01	JK1	VL1-16-VL_1C
3	M0033-H07	JK4	VK-A20-VK1_5_A20
4	M0037-C09	JK1	VK-A3-VK2_8_A3
5	M0037-D01	JK1	VK-A30-VK1_6_A30
6	M0038-E06	JK1	VK-A27-VK3_1_A27
7	M0038-F01	JK3	VK-02-VK1_2_02
8	M0038-F08	JK4	VK-A27-VK3_1_A27
9	M00310H08	JK5	VK-L6-VK3_5_L6
10	D20040-A06	JK3	VK-A3-VK2_8_A3
11	M0040-A11	JL1	VL2 2c
12	M0043-G02	JK4	VK-A27-VK3_1_A27

Tabla 8: Alineación de las LC de los Fab inhibidores con sus secuencias de línea germinal

CDR2	FR1	CDR1					FR2						
		1	1	2	2	2	3	3	3	3	4	4	5

5

1 5 0 5 0 3 5 01acdef2345 0 5 0
 VKIIA3-JK1 -
 DIVMTQSP~~LS~~LPVTPGEPASISCRSSQSL~~LH~~SNGYNYLDWYLQKPGQSPQ~~LLIY~~LGSNR
 M0037-C09
 QDIQMTQSP~~LS~~LPVTLGESASVSCRSSQSL~~LH~~ENGHNYLDWYLQKPGQSPQ~~LLIY~~LGSNR

	FR3					CDR3			FR4				
	5	5	6	6	7	7	8	8	8	9	9	1	1
	5	7	0	5	0	5	0	5	8	0	5	0	0

VKIIA3-JK1 ASGV~~PDR~~FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY~~Y~~CMQALQTPWTFGQGT~~KVEIK~~
 M0037-C09 ASGV~~PDR~~FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY~~Y~~CMQSLKTPPTFGPGTK~~VEIK~~

	FR1				CDR1			FR2									
CDR2					1	1	2	2	2	33	3333	4	4	5			
5																	
4	1	5	0	5	0	3	5	0	1	a	c	e	f	2	3	4	5

VKIIA3-JK4 -
 DIVMTQSP~~LS~~LPVTPGEPASISCRSSQSL~~LH~~SNGYNYLDWYLQKPGQSPQ~~LLIY~~LGSNR
 M0031-C02
 QDIQMTQSP~~LS~~LPVTPGEPASISCRSSQSL~~LH~~SNGY~~Y~~LDWYLQKPGQSPQ~~LLIY~~LGSYR

	FR3					CDR3			FR4				
	5	5	6	6	7	7	8	8	8	9	9	1	1
	5	7	0	5	0	5	0	5	8	0	5	0	0

VKIIA3-JK4 ASGV~~PDR~~FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY~~Y~~CMQALQTP~~LT~~FGGGT~~KVEIK~~
 M0031-C02 ASGV~~PDR~~FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY~~Y~~CMQALQTP~~LT~~FGGGT~~RVDIK~~

	FR1				CDR1			FR2									
CDR2					1	1	2	2	2	33	3333	4	4	5			
	1	5	0	5	0	3	5	0	1	a	c	e	f	2	3	4	5

VKIIA3-JK3 -
 DIVMTQSP~~LS~~LPVTPGEPASISCRSSQSL~~LH~~SNGYNYLDWYLQKPGQSPQ~~LLIY~~LGSNR
 M0040-A06
 QDIVMTQTPPSLPVNPGEPAISCRSSQSL~~LH~~RNGYNYLDWYLQKPGQSPQ~~LLIY~~LGSYR

	FR3					CDR3			FR4				
	5	5	6	6	7	7	8	8	8	9	9	1	1
	5	7	0	5	0	5	0	5	8	0	5	0	0

VKIIA3-JK3 ASGV~~PDR~~FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY~~Y~~CMQALQTP~~FT~~FGPGTK~~VDIK~~
 M0040-A06 ASGV~~PDR~~FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY~~Y~~CMQPLQTP~~FT~~FGPGTK~~VDIK~~

	FR1				CDR1			FR2			CDR2				
					1	1	2	2	2	3	3	4	4	5	5
	1	5	0	5	0	3	5	0	5	0	5	0	5	0	4

VK3L6-JK5 -EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
 M0039-H08 QDIQMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVKNNLAWYQQKPGQAPRLLIYGVSTR

	FR3					CDR3			FR4			
	5	6	6	7	7	8	8	9	9		1	1
	5	0	5	0	5	0	5	0	5	a	0	5

VK3L6-JK5 ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVY~~Y~~CQQRSNWP-ITFGQGT~~RLEIK~~

M0039-H08

APGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPVTFGQGRLEIK

	FR1				CDR1			FR2			CDR2	
		1	1	2	2 2	33	3	4	4	5	5	
	1	5	0	5	0 3 5	01a	5	0	5	0	4	

VKIIIA27-JK1
M0038-E06

-EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
QDIQMTQSPGTLSSLSPGDRATLSCGASQLVVSNIYAWYQQKPGQAPRLLMYAGSIR

	FR3					CDR3	FR4				
	5	6	6	7	7	8	8	9	9	1	1
	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5

VKIIIA27-JK1
M0038-E06

ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQSSPWTFGQGTKVEIK
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAIYYCQQRSNWPPVTFGQGTKVEIK

	FR1				CDR1			FR2			CDR2	
		1	1	2	2 2	33	3	4	4	5	5	
	1	5	0	5	0 3 5	01a	5	0	5	0	4	

VKIIIA27-JK4
M0038-F08
M0043-G02

-EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
QDIQMTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
QDIQMTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR

	FR3					CDR3	FR4				
	5	6	6	7	7	8	8	9	9	1	1
	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5

VKIIIA27-JK4
M0038-F08
M0043-G02

ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQSSPLTFGGGKVEIK
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGGSQA-FGGGKVEIK
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQS--GVT--FGGGKVEIK

	FR1				CDR1			FR2			CDR2	
		1	1	2	2 2	3	3	4	4	5	5	
	1	5	0	5	0 3 5	0	5	0	5	0	4	

VKIA20-JK4
M0033-H07

-DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASL
QDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGIKRNFLAWYQQKPGKVPKLLVFGASAL

	FR3					CDR3	FR4				
	5	6	6	7	7	8	8	9	9	1	1
	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5

VKIA20-JK4
M0033-H07

QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNAPLTFGGGKVEIK
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDVATYYCQKYNVPLTFGGGKVEIK

	FR1				CDR1			FR2			CDR2	
		1	1	2	2 2	3	3	4	4	5	5	
	1	5	0	5	0 3 5	0	5	0	5	0	4	

VKIA30-JK1
M0037-D01

-DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGIKRNLDLWYQQKPGKAPKRLIYAASL
QDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGIKRNLDLWYQQKPGKAPKRLIYVASSL

	FR3					CDR3	FR4				
	5	6	6	7	7	8	8	9	9	1	1
	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5

VKIA30-JK1
M0037-D01

QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLOHNSYPWTFGQGTKVEIK
QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLOHNSYPWTFGQGTKVEIK

FR1 CDR1 FR2 CDR2
 1 1 2 2 2 3 3 4 4 5 5
 1 5 0 5 0 3 5 0 5 0 5 0 4
VKIO2-JK3
M0038-F01
-DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSL
QDIQMTQSPSSLSAFVGDVITITCRASQSVGTYLNWYQQKAGKAPPELLIYATSNL

FR3 CDR3 FR4
 5 6 6 7 7 8 8 9 9 1 1
 5 0 5 0 5 0 5 0 5 0 0 5
VKIO2-JK3
M0038-F01
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP-FTFGPGTKVDIK
RSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINTLQPEDFATYYCQQSYSI PRFTFGPGTKVDIK

FR1 CDR1 FR2 CDR2
 1 1 2 2 2 33 3 3 4 4 5 5
 1 5 91 5 0 3 5 01ab2 5 0 5 0 4
VL1_1c-JL1
M0031-F01
QSVLTQPPSASGTPGQRTVITISCSGSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQR
QSELTQPPSVSGTPGQRTVITISCSGTSANIGRNAVHWYQQLPGTAPKLLIHSNNRR

FR3 CDR3 FR4
 5 6 6 7 7 8 8 9 9 9 1 1
 5 0 5 0 5 0 5 0 5abc6 0 5
VL1_1c-JL1
M0031-F01
PSGVPDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNG-YVFGTGTKVTVL
PSGVPDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWENSLNAPYVFGTGTKVTVL

FR1 CDR1 FR2 CDR2
 1 1 2 2 2 33 3 3 4 4 5 5
 1 5 91 5 0 3 5 01abc2 5 0 5 0 4
VL2_2c-JL1
M0040-A11
QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPKAPKLMYEVSKR
QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHPDKAPKLIYVNER

FR3 CDR3 FR4
 5 6 6 7 7 8 8 9 9 9 1 1
 5 0 5 0 5 0 5 0 5ab6 0 5
VL2_2c-JL1
M0040-A11
PSGVPDFRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNFYVFGTGTKVTVL
PSGVPDFRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCTSYAGSNKIGVSGTGTKVTVL

Tabla 9. Residuos que no son de línea germinal en los Fab inhibidores

5

Aislado	FR3 de HC	Los FR de LC	Las CDR de LC
M0031-C02		Q(-1)Δ, Q3V, S77R, R103K, D105E	Y31fN, Y53N
M0031-F01		E3V, V11A, H49Y	T26S, A28S, R31aS, A32T, H34N, R53Q, E92D, N93D, A95bG, F95cΔ
M0033-H07	V89L	Q(-1)Δ, V48I, F49Y, G77S	R30S, F32Y, G50A, A53T, G93S, V94A
M0037-C09		Q(-1)Δ, Q3V, L15P, S18P, V21I, P96W, P100Q	E31aS, H31eY, S91A, K93Q
M0037-D01		Q(-1)Δ	V50A
M0038-E06	T87M	Q(-1)Δ, D1E, Q3V, M4L, D17E, M48I, I85V	G24R, L28S, N31aS, I33L, A50G, G51A, I53S, R91Y, S92G, N93S, W94S
M0038-F01		Q(-1)A, F14S, K18R, A40P, E45K, N76S, T77S	V29I, G30S, T31S, T51 A, N53S, I94T, R96Δ
M0038-F08		Q(-1)Δ, D1E, Q3V, M4L	H90Q, Q95P, A96L, Δ97T
M0039-H08		Q(-1)Δ, D1E, Q3V, M4L, V13L, V96I	E27Q, K30S, N31S, N32Y, G50D, V51A, T53N, P56T, P95aΔ
M0040-A06		Q(-1)Δ, T7S, P9L, N14T, H49Y	R31 aS, Y53N, P91 A
M0040-A11		D41G, I47M, S98F	A31aG, N50E, N52K, T89S, K95aN, I95bF, G96Y,
M0043-G02		Q(-1)Δ, D1E, Q3V, M4L	S90Q, Δ91Y, Δ92G, Δ96L, Δ97T

