

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 943**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2005 E 05789778 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 1841452**

54 Título: **Anticuerpos de dominio único contra TNFR1 y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

08.10.2004 WO PCT/GB2004/004253
10.11.2004 US 985847

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.06.2014

73 Titular/es:

DOMANTIS LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford Middlesex TW8 9GS, GB

72 Inventor/es:

BREWIS, NEIL D.;
WOOLVEN, BENJAMIN P.;
HOLMES, STEVE;
TOMLINSON, IAN M.;
LEE, JENNIFER;
ENEVER, CAROLYN;
BASRAN, AMRIK;
JONES, KATE;
WILDT, RUUD DE y
BLEIN, STANISLAS CHARLES

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 471 943 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

Anticuerpos de dominio único contra TNFR1 y procedimientos de uso de los mismos

Solicitudes relacionadas

La presente solicitud es una continuación en parte de la solicitud de patente de EE.UU. N° 10/985.847, presentada el 10 de noviembre de 2004, que es

1) una continuación en parte de la solicitud internacional n° PCT/GB2004/004253, designada por EE.UU. y presentada el 8 de octubre de 2004; y

2) una continuación en parte de la solicitud internacional n° PCT/GB2003/005646, designada por EE.UU. y presentada el 24 de diciembre de 2003, y reivindica prioridad sobre la solicitud del Reino Unido N° GB 0230202,4, presentada el 27 de diciembre de 2002 y la solicitud del Reino Unido N° GB 0327706,8 presentada el 28 de noviembre de 2003, que es

una continuación en parte de la solicitud internacional n° PCT/GB2003/002804, designada por EE.UU. y presentada el 30 de junio de 2003 y reivindica prioridad sobre la solicitud del Reino Unido N° GB 0230202,4, presentada el 27 de diciembre de 2002, que es

una continuación en parte de la solicitud internacional n° PCT/GB02/03014, designada por EE.UU. y presentada el 28 de junio de 2002.

Antecedentes de la invención

El dominio de unión a antígeno de un anticuerpo comprende dos regiones separadas: un dominio variable de la cadena pesada (V_H) y un dominio variable de la cadena ligera (V_L : que pueden ser V_K o V_λ). El propio sitio de unión a antígeno está formado por seis bucles polipeptídicos: tres procedentes del dominio V_H (H1, H2 y H3) y tres procedentes del dominio V_L (L1, L2 y L3). Un diverso repertorio principal de genes V que codifican los dominios V_H y V_L se produce mediante la reordenación combinatoria de los segmentos génicos. El gen de V_H se produce mediante la recombinación de tres segmentos génicos, V_H , D y J_H . En seres humanos, existen aproximadamente 51 segmentos V_H funcionales (Cook y Tomlinson (1995) *Immunol Today* 16: 237), 25 segmentos D funcionales (Corbett et al. (1997) *J. Mol. Biol.*, 268: 69), y 6 segmentos J_H funcionales (Ravetch et al. (1981) *Cell*, 27: 583), dependiendo del haplotipo. El segmento V_H codifica la región de la cadena polipeptídica que forma el primer y el segundo bucles de unión a antígeno del dominio V_H (H1 y H2), en tanto que los segmentos V_H , D y J_H se combinan para formar el tercer bucle de unión a antígeno del dominio V_H (H3). El gen de V_L se produce mediante la recombinación de solo dos segmentos génicos, V_L y J_L . En seres humanos, existen aproximadamente 40 segmentos V_K funcionales (Schäble and Zachau (1993) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 374: 1001), 31 segmentos V_λ funcionales (Williams et al. (1996) *J. Mol. Biol.*, 264: 220; Kawasaki et al. (1997) *Genome Res.*, 7: 250), 5 segmentos J_K funcionales (Hieter et al. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257: 1516; 4:1990172) y 4 segmentos J_λ funcionales (Vasicek and Leder (1990) *J. Exp. Med.*, 172: 609), dependiendo del haplotipo. El segmento V_L codifica la región de la cadena polipeptídica que forma el primer y segundo bucles de fijación del antígeno del dominio V_L (L1 y L2), en tanto que los segmentos V_L y J_L se combinan para formar el tercer bucle de fijación del antígeno del dominio V_L (L3). Se cree que los anticuerpos seleccionados de este repertorio primario son suficientemente diversos para fijar casi todos los antígenos con una afinidad al menos moderada. Los anticuerpos de alta afinidad se producen por "maduración de afinidad" de los genes reordenados, donde el sistema inmunológico genera y selecciona mutaciones puntuales sobre la base de una unión optimizada.