Ejemplo 5. Valores de IC₅₀ para la inhibición de MMP-14 de las Fab e IgG que se enlazan a MMP-14

Los valores de IC₅₀ para la inhibición de MMP-14 (MMP-14 estaba en 2 µM) de los ejemplos de las Fab e IgG que se enlazan a MMP-14 se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Valores de IC₅₀

Nombre M	IC50 (nM) - Fab	IC50 (nM) - IgG
M0040-A06	8,6 ± 1,3	1,7 ± 0,6
M0040-A11	23,2 ± 2,4	6,7 ± 0,5
M0031-C02	56,0 ± 4,6	8,0 ± 1,1
M0037-C09	11,5 ± 1,9	4,2 ± 0,8
M0037-D01	4,3 ± 0,8	1,7 ± 0,3
M0038-E06	16,6 ± 1,2	7,2 ± 1,2
M0031-F01	25,3 ± 4,0	15,2 ± 4,2
M0038-F01	3,8 ± 0,3	2,0 ± 0,7
M0038-F08	31,1 ± 3,7	23,0 ± 9,7
M0043-G02	9,3 ± 1,1	0,3 ± 0,07
M0033-H07	11,5 ± 1,2	5,1 ± 1,7
M0039-H08	23,0 ± 2,8	7,4 ± 2,0

5

Ejemplo 6. Valores de K_i para la inhibición de MMP-14 por las IgG anti-MMP-14

Los valores de K_i para la inhibición de MMP-14 por ejemplos de las IgG se presentan en la Tabla 11. Se realizaron los estudios de K_i utilizando un ensayo enzimático en concentraciones del sustrato [Mca-Pro-Leu-Ala-Cys(Mob)-Trp-Ala-Arg-Dap(Dnp)-NH₂] de 10 M, 14 µM y 18 µM. Estas concentraciones fueron escogidas con base en el hallazgo de que la K_m para la reacción fue de 6 µM, y que la inhibición del sustrato se produjo con un sustrato de 15 - 20 µM. La concentración de MMP-14 fue de 2 nM.

10

Se seleccionaron 5 IgG para enlazamiento a MMP-14 IgG para los estudios de K_i: M0043-G02, M0037-D01, M037-C09, M0038-F01, M0033-H07. Los resultados con cada IgG se representan en la Figura 1(a) - 1(e), respectivamente. La K_i más alta medida para cada uno de estos anticuerpos se muestra en la Tabla 11.

15

Tabla 11. K_i de anticuerpos humanos que inhiben a la MMP-14

Aislado	K _i
M0043-G02	1,2 nM
M0037-D01	2,9 nM
M0037-C09	8,6 nM
M0038-F01	1,2 nM
M0033-H07	4,0 nM

Ejemplo 7. Reactividad cruzada de las IgG y Fab que se enlazan a MMP-14 contra otras MMP y TACE

Se examinó la reactividad cruzada de ejemplos de IgG y Fab anti-MMP-14 IgG y Fab con otras MMP y TACE humanas (enzima convertidora de TNF-alfa). Se hizo seguimiento a la actividad enzimática de MMP y TACE en ausencia y en presencia de anticuerpo IgG anti-MMP-14 1 µM. La inhibición (Y) de la actividad era de aproximadamente el 50 - 80% de la velocidad de reacción observada en ausencia de anticuerpo. "X" indica que no se observó inhibición. No se determinó la reactividad cruzada para la MMP-17 porque no se pudo detectar la actividad de la proteína.

20

25

Para los estudios resumidos en la Tabla 12, se seleccionaron seis IgG anti-MMP-14 IgG para ensayos de reactividad cruzada: M0043-G02, M0040-A06, M0037-D01, M037-C09, M0038-F01, M0033-H07. Los resultados se muestran en las Tablas 5-7.

Tabla 12. Reactividad cruzada de las IgG anti-MMP-14 con otras MMP y TACE

MMP	M0043-G02	M0040-A06	M0037-D01	M0037-C09	M0038-F01	M0033-H07
1	N	N	N	N	N	N
2	Y	Y	N	N	N	N
3	N	Y	N	N	N	N
7	N	Y	N	N	N	N
8	N	Y	N	N	N	N
9	Y	Y	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N	N
12	Y	Y	N	N	N	N
13	Y	Y	N	N	N	N
16	Y	Y	Y	Y	Y	Y
17	--	--	--	--	--	--
24	Y	Y	Y	Y	N	Y
TACE	N	N	N	N	N	N

Ejemplo 8. Reactividad cruzada de los Fab e IgG de enlazamiento a MMP-14 con MMP-16

- 5 Para los estudios resumidos en las Tablas 13 y 14, se incubaron Fab / IgG anti-MMP-14 100 nM con MMP16 5 nM durante 30 minutos a 30 °C, se añadieron 10 µM de sustrato, y se midió la actividad de MMP-16.

Tabla 13. Reactividad cruzada de Fab anti-hMMP-14 con MMP-16

Fab anti MMP-14	MMP-16
M0043-G02	Y 70 % de inhibición
M0039-H08	X
M0038-F08	X
M0031-C02	X
M0037-C09	X
M0037-D01	X
M0038-E06	X
M0038-F01	X
M0033-F01	X
M0040-A11	X
M0040-A06	X
M0033-H07	X
X: No inhibe MMP-16 con un nivel de [I] = 100 nM	

10

Tabla 14: Reactividad cruzada de IgG anti-hMMP-14 contra MMP-16

Anti MMP-14 IgG	MMP-16
M0043-G02	Y 94% de inhibición
M0039-H08	X
M0038-F08	X
M0031-C02	X
M0037-C09	X
M0037-D01	X
M0038-E06	X
M0038-F01	X
M0033-F01	X
M0040-A11	X
M0040-A06	X
M0033-H07	X
X: No inhibe MMP-16 con un nivel de [I] = 100 nM	

Ejemplo 9. Reactividad cruzada de los Fab que se enlazan a MMP-14 con MMP-16 y MMP-24

Para los estudios resumidos en la Tabla 15, se incubó 1 µM de Fab / IgG anti-MMP-14 (concentración final del inhibidor 100 nM) con 5 nM de MMP-16 o 5 nM de MMP-24 durante 30 minutos a 30 °C, se añadieron 10 µM de sustrato, y se midió la actividad de MMP-16.

Tabla 15: Reactividad cruzada de Fab anti-hMMP14 contra MMP-16 y MMP-24

5

Fab anti-MMP-14	MMP-16	MMP-24
M0043-G02	X	Y 74% de inhibición
M0039-H08	X	X
M0038-F08	X	X
M0031-C02	X	Y 54% de inhibición
M0037-C09	X	Y 72% de inhibición
M0037-D01	X	Y 71% de inhibición
M0038-E06	X	X
M0038-F01	X	X
M0033-F01	X	X
M0040-A11	X	Y 58% de inhibición
M0040-A06	X	Y 65% de inhibición
M0033-H07	X	X
X: No inhibe MMP-16 o MMP-24 con un nivel de [I] = 100 nM Y: inhibe parcialmente con un nivel de [I] = 100 nM		

Ejemplo 10: Enlazamiento de las IgG a MMP-14 IgG con células tumorales que expresan MMP-14

10 Se evaluó la capacidad de las doce IgG que se enlazan a MMP-14 biotinilada para enlazarse a células tumorales que expresan MMP-14 utilizando tanto inmunocitoquímica (ICC) como citometría de flujo. Las líneas celulares analizadas fueron células HT-1080 (un línea celular de fibrosarcoma humano), LNCaP (carcinoma de próstata humano), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama de humana caucásica), o PC3 (células de cáncer prostático humano). MMP-14 se expresa en células HT-1080 (Cancer Res (2005) 65 (23): 10959 - 69). MMP-14 se expresa en células PC-3 (Oncol Rep (2006) 15 (1): 199 - 206). LNCaP expresan MMP-14 (Endocrinology (2003) 144 (5): 1656 - 1663) a un nivel relativamente bajo. FGF-1 indujo significativamente la expresión de MMP-14 en células de carcinoma de próstata LNCaP (Prostate. (2004) 58 (1): 66 - 75). MMP-14 es expresada por células MDA-MB-231 (Int J Cancer (2005) 114 (4): 544 - 554).

15 Se cultivaron células (2 x 10⁵) en portaobjetos de cultivo de células en medio completo. En la confluencia, se lavaron las células con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se bloquearon las peroxidasas endógenas con peróxido de hidrógeno al 3% durante 20 minutos.

20 Se bloquearon los sitios de enlazamiento no específicos mediante incubación con suero humano al 10% inactivado por calor, suero normal de conejo al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron luego las células con proteínas de enlazamiento a MMP-14 biotinilada o no biotinilada a razón de 10 µg / ml durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadieron luego estreptavidina / HRP (1/200, donde las proteínas de enlazamiento a MMP-14 eran biotiniladas) o IgG / HRP anti humano (1/200, para proteínas de enlazamiento a MMP-14 no biotinilada) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se detectó el enlazamiento con el sustrato AEC+ (25 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad). Se secaron luego las láminas y se montaron utilizando medio de montaje Faramount.

Los resultados se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16: Enlazamiento de las IgG anti-MMP-14 a células tumorales que expresan MMP-14

30

	Coloración del anticuerpo
M0033-H07	+++
M0043-G02	-
M0038-F08	++ (solo positiva en inmunocitoquímica, ICC)
M0037-C09	-
M0038-F01	+++

(continuación)

	Coloración del anticuerpo
M0038-E06	-
M0031-C02	-
M0040-A06	-
M0037-D01	-
M0040-A11	-
M0039-H08	++
M0031-F01	+ (solo positiva en ICC)

Ejemplo 11: Inhibición de la activación de pro-MMP-2 por MMP-14 mediante las IgG de enlazamiento a la MMP-14

5 Se examinó la capacidad de las IgG anti-MMP-14 para inhibir la activación de pro-MMP-2 por MMP-14 mediante experimentos de zimograma en gelatina realizados con células HT-1080 activadas con PMA. Se analizaron M0033-H07 y M0038-F01 por su capacidad para inhibir la MMP-14 en este ensayo. Se sembraron células HT1080 (que se sabe bien que expresan MMP-14 y MMP-2) a razón de 5×10^5 células / pozo en el día 0. En el día 1, se cultivaron las células en un medio libre de suero en presencia ya sea de GM6001 (un inhibidor de metaloproteinasas de matriz basado en hidroxamato de amplio espectro) a $10 \mu\text{M}$, o un anticuerpo MMP-14 antihumano policlonal comercial (este anticuerpo se enlaza, pero no inhibe la MMP-14) a $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ (control negativo), o M0038-F01 a $10 \mu\text{g} / \text{ml}$, o M0033-H07 a $10 \mu\text{g} / \text{ml}$. Las células HT-1080 cultivadas en presencia de $20 \text{ ng} / \text{ml}$ de PMA se utilizaron como control positivo.

15 Después de 3 días de incubación, se recogieron los medios acondicionados y se analizaron las actividades gelatinolíticas mediante zimografía en gelatina como se describió previamente (Maquoi et al., J Biol Chem 2000; 275: 11368 - 78). Los resultados se muestran en la Figura 2. Cuando se activan las células HT-1080 con un éster de forbol, se activa pro-MMP-2 en MMP-2 (carril 1). En presencia de GM6001 ($10 \mu\text{M}$) (carril 2), se elimina completamente la activación de pro-MMP-2, pero la expresión de pro-MMP-9 es, paradójicamente, estimulada, como se describe en la Literatura (Maquoi E et al., 1999, Ann NY Acad Sci, 30 878: 744 - 6). Como era de esperar, el anticuerpo anti-MMP-14 policlonal comercial no afecta la expresión o activación de gelatinasas (carril 3). Curiosamente, M0038-F01 inhibe completamente la activación de pro-MMP-2 por MMP-14 (carril 4), mientras que M0033-H07 inhibe parcialmente la activación de pro-MMP-14 por MMP-14 (carril 5). No se observó estimulación de la expresión de pro-MMP-9 en ambas condiciones.

Ejemplo 12: Fijación de la línea germinal de M0038-F01 y M0033-H07

25 Las secuencias de M0038-F01 y M0033-H07 se compararon con la secuencia de la línea germinal humana y se modificaron siempre que fuera posible lograr identidad con la línea germinal. Las secuencias de los anticuerpos de la línea germinal, denominados línea germinal M0038-F01 y línea germinal M0033-H07 se muestran en la Tabla 17 (las porciones subrayadas indican la secuencia señal).

30 Se analizaron los anticuerpos de línea germinal para la afinidad de enlazamiento y la actividad inhibitora de MMP-14 en comparación con los anticuerpos originales.

35 Se analizó el enlazamiento de la línea germinal M0038F01 y la línea germinal 539C-M0033-H07 con MMP-14 humana biotinilada (bhMMP-14) en un formato de ELISA esencialmente como se describe en los ejemplos anteriores. Se probó la línea germinal 539C-M0038-F01 contra bhMMP-14 ambas directamente adsorbidas a la placa de ELISA y enlazadas a la placa a través de estreptavidina. Se probó la línea germinal 539C-M0033-H07 únicamente contra bhMMP-14 directamente adsorbida. Los resultados, mostrados en la Figura 3, indican que ambos anticuerpos de línea germinal retienen el enlazamiento a hMMP-14.

40 Se determinaron las IC50 para ambos anticuerpos de línea germinal, utilizando MMP-14 2 pM . Los resultados, mostrados en la Figura 4, demuestran que las IC50 de los anticuerpos de línea germinal (los paneles marcados "línea germinal") son similares a aquellas de los anticuerpos originales, y que 539C-M0038F01 de línea germinal tiene una IC50 mejorada en comparación con el anticuerpo original.

45 Se analizó la actividad inhibitora de los anticuerpos de línea germinal en el ensayo del zimograma de HT-1080. Los resultados se muestran en la Figura 5 (los carriles, de izquierda a derecha, son sin anticuerpo, anticuerpo 100 nM , anticuerpo 50 nM , anticuerpo 10 nM , anticuerpo 1 nM , y anticuerpo $0,1 \text{ nM}$). La proporción de pro-MMP-2: MMP-2 indica la actividad inhibitora de MMP-14 del anticuerpo (mayor proporciones indican una mayor actividad inhibitora).

Tabla 17: Secuencias de anticuerpos de línea germinal

> Cadena ligera de la línea germinal MMP-14-M0033H07

**MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNFLAWYQOKPGKVPKLLIYGA
SALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNQVPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

> Cadena pesada de la línea germinal MMP-14-M0033H07

**MGWSCIIILFLVATATGAHSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYGMVWVRQAPGKGLEWVSVI
SSSGGSTWYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARPFSRRYGVFDYWGQGLVTVSSA
STKGPVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK**

> Cadena ligera de la línea germinal MMP-14-M0038f01

**MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVGYTLNWXQOKPGKAPKLLIYAT
SNLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSIPTFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

> Cadena pesada de la línea germinal MMP-14-M0038f01

**MGWSCIIILFLVATATGAHSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLYSMNWVRQAPGKGLEWVSSI
YSSGGSTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGRAFDIWGQTMVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK**

Ejemplo 13: Inhibición de la formación del tubo mediante las IgG que se enlazan a MMP-14

- 5 Se sembraron células del endotelio vascular umbilical humano (las HUVEC) en placas de 96 pozos recubiertas con extracto de membrana basal MATRIGEL^{MR} a razón de 20.000 o 40.000 células en 100 µl / pozo. Se incubaron las células sembradas durante 30 minutos, a continuación se añadieron los diversos artículos de prueba (control del vehículo, M0038-F01 a concentraciones comprendidas desde 1 nM a 250 nM, o 8 mg / ml de suramina). Se incubaron las células a 37 °C durante 18 horas. Se añadieron 100 µl de solución de calceína (8 µCg / ml) 20 minutos antes de la captura de imágenes. Las fotomicrografías representativas se muestran en la Figura 6A. Se cuantificaron también las longitudes de los tubos. Las mediciones de la longitud del tubo se resumen en la Figura 6B. Dependiendo de la dosis de M0038-F01 se inhibe la formación del tubo en el rango de dosis probado.

Ejemplo 14: Inhibición del crecimiento del tumor MDA-MB-231 y metástasis mediante las IgG de enlazamiento a la MMP-14

- 15 Se inocularon las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 transfectadas con la proteína verde fluorescente (MDA-MB-231-GFP) en la almohadilla de grasa mamaria de ratones nu/un BALB / c con Matrigel. Se hizo seguimiento al crecimiento del tumor en los animales, y en la semana 4-5 después de la inoculación de las células tumorales, se seleccionaron los animales con tumores de 30 - 50 mm³, en forma aleatoria y se dividieron en grupos experimentales. Los animales fueron tratados solo con vehículo (control, n = 9), doxorubicina (DOX, 5 mg / kg, administrada semanalmente mediante inyección intraperitoneal (IP) durante 5 semanas, n = 9, aunque un animal murió durante el experimento, entre las semanas 5 y 6), el anticuerpo M0038-F01 de enlazamiento a la MMP-14 (10 mg / kg, administrada en días alternos (C2d, cada dos días) mediante inyección IP durante cinco semanas, n = 8), o un anticuerpo de control isotipo IgG específico para estreptavidina (A2, administrado a razón de 10 mg / kg, C2d por inyección IP durante cinco semanas, n = 8). Se midió semanalmente el volumen del tumor, a partir de las semanas 5. Adicionalmente, se tomaron muestras de tejido de pulmón, hígado y bazo para evaluar la metástasis.

Los resultados del volumen del tumor se resumen en la Figura 7. Los volúmenes de los tumores aumentaron rápidamente en los animales tratados ya sea con vehículo o con el control de isotipo (A2). El crecimiento tumoral se inhibió sustancialmente en los animales tratados ya sea con DOX o con M0038-F01.

Hubo una reducción estadísticamente significativa en la metástasis en pulmón y de hígado en los animales tratados con DOX o M0038-F01 en comparación con los controles. Se redujeron las metástasis en el bazo en animales tratados con DOX y M0038-F01, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa en este experimento.

5 Se realizó un experimento para examinar de rango de dosis para evaluar la respuesta a la dosis para el anticuerpo MMP-14 M0038-F01 que se enlaza a MMP-14. Los animales fueron inoculados con células MDA-MB-231-GFP como se describió anteriormente, luego se seleccionaron y dividieron aleatoriamente en grupos experimentales de 8 animales cada uno. Los animales fueron tratados solo con vehículo (control), DOX (5 mg / kg semanalmente mediante inyección IP durante 5 semanas), M0038-F01 (0,1, 1, o 10 mg / kg C2d mediante inyección IP durante 5 semanas), o el isotipo de control A2 de IgG (10 mg / kg C2d mediante inyección IP durante cinco semanas). Se midió semanalmente el volumen del tumor, a partir de las 5 semanas.

Los resultados del experimento del rango de dosis se resumen en la Figura 8. Al igual que en el experimento anterior, los volúmenes de los tumores aumentaron rápidamente en los animales tratados con vehículo o el control de isotipo (A2). El crecimiento del tumor se redujo en todos los animales tratados con M0038-F01, siendo 10 mg / kg la dosis más efectiva, seguida por las dosis de 1 mg / kg y 0,1 mg / kg.

15 Las muestras de tejido tumoral se recolectaron el día 35 después del tratamiento para el análisis inmunohistoquímico. Se seccionaron muestras de tejido embebidas en parafina, se tiñeron con CD31 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE.UU.), Ki-67 (Dako, Carpinteria, CA, EE.UU.), anticuerpos MAPK, FAK, fosfoMAPK o fosfoFAK, se visualizan con anticuerpos secundarios biotinilados utilizando VECTASTAIN® ABC (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.), y ligeramente teñidos con colorante de contraste usando hematoxilina.

20 Se cuantificó la inmunotinción mediante análisis de imágenes asistida por ordenador (Khalili et al., 2005, Oncogene, 24: 6657 - 66). Aunque se redujeron ligeramente los niveles de CD31 y Ki67 en los tumores tratados con doxorubicina en comparación tanto con vehículo como con los controles isotipo IgG (A2), los tumores tratados con M0038-F01 tuvieron reducciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tanto de CD31 como de Ki67. Estos datos se resumen en la Tabla 18. Los tumores tratados con M0038-F01 también tuvieron niveles significativamente reducidos de fosfo-MAP quinasa y fosfo-FAK ($2,4 \pm 0,7$ y $4 \pm 1,2$, respectivamente) en comparación con los controles ($7,4 \pm 0,7$; $6,9 \pm 0,9$ A.U.), pero los niveles totales de MAP quinasa y de FAK fueron esencialmente los mismos que en los tumores de control. El tratamiento con doxorubicina dio lugar a reducciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en los niveles de MAP quinasa total ($5,8 \pm 1,9$ A. U.) y FAK (6 ± 1 A. U.) así como de fosfo-MAP quinasa ($5,8 \pm 1,9$ A. U.) y de fosfo-FAK ($4 \pm 1,2$ A. U.).