El análisis de las estructuras y secuencias de los anticuerpos ha demostrado que cinco de los seis bucles de unión a antígenos (H1, H2, L1, L2, L3) poseen un número limitado de conformaciones de la cadena principal o estructuras canónicas (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901; Chothia et al. (1989) *Nature*, 342: 877). Las conformaciones de cadena principal están determinadas por (i) la longitud del bucle de unión al antígeno, y (ii) residuos particulares, o tipos de residuos, en ciertas posiciones clave en el bucle de unión al antígeno y el marco del anticuerpo. El análisis de las longitudes de los bucles y de los residuos clave ha permitido a los inventores predecir las conformaciones de la cadena principal de H1, H2, L1, L2 y L3 codificadas por la mayoría de las secuencias de los anticuerpos humanos (Chothia et al. (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 799; Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.*, 14: 4628; Williams et al. (1996) *J. Mol. Biol.*, 264: 220). Aunque la región H3 es mucho más diversa en términos de secuencia, longitud y estructura (debido al uso de segmentos D), también forma un número limitado de conformaciones de la cadena principal para longitudes de bucle cortas, que dependen de la longitud y la presencia de residuos, o tipos de residuo, concretos en posiciones clave en el bucle y la estructura del anticuerpo (Martin y col. (1996) *J. Mol. Biol.*, 263: 800; Shirai et al. (1996) *FEBS Letters*, 399: 1).

Los anticuerpos biespecíficos que comprenden pares complementarios de las regiones V_H y V_L se conocen en la técnica. Estos anticuerpos biespecíficos deben comprender dos pares de V_H y V_L , de modo que cada par V_H/V_L se une a un solo antígeno o epítopo. Los procedimientos descritos implican hibridomas híbridos (Milstein & Cuello AC, *Nature* 305:537 - 40), minibodies (Hu et al., (1996) *Cancer Res* 56:3055 - 3061;), diacuerpos (Holliger et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6444 - 6448; WO 94/13804), anticuerpos recombinantes quelantes (cangrejosCRABs; Neri et al., (1995) *J. Mol. Biol.* 246, 367 - 373), biesFc (por ejemplo, Atwell et al., (1996) *Mol. Immunol.* 33, 1301 - 1312), los anticuerpos estabilizados como "llave en la cerradura" (Carter et al., (1997) *Protein Sci.* 6, 781 - 788). En

cada caso, cada especie de anticuerpo comprende dos sitios de unión a antígeno, cada uno formado por un par complementario de dominios V_H y V_L . Por tanto, cada anticuerpo es capaz de unirse a dos antígenos o epítopos diferentes al mismo tiempo, con la unión a cada antígeno o epítipo mediada por una V_H y su dominio V_L complementario. Cada una de estas técnicas presenta sus desventajas particulares; por ejemplo, en el caso de los hibridomas híbridos, los pares V_H/V_L inactivos pueden reducir en gran medida la fracción de IgG biespecífica. Además, la mayoría de los enfoques biespecíficos se basan en la asociación de los diferentes pares V_H/V_L o la asociación de cadenas de pares V_H y V_L para recrear los dos diferentes sitios de unión de V_H/V_L . Por lo tanto, es imposible controlar la relación entre los sitios de unión a cada antígeno o epítipo en la molécula ensamblada y, por lo tanto, muchas de las moléculas ensambladas se unirán a un antígeno o epítipo pero no al otro. En algunos casos ha sido posible diseñar las cadenas pesadas o ligeras en las interfaces de las subunidades (Carter y col., 1997) con el fin de mejorar el número de moléculas que tienen sitios de unión a ambos antígenos o epítopos, pero esto nunca da como resultado que todas las moléculas puedan unirse a ambos antígenos o epítopos.