Tabla 18

Tratamiento	CD31	Ki67
Vehículo	$5,2 \pm 0,75$	$6 \pm 1,38$
A2	$4,7 \pm 0,7$	$5,9 \pm 1,64$
DOX	$4,08 \pm 1,28$	$5,2 \pm 0,84$
M0038-F01	$2,0 \pm 0,6$	$2,4 \pm 1,2$

35 Se realizó un experimento de rango de dosis para examinar la respuesta a la dosis para el anticuerpo MMP-14 M0038-F01 que se enlaza a la MMP-14. Se inocularon los animales con células MDA-MB-231-GFP como se describió anteriormente, a continuación, luego se seleccionaron y dividieron en forma aleatoria en grupos experimentales de 8 animales cada uno. Los animales fueron tratados solo con vehículo (control), DOX (5 mg / kg semanalmente mediante inyección IP durante 5 semanas), M0038-F01 (0,1, 1, o 10 mg / kg C2d mediante inyección IP durante 5 semanas), o el control A2 del isotipo IgG (10 mg / kg C2d mediante inyección IP durante cinco semanas). Se midió el volumen del tumor semanalmente, a partir de las 5 semanas.

Los resultados del experimento de rango de dosis se resumen en la Figura 8. Al igual que en el experimento anterior, los volúmenes de los tumores aumentaron rápidamente en los animales tratados con vehículo o el control del isotipo (A2). El crecimiento del tumor se redujo en todos los animales tratados con M0038-F01, siendo la dosis de 10 mg / kg la más efectiva, seguida por la dosis de 1 mg / kg y la de 0,1 mg / kg.

45 **Ejemplo 15:** Inhibición del crecimiento del tumors de mama MDA-MB-435 por las IgG que se enlazan a la MMP-14

50 Se trasplantaron fragmentos de los tumores MDA-MB-435 GFP (células MDA-MB-435 que expresan la proteína fluorescente verde) mediante implantación quirúrgica ortotópica (SOI) en la segunda glándula mamaria derecha. El tratamiento se inició el día 15 después de SOI cuando el volumen de los tumores primarios alcanzó alrededor del 85 mm^3 . Los animales fueron tratados solo con vehículo (control, $n = 10$), taxotere (10 mg / kg, administrada cada semana x3, i.v., $n = 10$), anticuerpo M0038-F01 que se enlaza a la MMP-14 (0,1, 1, o 10 mg / kg, administrado en días alternos (C2d) mediante inyección IP durante cinco semanas, $n = 10$), o un anticuerpo de control del isotipo IgG

específico para estreptavidina (A2, administrado a razón de 10 mg / kg C2d mediante inyección IP durante cinco semanas, n = 10). El volumen del tumor se midió semanalmente, a partir de las 5 semanas.

5 Los ratones fueron sacrificados el día 61 después del comienzo del tratamiento y se identificaron los tumores (primario y metástasis) por formación de imágenes fluorescentes. Adicionalmente, se extirparon y pesaron los tumores primarios. Los resultados de los volúmenes de los tumores se resumen en la Figura 9. La administración de dosis de 1 o 10 mg / kg de M0038-F01 dio como resultado una reducción del volumen del tumor, al igual que la administración de taxotere. Los resultados de la masa tumoral se resumen en la Tabla 19 (los asteriscos indican valores que son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en comparación con el control). Los resultados de la masa tumoral fueron comparables con los datos del volumen del tumor. Sin embargo, M0038-F01 no fue efectivo en la reducción de los ganglios linfáticos o la metástasis del pulmón en este experimento.

Tabla 19

Grupo	Masa del tumor (\pm DE)
Control	1,44 \pm 0,85
A2	1,34 \pm 0,66
F01 0,1 mg/kg	1,54 \pm 0,91
F01 1 mg/kg	0,86 \pm 0,21*
F01 10 mg/kg	0,82 \pm 0,35*
Taxotere	0,59 \pm 0,59*

Ejemplo 16: Inhibición del crecimiento del tumor de melanoma B16 por anticuerpos que se enlazan a la MMP-14

15 Se implantaron células de melanoma B16F1 en ratones hembra C57 / BL6 (CR) (4-6 semanas de edad) mediante inyección subcutánea. Se hizo seguimiento al crecimiento del tumor en los animales y, el día 11 después de la implantación, los animales fueron seleccionados, en forma aleatoria y divididos en grupos experimentales. Los animales se trataron solo con vehículo (control, n = 8), doxorubicina (DOX, 5 mg / kg, administrada en forma semanal por medio de inyección intraperitoneal (IP), n = 8), anticuerpo M0038-F01 que se enlaza a la MMP-14 (10, 1 o 0,1 mg / kg, administrado en días alternos (C2d) por inyección IP, n = 8), o un anticuerpo de control del isotipo IgG específico para estreptavidina (A2, administrado a razón de 10 mg / kg C2d mediante inyección IP, n = 8).

Los resultados se resumen en la Figura 10A. Todas las dosis de M0038-F01 fueron efectivas para reducir el crecimiento del tumor en este modelo, como lo fue la doxorubicina.

25 Se analizaron también los anticuerpos que se enlazan a la MMP-14 en un modelo de metástasis de melanoma. Se cultivaron las células B16F1 en un cultivo, se recolectaron con una confluencia del 85% y se inocularon a razón de 5×10^5 células / ratón en 100 μ l de solución salina mediante inyección en la vena de la cola. El tratamiento comenzó el día 1, después de la inoculación, durante 14 días. Se trataron los animales solo con vehículo (control, n = 8), doxorubicina (DOX, 5 mg / kg, administrada en forma semanal por medio de inyección intraperitoneal (IP), n = 8), anticuerpo M0038-F01 que se enlaza a la MMP-14 (F01 10 mg / kg, administrado en días alternos (C2d) por inyección IP, n = 8), o un anticuerpo de control del isotipo IgG específico para estreptavidina (A2, administrado a razón de 10 mg / kg C2d mediante inyección IP, n = 8). El día 15, los animales fueron sacrificados y se recogieron los pulmones, se fijaron, y se analizaron por el número de metástasis (nódulos). Los resultados se resumen en la Figura 10B. El anticuerpo que se enlaza a la MMP-14 reduce sustancialmente el número de tumores de melanoma de pulmón en una forma dependiente de la dosis.

35 **Ejemplo 17:** Inhibición del crecimiento del tumor de próstata por anticuerpos que se enlazan a la MMP-14

40 Se implantaron células de cáncer de próstata PC3 en ratones macho sin pelo mediante inyección subcutánea. Se hizo seguimiento al crecimiento del tumor en los animales, y en la semana 3 después de la inoculación de las células tumorales, se seleccionaron los animales con tumores de 50 - 100 mm³, en forma aleatoria y se dividieron en grupos experimentales. Los animales se trataron solo con vehículo (control, n = 8), taxotere (10 mg / kg, administrado en forma semanal mediante inyección IP, n = 8), anticuerpo M0038-F01 que se enlaza a la MMP-14 (10, 1 o 0,1 mg / kg, administrado en días alternos (C2d) mediante inyección IP, n = 8), o un anticuerpo de control del isotipo IgG específico para estreptavidina (A2, administrado a razón de 10 mg / kg C2d, n = 8). Se midió semanalmente el volumen del tumor, a partir de las 3 semanas.

45 Los resultados del experimento del rango de dosis se resumen en la Figura 11. Al igual que en el experimento anterior, los volúmenes de los tumores aumentaron rápidamente en los animales tratados con vehículo o el control del isotipo (A2). El crecimiento del tumor se redujo en todos los animales tratados con M0038-F01, siendo la dosis de 10 mg / kg la más efectiva, seguida por la dosis de 1 mg / kg y la de 0,1 mg / kg. El taxotere fue extremadamente efectivo en este modelo.

Ejemplo 18: Inhibición del crecimiento del tumor de mama BT747 por los anticuerpos que se enlazan a la MMP-14

5 Se implantaron fragmentos (aproximadamente de 1 mm³) de tumor de cáncer de mama BT747 en los costados de ratones hembra SCID HRLN CB.17. Se dejó que los tumores crecieran hasta que alcanzaron un tamaño promedio de 80 - 120 mg, y luego se clasificaron los animales en seis grupos experimentales de diez animales cada uno: vehículo solo (Vehículo), trastuzumab (HERCEPTIN®, 20 mg / kg), anticuerpo M0038-F01 que se enlaza a la MMP-14 (10, 1 o 0,1 mg / kg, administrado en días alternos (C2d)) o un anticuerpo de control del isotipo IgG específico para estreptavidina (A2, 10 mg / kg C2d). Todos los grupos recibieron la dosis mediante inyección intraperitoneal (IP). El volumen del tumor se midió cada dos semanas.

10 Adicionalmente, se seleccionó un séptimo grupo de diez animales portadores de tumores grandes (288 mm³) para las pruebas con una terapia de combinación (M0038-F01, 10 mg / kg C2d, empezando el día 3 más trastuzumab, 20 mg / kg cada dos semanas, a partir del día 4).

15 Los datos de los grupos con tamaño tumoral inicial pequeño (es decir, un tamaño inicial del tumor de 80 - 120 mm³) mostraron una inhibición del crecimiento del tumor por el anticuerpo M0038-F01 que se enlaza a la MMP-14, con la dosis más alta que da como resultado la mayor inhibición del crecimiento del tumor. Trastuzumab inhibió el crecimiento del tumor en una medida similar a la de 10 mg / kg de M0038-F01. El efecto de la combinación del anticuerpo M0038-F01 que se enlaza a la MMP-14 y trastuzumab en tumores grandes no es claro, ya que había pocos animales disponibles con tumores grandes para servir como controles para este grupo, sin embargo se observó que la tasa de crecimiento de los tumores tratados con M0038-F01 y trastuzumab fue más baja que la tasa de crecimiento de los controles de tamaño similar (es decir, los controles del vehículo y A2). Los resultados se resumen gráficamente en la Figura 12.

Ejemplo 19: MMP-14 en modelos de ratón de artritis

La artritis inducida por antígeno, un modelo de artritis reumatoide, fue inducida mediante la inyección intraarticular de la pared celular de *Streptococcus* (SCW, 25 mg / 6 ml) en las articulaciones de rodilla de ratones C57B16 los días 0, 7, 14 y 21.

25 Se examinó la expresión de MMP14 en la artritis inducida por SCW en fase aguda (7 días después de la primera inyección de SCW) por tinción inmunohistoquímica utilizando M0038-F01. M0038-F01, pero no un control que coincida con el isotipo, células sinoviales fuertemente teñidas y condrocitos, así como los macrófagos en el exudado de las articulaciones.

30 Se clasificaron los ratones en grupos de seis animales cada uno y se trataron (mediante inyección IP) con M0038-F01 (2, 6 o 10 anillos / kg), un anticuerpo que coincide con el isotipo de control (control, 20 mg / ml), o etanercept, (ENBREL®, 5 mg / ml) en el día 13, 16, 20 y 23. Se midió la inflamación de las articulaciones (medida por la captación de tecnecio) en el día 15, 16, 22, 23 y 28. M0038-F01 no tuvo un efecto sobre la inflamación de las articulaciones en este experimento.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína aislada que comprende una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (HC) y una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina cadena ligera (LC), en donde las secuencias de dominio variable de inmunoglobulina de HC y LC forman un sitio de enlazamiento al antígeno que se enlaza a, e
- 5 inhibe una MMP-14; en donde la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende una región determinante de complementariedad de HC (CDR) 1, CDR2, y CDR3 y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de LC, y en donde las secuencias de dominio variable de inmunoglobulina comprenden lo siguiente
- 10 (i) la secuencia de CDR1 de HC comprende los residuos 31 - 35 de la SEQ ID NO: 156, la secuencia de CDR2 de HC comprende los residuos 50 - 66 de la SEQ ID NO: 156, y la secuencia de CDR3 de HC comprende los residuos 99 - 104 de la SEQ ID NO: 156; y la secuencia de CDR1 de LC comprende los residuos 25 - 35 de la SEQ ID NO: 157, la secuencia de CDR2 de LC comprende los residuos 51 - 57 de la SEQ ID NO: 157, y la secuencia de CDR3 de LC comprende los residuos 90 - 99 de la SEQ ID NO: 157;
- 15 (ii) la secuencia de CDR1 de HC comprende los residuos 31 - 35 de la SEQ ID NO: 144, la secuencia de CDR2 de HC comprende residuos 50 - 66 de la SEQ ID NO: 144, y la secuencia de CDR3 de HC comprende los residuos 99 - 115 de la SEQ ID NO: 144; y la secuencia de CDR1 de LC comprende los residuos 25 - 40 de la SEQ ID NO: 145, la secuencia de CDR2 de LC comprende los residuos 56 - 62 de la SEQ ID NO: 145, y la secuencia de CDR3 de LC comprende los residuos 95 - 103 de la SEQ ID NO: 145;
- 20 (iii) la secuencia de CDR1 de HC comprende los residuos 31 - 35 de la SEQ ID NO: 146, la secuencia de CDR2 de HC comprende los residuos 50 - 66 de la SEQ ID NO: 146, y la secuencia de CDR3 de HC comprende los residuos 99 - 114 de la SEQ ID NO: 146; la secuencia de CDR1 de LC comprende los residuos 23 - 35 de la SEQ ID NO: 147, la secuencia de CDR2 de LC comprende residuos 51 - 57 de la SEQ ID NO: 147, y la secuencia de CDR3 de LC comprende los residuos 90 - 101 de la SEQ ID NO: 147;
- 25 (iv) la secuencia de CDR1 de HC comprende los residuos 31 - 35 de la SEQ ID NO: 148, la secuencia de CDR2 de HC comprende residuos 50 - 66 de la SEQ ID NO: 148, y la secuencia de CDR3 de HC comprende los residuos 99 - 109 de la SEQ ID NO: 148; y la secuencia de CDR1 de LC comprende los residuos 25 - 35 de la SEQ ID NO: 149, la secuencia de CDR2 de LC comprende los residuos 51 - 57 de la SEQ ID NO: 149, y la secuencia de CDR3 de LC comprende los residuos 90 - 98 de la SEQ ID NO: 149;
- 30 (v) la secuencia de CDR1 de HC comprende los residuos 31 - 35 de la SEQ ID NO: 150, la secuencia de CDR2 de HC comprende residuos 50 - 66 de la SEQ ID NO: 150, y la secuencia de CDR3 de HC comprende los residuos 99 - 114 de la SEQ ID NO: 150; y la secuencia de CDR1 de LC comprende los residuos 25 - 40 de la SEQ ID NO: 151, la secuencia de CDR2 de LC comprende los residuos 56 - 62 de la SEQ ID NO: 151, y la secuencia de CDR3 de LC comprende los residuos 95 - 103 de la SEQ ID NO: 151;
- 35 (vi) la secuencia de CDR1 de HC comprende los residuos 31 - 35 de la SEQ ID NO: 152, la secuencia de CDR2 de HC comprende residuos 50 - 66 de la SEQ ID NO: 152, y la secuencia de CDR3 de HC comprende los residuos 99 - 114 de la SEQ ID NO: 152; y la secuencia de CDR1 de LC comprende los residuos 25 - 35 de la SEQ ID NO: 153, la secuencia de CDR2 de LC comprende los residuos 51 - 57 de la SEQ ID NO: 153, y la secuencia de CDR3 de LC comprende los residuos 90 - 98 de la SEQ ID NO: 153;
- 40 (vii) la secuencia de CDR1 de HC comprende los residuos 31 - 35 de la SEQ ID NO: 154, la secuencia de CDR2 de HC comprende residuos 50 - 66 de la SEQ ID NO: 154, y la secuencia de CDR3 de HC comprende los residuos 99 - 107 de la SEQ ID NO: 154; y la secuencia de CDR1 de LC comprende los residuos 25 - 36 de la SEQ ID NO: 155, la secuencia de CDR2 de LC comprende los residuos 52 - 58 de la SEQ ID NO: 155, y la secuencia de CDR3 de LC comprende los residuos 91 - 99 de la SEQ ID NO: 155;
- 45 (viii) la secuencia de CDR1 de HC comprende los residuos 31 - 35 de la SEQ ID NO: 158, la secuencia de CDR2 de HC comprende residuos 50 - 66 de la SEQ ID NO: 158, y la secuencia de CDR3 de HC comprende los residuos 99 - 108 de la SEQ ID NO: 158; y la secuencia de CDR1 de LC comprende los residuos 25 - 36 de la SEQ ID NO: 159, la secuencia de CDR2 de LC comprende los residuos 52 - 58 de la SEQ ID NO: 159, y la secuencia de CDR3 de LC comprende los residuos 91 - 98 de la SEQ ID NO: 159;
- 50 (ix) la secuencia de CDR1 de HC comprende los residuos 31 - 35 de la SEQ ID NO: 160, la secuencia de CDR2 de HC comprende residuos 50 - 66 de la SEQ ID NO: 160, y la secuencia de CDR3 de HC comprende los residuos 99 - 106 de la SEQ ID NO: 160; la secuencia de CDR1 de LC comprende los residuos 25 - 35 de la SEQ ID NO: 161, la secuencia de CDR2 de LC comprende residuos 51 - 57 de la SEQ ID NO: 161, y la secuencia de CDR3 de LC comprende los residuos 90 - 99 de la SEQ ID NO: 161;

- 5 (x) la secuencia de CDR1 de HC comprende los residuos 31 - 35 de la SEQ ID NO: 162, la secuencia de CDR2 de HC comprende residuos 50 - 66 de la SEQ ID NO: 162, y la secuencia de CDR3 de HC comprende los residuos 99 - 113 de la SEQ ID NO: 162; y la secuencia de CDR1 de LC comprende los residuos 25 - 40 de la SEQ ID NO: 163, la secuencia de CDR2 de LC comprende los residuos 56 - 62 de la SEQ ID NO: 163, y la secuencia de CDR3 de LC comprende los residuos 95 - 103 de la SEQ ID NO: 163;
- 10 (xi) la secuencia de CDR1 de HC comprende los residuos 31 - 35 de la SEQ ID NO: 164, la secuencia de CDR2 de HC comprende residuos 50 - 66 de la SEQ ID NO: 164, y la secuencia de CDR3 de HC comprende los residuos 99 - 111 de la SEQ ID NO: 164; y la secuencia de CDR1 de LC comprende los residuos 23 - 36 de la SEQ ID NO: 165, la secuencia de CDR2 de LC comprende los residuos 52 - 58 de la SEQ ID NO: 165, y la secuencia de CDR3 de LC comprende los residuos 91 - 101 de la SEQ ID NO: 165; o
- 15 (xii) la secuencia de CDR1 de HC comprende los residuos 31 - 35 de la SEQ ID NO: 166, la secuencia de CDR2 de HC comprende residuos 50 - 66 de la SEQ ID NO: 166, y la secuencia de CDR3 de HC comprende los residuos 99 - 117 de la SEQ ID NO: 166; y la secuencia de CDR1 de LC comprende los residuos 25 - 36 de la SEQ ID NO: 167, la secuencia de CDR2 de LC comprende los residuos 52 - 58 de la SEQ ID NO: 167, y la secuencia de CDR3 de LC comprende los residuos 91 - 95 de la SEQ ID NO: 167,
- 20 en donde la proteína aislada inhibe la actividad de MMP-14 con una IC₅₀ de menos de 25 nM, según se mide en un ensayo *in vitro* para la inhibición de la actividad MMP-14 cuando la MMP-14 es de 2 pM, y Mca-Pro-Leu-Ala-Cys (Mob)-Trp-Ala-Arg-Dap(Dnp)-NH₂ se utiliza como un sustrato.
- 20 2. La proteína aislada de la reivindicación 1, en donde la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende
- 25 (a) la secuencia de la SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 164, o SEQ ID NO: 166, o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 164, o SEQ ID NO: 166;
- (b) la secuencia de la SEQ ID NO: 156 o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 156, y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 157 o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 157;
- 30 (c) la secuencia de la SEQ ID NO: 144, o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 144, y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 145 o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 145;
- (d) la secuencia de la SEQ ID NO: 146, o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 146, y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 147 o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 147;
- 35 (e) la secuencia de la SEQ ID NO: 148, o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 148, y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 149 o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 149;
- 40 (f) la secuencia de la SEQ ID NO: 150, o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 150, y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 151 o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 151;
- (g) la secuencia de la SEQ ID NO: 152, o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 152, y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 153 o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 153;
- 45 (h) la secuencia de la SEQ ID NO: 154, o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 154, y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 155 o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 155;
- (i) la secuencia de la SEQ ID NO: 158, o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 158, y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 159 o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 159;

- (j) la secuencia de la SEQ ID NO: 160, o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 160, y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 161 o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 161;
- 5 (k) la secuencia de la SEQ ID NO: 162, o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 162, y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 163 o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 163;
- (l) la secuencia de la SEQ ID NO: 164, o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 164, y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 165 o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 165; o
- 10 (m) la secuencia de la SEQ ID NO: 166, o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 166, y la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 167 o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 167.
3. La proteína aislada de la reivindicación 1, en donde la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 163, o SEQ ID NO: 165 o la SEQ ID NO: 167, o una secuencia que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 163, o SEQ ID NO: 165 o la SEQ ID NO: 167.
- 15 4. La proteína de la reivindicación 1,
- 20 i) en donde la proteína se enlaza a la MMP-14 humana, en particular con una constante de disociación (K_D) de menos de 100 nM, o menos de 10 nM;
- ii) en donde la proteína inhibe la actividad de una MMP-14 humana con una IC50 de menos de 10 nM;
- iii) en donde la proteína se enlaza al dominio catalítico de MMP-14 humana;
- iv) en donde la proteína inhibe el enlazamiento a la MMP-14 con proMMP-2;
- 25 v) en donde la proteína inhibe la activación con MMP-14 de proMMP-2;
- vi) en donde la proteína se une a la MMP-16 o MMP-24;
- vii) en donde las secuencias de dominio variable de HC y LC son componentes de la misma cadena de polipéptido;
- viii) en donde las secuencias de dominio variable de HC y LC son componentes de diferentes cadenas de polipéptidos;
- 30 ix) en donde la proteína es una IgG;
- x) en donde la proteína es un fragmento Fab soluble;
- xi) en donde la proteína es un anticuerpo de primate o primatizado, o un anticuerpo humano o humanizado o no provoca una respuesta inmunogénica en un ser humano normal;
- xii) en donde la proteína comprende una región marco de un anticuerpo de primate o de humano;
- 35 xiii) en donde la proteína comprende un dominio Fc humano;
- xiv) en donde la proteína inhibe la activación con MMP-14 de pro-MMP-2 *in vitro* en células HT-1080 activadas con PMA;
- xv) en donde la proteína es capaz de enlazarse a células tumorales que expresan MMP-14; o
- 40 xvi) en donde la proteína es capaz de enlazar células tumorales que son células HT-1080, LNCaP, MDA-MB-231 o PC3.