Hay algunas pruebas de que dos especificidades de unión de anticuerpos diferentes podrían incorporarse en el mismo sitio de unión, pero éstas representan, generalmente, dos o más especificidades que corresponden a antígenos o epítopos estructuralmente relacionados o a anticuerpos que son de amplia reactividad cruzada. Por ejemplo, se han descrito anticuerpos de reacción cruzada, por lo general en los que dos antígenos están relacionados en la secuencia y la estructura, tales como la lisozima de huevo de gallina y la lisozima de pavo (McCafferty et al., documento WO 92/01047) o al hapteno libre y al hapteno conjugado con el vehículo (Griffiths AD et al. EMBO J 1994 13:14 3245 - 60). En un ejemplo adicional, en el documento WO 02/02773 (Abbott Laboratories) se describen moléculas de anticuerpo con "especificidad doble". Las moléculas de anticuerpo a las que se hace referencia son anticuerpos producidos o seleccionados frente a múltiples antígenos, de tal modo que su especificidad se extiende a más que un solo antígeno. Cada par complementario de V_H/V_L en los anticuerpos del documento WO 02/02773 especifica una sola especificidad de unión para dos o más antígenos relacionados estructuralmente; los dominios V_H y V_L en dichos pares complementarios no poseen ninguno una especificidad diferente. Por tanto, los anticuerpos tienen una amplia especificidad única que abarca dos antígenos, que están estructuralmente relacionados. Además, se han descrito autoanticuerpos naturales que son polirreactivos (Casali & Notkins, Ann. Rev. Immunol. 7, 515 - 531, que reaccionan con al menos dos (normalmente más) antígenos o epítopos diferentes que no están estructuralmente relacionados. También se ha mostrado que las selecciones de repertorios de péptidos aleatorios usando la tecnología de expresión en fagos sobre un anticuerpo monoclonal identificarán una gama de secuencias de péptidos que se ajustan al sitio de unión del antígeno. Algunas de las secuencias están muy relacionadas, cabiendo en una secuencia de consenso, mientras que otras son muy diferentes y se han denominado mimotopos (Lane & Stephen, Current Opinion in Immunology, 1993, 5, 268 - 271). Por lo tanto, está claro que un anticuerpo de cuatro cadenas naturales, que comprende los dominios V_H y V_L asociados y complementarios, tiene el potencial de unirse a muchos antígenos diferentes de un gran universo de antígenos conocidos. Está menos claro cómo crear un sitio de unión a dos antígenos dados en el mismo anticuerpo, particularmente los que no están necesariamente relacionados estructuralmente.

Se han sugerido procedimientos de ingeniería de proteínas que pueden tener relación con esto. Por ejemplo, también se ha propuesto que podría crearse un anticuerpo catalítico con una actividad de unión a un ion metálico a través de un dominio variable, y a un hapteno (sustrato) mediante contactos con el ion metálico y un dominio variable complementario (Barbas et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci USA 90, 6385 - 6389). Sin embargo, en este caso, la unión y la catálisis del sustrato (primer antígeno) se han propuesto para requerir la unión del ion metálico (segundo antígeno). Por lo tanto la unión al par V_H/V_L se refiere a un único antígeno pero de múltiples componentes.

Se han descrito procedimientos para la creación de anticuerpos biespecíficos a partir de un dominio único de la cadena pesada de anticuerpo de camello en el que los contactos de unión para un antígeno se crean en un dominio variable, y para un segundo antígeno en un segundo dominio variable. Sin embargo, los dominios variables no eran complementarios. Así, un primer dominio variable de cadena pesada se selecciona contra un primer antígeno y un segundo dominio variable de cadena pesada contra un segundo antígeno y después ambos dominios están unidos en la misma cadena para dar un fragmento de anticuerpo biespecífico (Conrath et al., J. Biol. Chem. 270, 27589 - 27594). Sin embargo, los dominios únicos de cadena pesada de camello son inusuales en cuanto a que derivan de anticuerpos de camello naturales que no tienen cadenas ligeras, y, de hecho, los dominios únicos de cadena pesada son incapaces de asociarse con las cadenas ligeras de camello para formar pares de V_H y V_L complementarios.

También se han descrito dominios únicos variables de cadena pesada, derivados de anticuerpos naturales que normalmente se asocian con cadenas ligeras (de anticuerpos monoclonales o de repertorios de dominios, véase el documento EP-A-0368684). Se ha demostrado que estos dominios variables de cadena pesada interactúan específicamente con uno o más antígenos relacionados pero no se han combinado con otros dominios variables de cadena pesada o ligera para crear un ligando con una especificidad para dos o más antígenos diferentes. Además, se ha demostrado que estos dominios individuales tienen una semivida *in vivo* muy corta. Por lo tanto, dichos dominios tienen un valor terapéutico limitado.

Se ha sugerido la preparación de fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la unión de los dominios variables de cadena pesada de diferente especificidad juntos (como se ha descrito anteriormente). La desventaja de este enfoque es que los dominios variables de anticuerpo aislados pueden tener una interfaz hidrófoba que normalmente efectúa las interacciones con la cadena ligera y está expuesta al disolvente y puede ser "pegajosa", lo

que permite que el dominio único se una a las superficies hidrófobas. Además, en ausencia de una cadena ligera pareja, la combinación de dos o más dominios variables de cadena pesada diferentes y su asociación, posiblemente a través de sus interfaces hidrófobas, puede impedir que se unan a uno no en ambos de los ligandos que son capaces de unirse en aislamiento. Por otra parte, en este caso, los dominios variables de cadena pesada no estarían asociados con dominios variables de cadena ligera complementarios y, por lo tanto, pueden ser menos estables y se despliegan fácilmente (Worn & Pluckthun, 1998 Biochemistry 37, 13120 - 7).

Sumario de la invención

La invención es un antagonista del factor de necrosis tumoral (TNFR1) que se une al TNFR1 e inhibe la transducción de señal a través de TNFR1; (i) en el que dicho antagonista no inhibe la unión de TNF α a TNFR1; (ii) en el que dicho antagonista es un anticuerpo de dominio (dAb); y (iii) en el que dicho dAb comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos de TAR2h-205 (SEC ID N° 627 en la Figura 27I).

Otros antagonistas preferidos son los ligandos descritos en el presente documento que se unen a TNFR1. Los ligandos comprenden un anticuerpo de dominio (dAb) de la invención que tiene especificidad de unión para TNFR1 en un formato adecuado. En algunas formas de realización, el ligando es un monómero de dAb que consiste esencialmente en, o consiste en, un dAb de la invención que tiene la especificidad de unión para TNFR1. En otras formas de realización, el ligando es un polipéptido que comprende un dAb en un formato adecuado, tal como un formato de anticuerpo.

En ciertas realizaciones, el ligando es un ligando de doble especificidad que comprende un primer dAb de la invención que se une a TNFR1 y un segundo dAb que tiene una especificidad de unión diferente de la del primer dAb. En un ejemplo, el ligando de doble especificidad comprende un primer dAb de la invención que se une a un primer epítipo en TNFR1 y un segundo dAb que se une a un epítipo sobre un objetivo diferente. En otra realización, el segundo dAb se une a un epítipo en la seroalbúmina.