5. La proteína de la reivindicación 1, en donde la proteína es un anticuerpo de primate que tiene una afinidad por MMP-14 que se **caracteriza por** una K_D de menos de 1,2 nM.
6. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 5 7. Un anticuerpo de MMP-14 para su uso en la detección de MMP-14 en una muestra, que comprende la proteína de la reivindicación 1 y una etiqueta detectable.
8. Un método *in vitro* de inhibición de la actividad de MMP-14, comprendiendo el método: poner en contacto una MMP-14 con la proteína de la reivindicación 1, inhibiendo así la actividad de la MMP 14.
- 10 9. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en la detección de MMP 14 en un sujeto, en donde se formula la proteína para administración al sujeto
- i) en donde la proteína comprende un marcador detectable, y
- ii) en donde la detección comprende la formación de imágenes del sujeto.
10. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un método para tratar el cáncer, en donde se formula la proteína para administración a un sujeto en una cantidad suficiente para tratar un cáncer en el sujeto, y
- 15 opcionalmente, el cáncer es cáncer de cabeza y cuello, cáncer de la cavidad oral, cáncer de laringe, condrosarcoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, carcinoma de testículo, melanoma, un tumor o tumores cerebrales.
11. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un tumor metastásico en un sujeto, en donde se formula la proteína para administración al sujeto, en una cantidad suficiente para modular la actividad metastásica, en donde la proteína inhibe uno o más de: el crecimiento del tumor, embolismo del tumor, movilidad del tumor, invasividad del tumor, y proliferación celular del cáncer.
- 20 12. La proteína para uso de la reivindicación 10 u 11, donde la proteína es para uso con una segunda terapia que es un terapia contra el cáncer, y opcionalmente la segunda terapia comprende
- i) un agente quimioterapéutico;
- ii) un agente que antagoniza la señalización a través de una ruta de VEGF;
- 25 iii) bevacizumab;
- iv) 5-FU, leucovorina o irinotecano;
- v) un inhibidor de Tie1;
- vi) un inhibidor de plasmina; o
- vii) un inhibidor de plasmina que comprende un dominio de Kunitz.
- 30 13. La proteína para uso de la reivindicación 10 u 11, donde la proteína es para uso con una segunda terapia que es un terapia contra el cáncer, en donde la terapia contra el cáncer se selecciona a partir de
- i) agentes antitubulina / antimicrotubulo, preferiblemente seleccionados a partir de paclitaxel, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, taxotere;
- ii) inhibidores de topoisomerasa, preferiblemente inhibidores de topoisomerasa I, más preferiblemente seleccionados
- 35 a partir de irinotecano, topotecano, camptotecina, doxorubicina, etopósido, mitoxantrona, daunorubicina, idarrubicina, tenipósido, amsacrina, epirubicina, merbarona, clorhidrato de piroxantrona;
- iii) antimetabolitos, preferiblemente seleccionados a partir de 5 fluorouracilo (5 FU), metotrexato, 6-mercaptopurina, 6- tioguanina, fosfato de fludarabina, citarabina / Ara C, trimetrexato, gemcitabina, acivicina, alanosina, pirazofurina, N-fosforacetil-L-aspartato = PALA, pentostatina, 5 azacitidina, 5 Aza 2' desoxicitidina, ara A, cladribina, 5
- 40 fluorouridina, FUDR, tiazofurina, N-[5-[N-(3,4-dihidro-2-metil-4-oxoquinazolin-6-ilmetil)-N-metilamino]-2-tenoil]-ácido L-glutámico;

iv) agentes alquilantes, o agentes de intercalación, preferiblemente seleccionados a partir de cisplatino, carboplatino, mitomicina C, BCNU = Carmustina, melfalán, tiotepa, busulfán, clorambucil, plicamicina, dacarbazina, fosfato de ifosfamida, ciclofosfamida, mostaza de nitrógeno, mostaza de uracilo, pipobromán, 4 ipomeanol;

v) agentes que producen apoptosis, preferiblemente en donde el agente apoptótico es actinomicina D;

5 vi) radiación;

vii) anticuerpos contra antígenos asociados a tumores, seleccionados preferiblemente a partir de anticuerpos desnudos, inmunotoxinas, y radioconjugados;

viii) agentes seleccionados del grupo que consiste de interferón, dihidrolenperona, espiromustina, y desipeptido; y

10 ix) anti-hormonas, preferentemente seleccionadas a partir de antiestrógenos y antiandrógenos, más preferiblemente seleccionadas a partir de tamoxifeno, y 4'-ciano-3-(4-fluorofenilsulfonil)-2-hidroxi-2-metil-3'-(trifluorometil) propionanilida.

14. La proteína de la reivindicación 1 para su uso en

i) el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, en donde se formula la proteína para administración a un sujeto en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad inflamatoria;

15 ii) el tratamiento de una enfermedad de la córnea seleccionada del grupo que consiste de infección corneal y queratocono, en donde se formula la proteína para administración a un sujeto en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad de la córnea seleccionada del grupo que consiste de infección corneal y queratocono;

iii) el tratamiento de la artritis reumatoide, en donde se formula la proteína para administración a un sujeto en una cantidad suficiente para tratar la artritis reumatoide;

20 iv) el tratamiento de la osteoartritis, en donde se formula la proteína para administración a un sujeto en una cantidad suficiente para el tratamiento de la osteoartritis;

v) el tratamiento de la diabetes, en donde se formula la proteína para administración a un sujeto en una cantidad suficiente para tratar la diabetes; o

25 vi) el tratamiento de un tumor, en donde se formula la proteína para administración a un sujeto en una cantidad suficiente para tratar el tumor.

15. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en la formación de imágenes de un sujeto, en donde la proteína se asocia físicamente con un marcador detectable, y opcionalmente el sujeto tiene o se sospecha que tiene un tumor.

30 16. La proteína para uso de la reivindicación 10, 11 o 14, en donde la proteína de la reivindicación 1 se administra en combinación con uno o más inhibidores de MMP, y opcionalmente

i) los uno o más inhibidores de MMP son inhibidores de molécula pequeña,

ii) los uno o más inhibidores de MMP son uno o más de neovastat, marmastat, BAY 12-9566, o prinomastat; o

iii) los uno o más inhibidores de MMP incluyen una segunda proteína de enlace a la MMP 14 de la reivindicación 1.

35 17. La proteína de la reivindicación 1 para su uso en

i) el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, en donde se formula la proteína para administración a un sujeto en combinación con una segunda terapia que es una terapia antiinflamatoria;

40 ii) el tratamiento de artritis reumatoide, en donde se formula la proteína para administración a un sujeto en combinación con una segunda terapia que comprende uno o más de los siguientes agentes: aspirina, naproxeno, ibuprofeno, etodolac, cortisona, un antiácido, sucralfato, inhibidores de la bomba de protones, misoprostol, oro, metotrexato, sulfasalazina, D-penicilamina, azatioprina, ciclofosfamida, clorambucil, ciclosporina, leflunomida, etanercept, infliximab, anakinra, adalimumab, o hidroxicloquina;

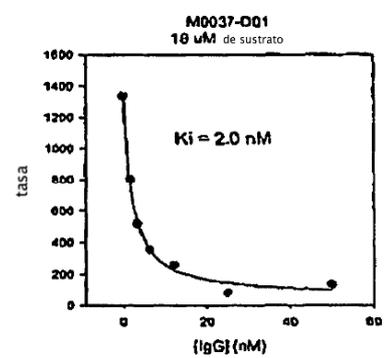
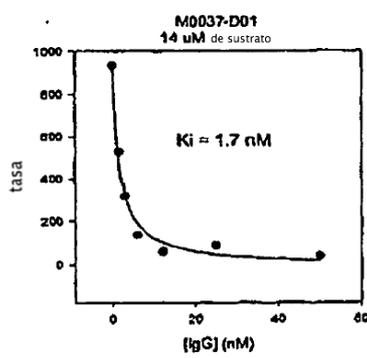
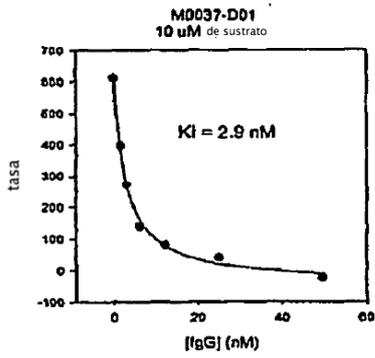
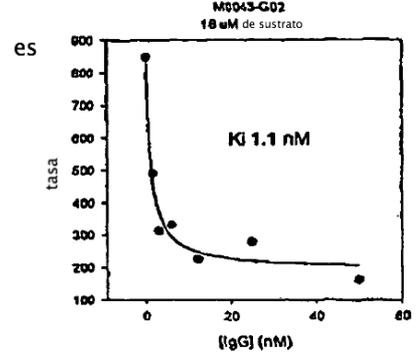
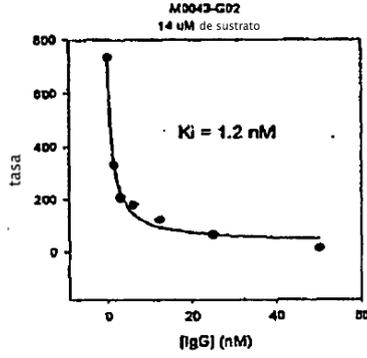
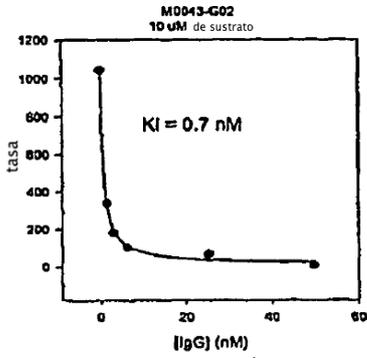
iii) el tratamiento de la osteoartritis, en donde se formula la proteína para administración a un sujeto en combinación con una terapia anti-osteoartritis;