El ligando o monómero de dAb de la divulgación se caracteriza por uno o más de los siguientes: 1) se disocia del TNFR1 humano con una constante de disociación (K_d) de 50 nM a 20 pM, y una constante de velocidad K_{off} de 5×10^{-1} a $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$; 2) inhibe la unión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) al TNFR1 con una CI₅₀ de 500 nM a 50 pM; 3) neutraliza el TNFR1 humano en un ensayo estándar de células L929 con una DN₅₀ de 500 nM a 50 pM; 4) antagoniza la actividad del TNFR1 en un ensayo de células estándar con un ND₅₀ de ≤ 100 nM, y a una concentración de $\leq 10 \mu\text{M}$, el dAb agoniza la actividad del TNFR1 en $\leq 5\%$ en el ensayo; 5) inhibe la letalidad en el modelo de shock séptico inducido por LPS/D-galactosamina de ratón; 6) resiste la agregación; 7) es secretada en una cantidad de al menos aproximadamente 0,5 mg / l cuando se expresa en *E. coli* o especies de *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*); 8) se despliega de forma reversible; 9) tiene eficacia en un modelo de enfermedad inflamatoria crónica seleccionada del grupo que consiste de modelo de artritis inducida con colágeno en ratón, modelo de artritis ΔARE de ratón, modelo ΔARE de enfermedad inflamatoria del intestino en ratón, modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida con dextrano sulfato sódico en ratón, modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica inducida por el humo del tabaco en ratón y modelos de primates adecuados (por ejemplo, modelo de artritis inducida por colágeno primates); y / o 10) tiene eficacia en el tratamiento, la supresión o prevención de una enfermedad inflamatoria crónica.

En realizaciones particulares, el ligando o el monómero dAb de la divulgación se disocia de TNFR1 humano con una constante de disociación (K_d) de 50 nM a 20 pM, y una constante de velocidad K_{off} de 5×10^{-1} a $1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$; inhibe la unión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) a TNFR1 con una CI₅₀ de 500 nM a 50 pM; y neutraliza el TNFR1 humano en un ensayo estándar de células L929 con una DN₅₀ de 500 nM a 50 pM. En otras realizaciones particulares, el ligando o el monómero dAb de la divulgación se disocia de TNFR1 humano con una constante de disociación (K_d) de 50 nM a 20 pM, y una constante de velocidad K_{off} de 5×10^{-1} a $1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$; inhibe la unión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) a TNFR1 con una CI₅₀ de 500 nM a 50 pM y tiene eficacia en un modelo de enfermedad inflamatoria crónica seleccionada del grupo que consiste en modelo de artritis inducida con colágeno en ratón, modelo de artritis ΔARE de ratón, modelo ΔARE de enfermedad inflamatoria del intestino en ratón, modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida con dextrano sulfato sódico en ratón, modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica inducida por el humo del tabaco en ratón y modelos de primates adecuados (por ejemplo, modelo de artritis inducida por colágeno primates). En otras realizaciones particulares, el ligando o el monómero dAb de la divulgación se disocia de TNFR1 humano con una constante de disociación (K_d) de 50 nM a 20 pM, y una constante de velocidad K_{off} de 5×10^{-1} a $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$; neutraliza el TNFR1 humano en un ensayo estándar de células L929 con una DN₅₀ de 500 nM a 50 pM; y antagoniza la actividad del TNFR1 en un ensayo de células estándar con un ND₅₀ de ≤ 100 nM, y a una concentración de $\leq 10 \mu\text{M}$ el dAb agoniza la actividad de la TNFR1 por $\leq 5\%$ en el ensayo.

El ligando o monómero de dAb comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90% homóloga a una secuencia de aminoácidos de un dAb que es TAR2h-205 (SEC ID N° 627).