5 v) el tratamiento de la diabetes, en donde se formula la proteína para administración a un sujeto en combinación con un segunda terapia que comprende uno o más de los siguientes agentes: una sulfonilurea, una meglitinida, una biguanida, metformina, troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona, acarbosa, pramlintida, exenatida, gliburida / metformina (Glucovance), rosiglitazona / metformina (Avandamet), o glipizida / metformina (Metaglip); o

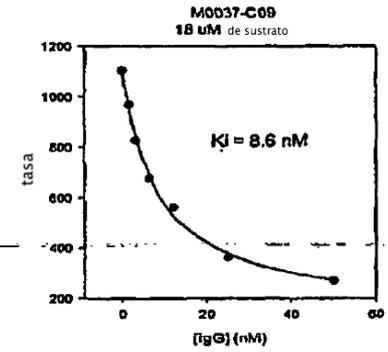
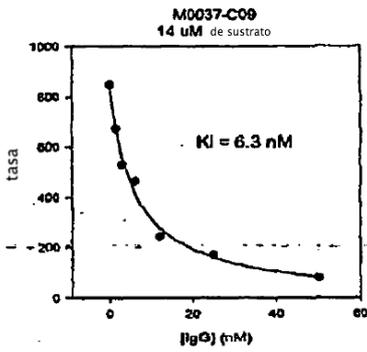
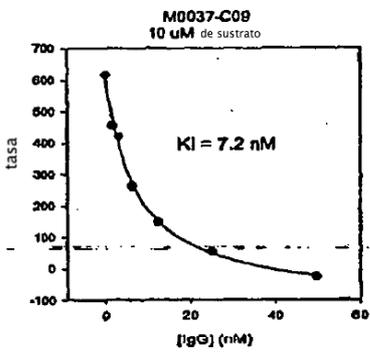
vi) el tratamiento de un tumor, en donde la proteína está acoplada a un agente que es una toxina o un fármaco quimioterapéutico.

FIGURA 1A

M0043-G02



M0037-C



M0038-F01

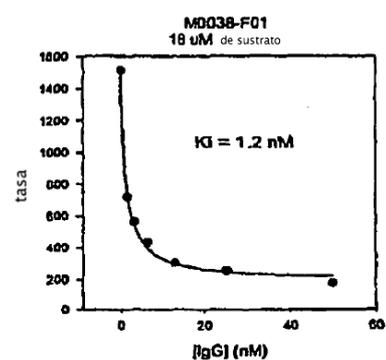
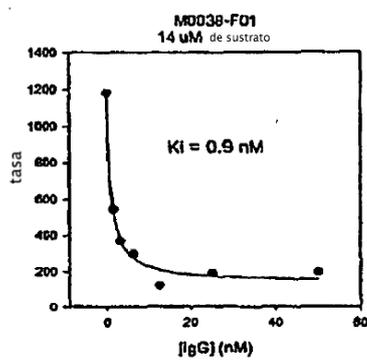
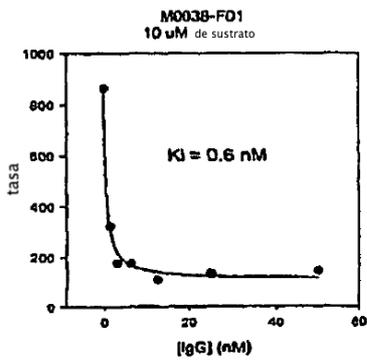


FIGURA 1B

M0033-H07

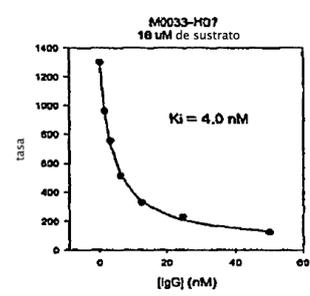
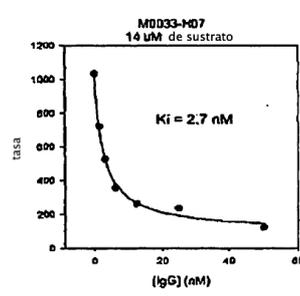
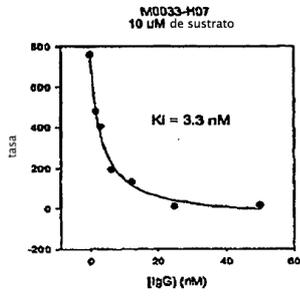


FIGURA 2

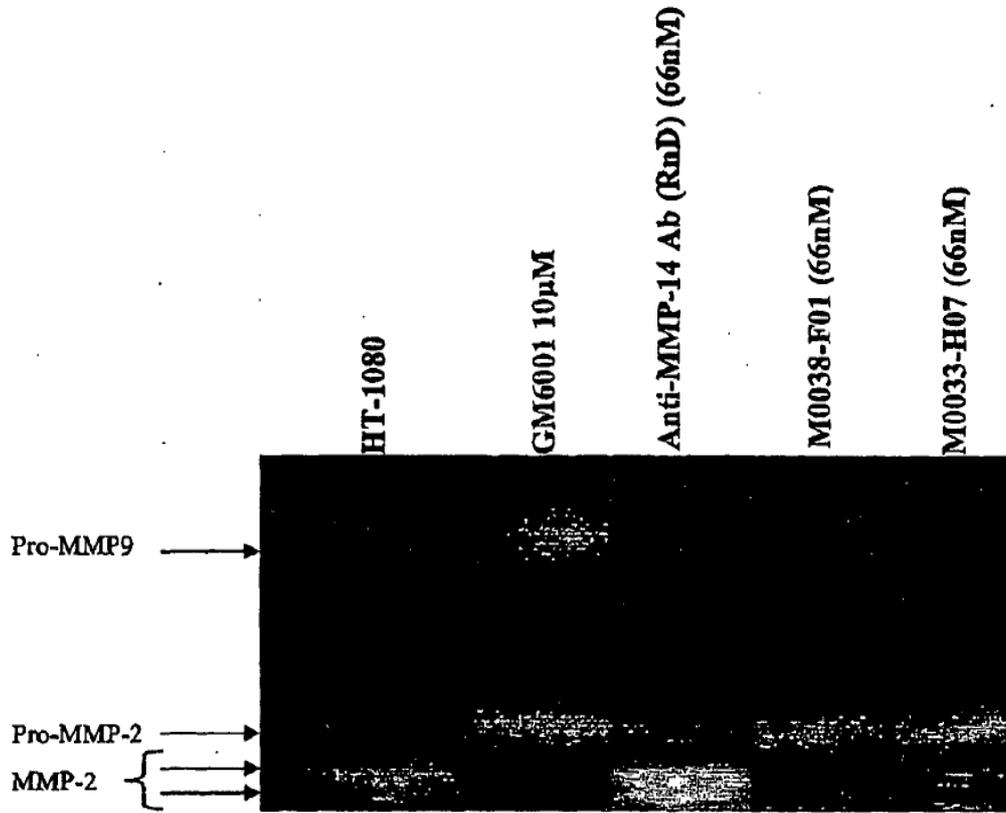


FIGURA 3

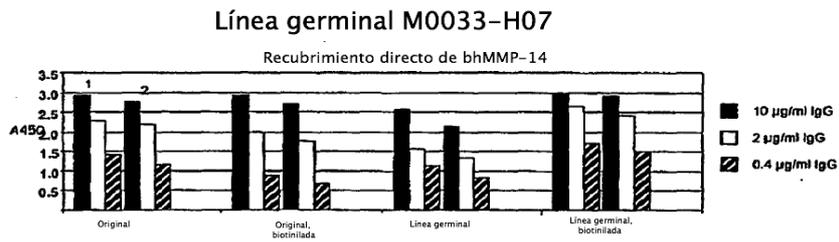
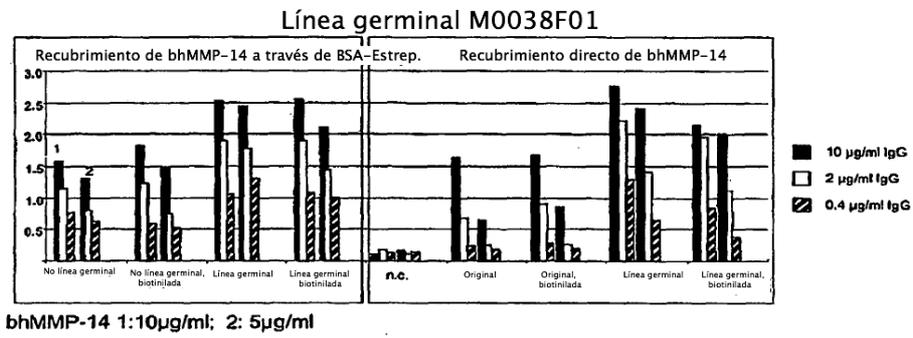
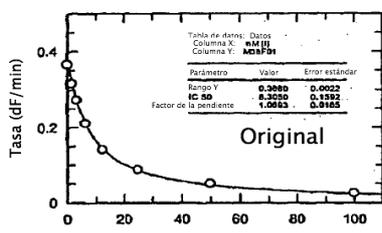
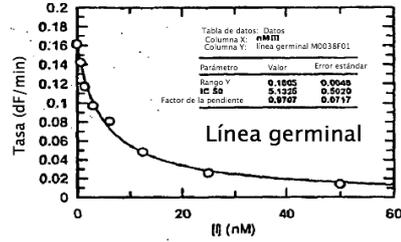


FIGURA 4

IgG M0038F01

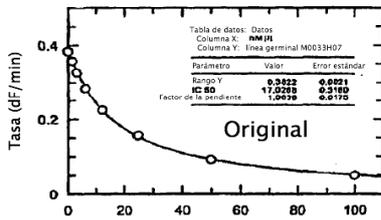


IC50=8.3nM

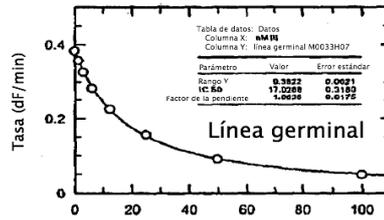


IC50=5.13nM

IgG M0033-H07



IC50=12.2 nM



IC50=17 nM

FIGURA 5

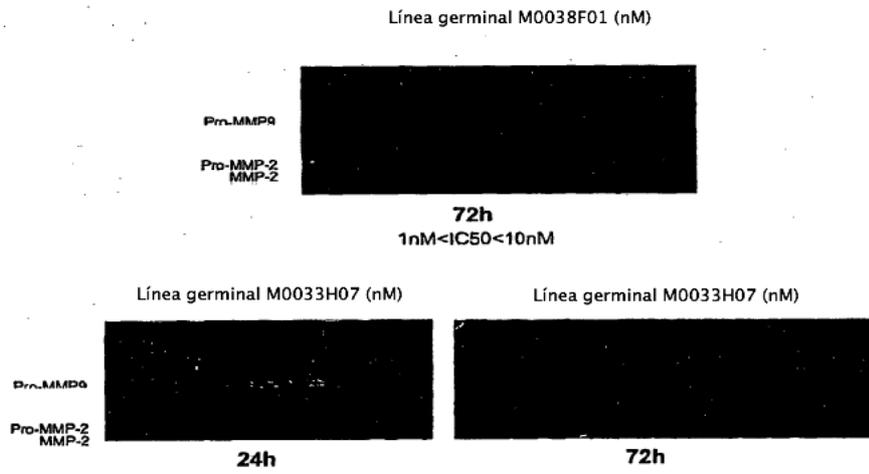


FIGURA 6A

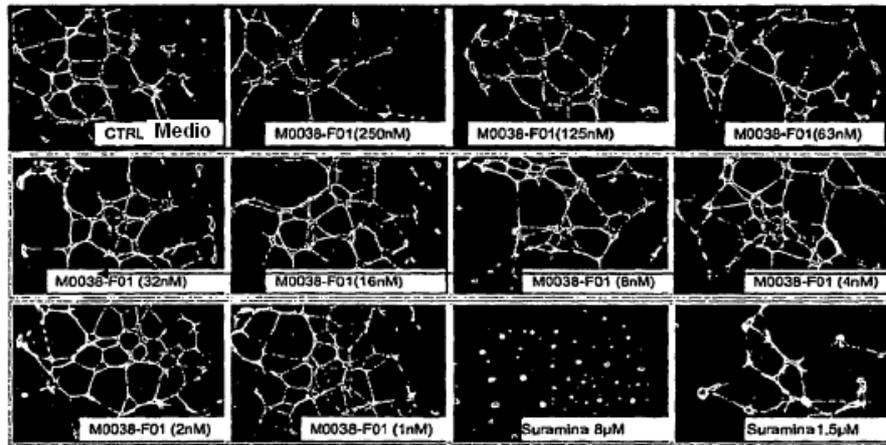


FIGURA 6B

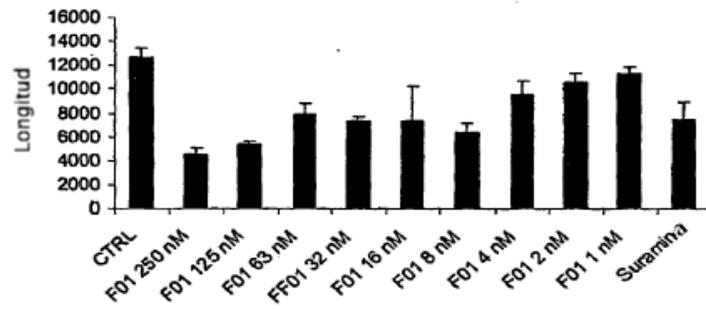


FIGURA 7

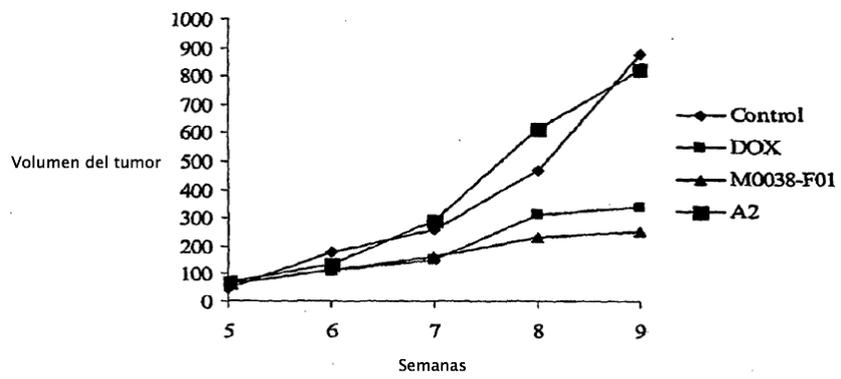


FIGURA 8

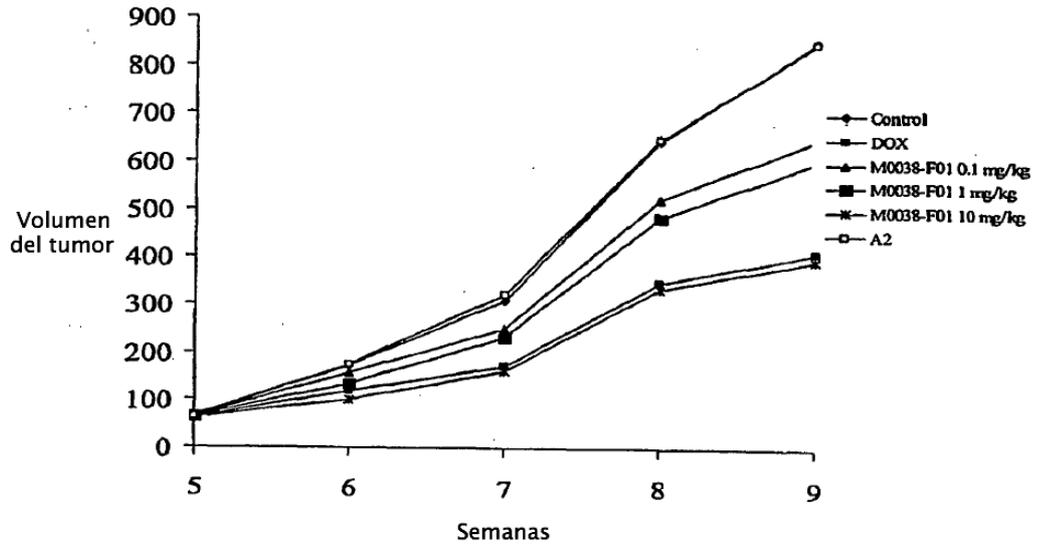


FIGURA 9

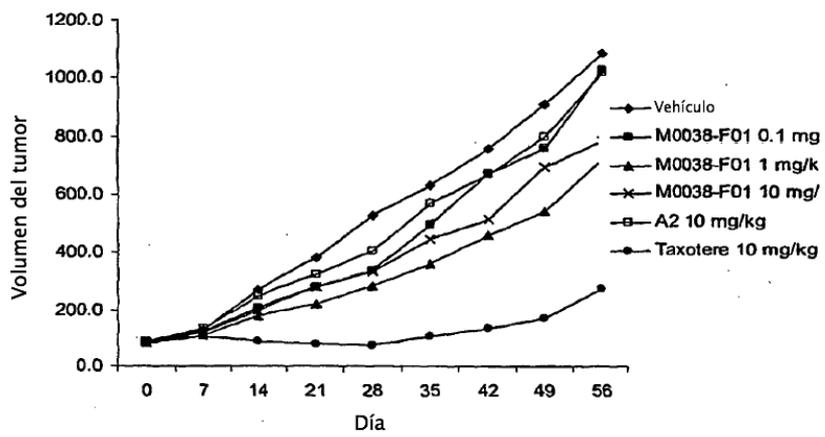


FIGURA 10A

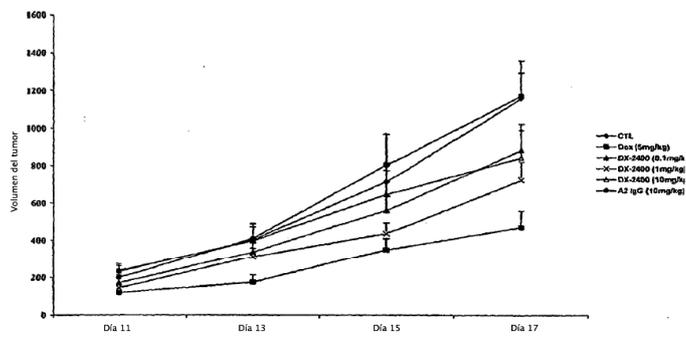


FIGURA 10B

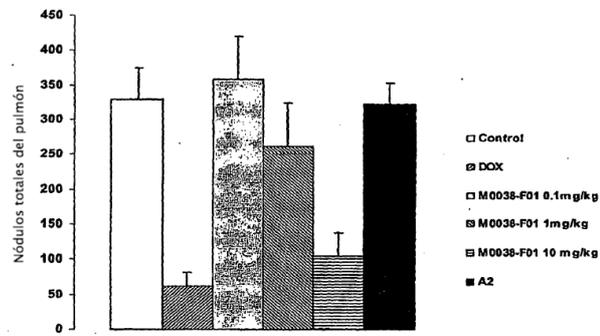


FIGURA 11

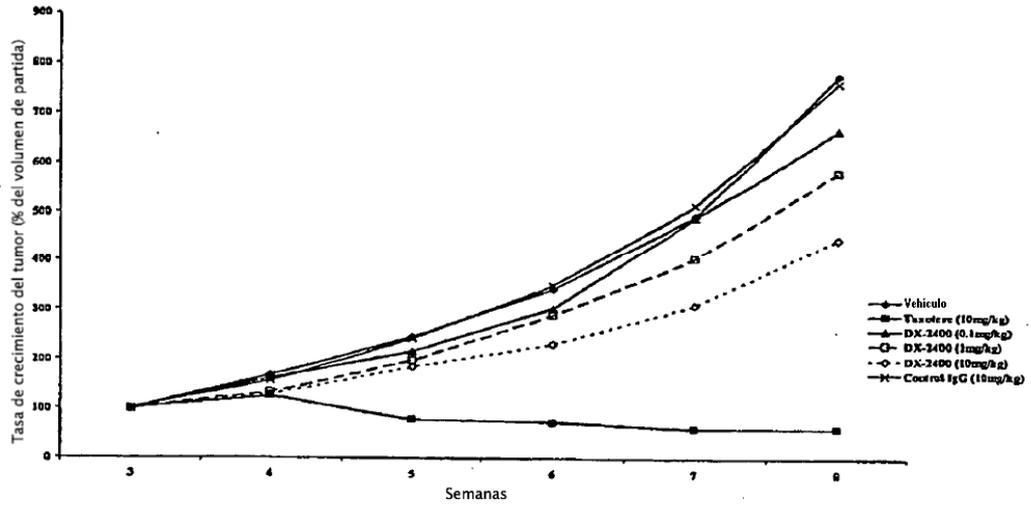


FIGURA 12