La invención se refiere a un antagonista del factor de necrosis tumoral I (TNFR1) que se une al factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) e inhibe la transducción de señal a través del TNFR1, en el que dicho antagonista no inhibe la

unión de TNF α a TNFR1. En algunas formas de realización, el antagonista comprende un primer monómero de anticuerpo de dominio (dAb) y un segundo monómero de dAb, en el que dicho primer monómero de dAb de la invención se une a un dominio del TNFR1 seleccionado del grupo que consiste en Dominio 1, Dominio 2, Dominio 3 y Dominio 4, y dicho segundo monómero de dAb se une a un dominio de TNFR1 seleccionado del grupo que consiste en Dominio 1, Dominio 2, Dominio 3 y Dominio 4, en el que dicho antagonista no agoniza el TNFR1 cuando está presente en una concentración de aproximadamente 1 μ M en un ensayo de citotoxicidad con L929 estándar o un ensayo estándar de HeLa IL-8.

En algunas realizaciones, el monómero de dAb de la invención inhibe la reticulación o agrupamiento del TNFRi inducida TNFR α en la superficie de una célula.

La invención proporciona también moléculas aisladas y / o recombinantes de ácidos nucleicos que codifican los ligandos de la invención y vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico recombinantes. También se proporcionan células huésped que comprenden las moléculas de ácido nucleico recombinantes de la invención y procedimientos para la producción de los ligandos.

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista o ligando de la invención y un vehículo farmacológicamente, fisiológica o farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona el uso de un ligando de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar, suprimir o prevenir la enfermedad crónica inflamatoria, un trastorno autoinmune, enfermedad inflamatoria, la artritis, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía o shock séptico.

Los dominios variables únicos o anticuerpos de dominio (dAb) que tienen especificidad de unión por TNFR1 y ligandos que comprenden estos dominios variables únicos o dAb tienen varias ventajas. Por ejemplo, los dAb que tienen especificidad de unión por TNFR1 descritos en el presente documento son antagonistas de TNFR1. En consecuencia, los agentes terapéuticos que comprenden un dAb anti-TNFR1 de la invención se pueden administrar (por ejemplo, con fines terapéuticos, de diagnóstico o profilácticos) con riesgo sustancialmente reducido de efectos secundarios causados por la unión y / o antagonismo de TNFR2 (por ejemplo, inmunosupresión). Los agentes terapéuticos dirigidos al TNF alfa, tales como ENBREL® (entarecept; Immunex Corporation) son antagonistas del TNFR1 y ek TNFR2, y administrar estos agentes puede producir inmunosupresión y efectos secundarios relacionados (por ejemplo, infecciones graves). Estos efectos secundarios pueden limitar el uso de tales agentes, en particular para las enfermedades crónicas en las que el agente se administra durante un periodo prolongado. (Kollias G. y Kontoyannis D., Cytokine Growth Factor Rev., 13(4 - 5):315 - 321 (2002).) En contraste, debido a que los ligandos de la invención son antagonistas específicamente TNFR1, se pueden administrar durante periodos prolongados, sobre una base crónica, con un menor riesgo de efectos secundarios y proporcionan ventajas para el tratamiento de afecciones inflamatorias y afecciones inflamatorias crónicas (incluyendo enfermedades de larga duración caracterizadas por periodos de quiescencia y periodos de inflamación activa, tales como la enfermedad inflamatoria del intestino y la artritis).

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la diversificación de la V_H/HSA en las posiciones H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98 (codificados por DVT o NNK, respectivamente) que están en el sitio de unión al antígeno de V_H HSA. (SEC ID N° 1, secuencia de nucleótidos; SEC ID N° 2, secuencia de aminoácidos.) La secuencia de V_K se diversifica en las posiciones L50, L53.

La Figura 2 es un esquema que muestra la estructura del plásmido pIT1/pIT2 usado para preparar bibliotecas de Fv de cadena sencilla (scFv) y muestra la secuencia de nucleótidos del plásmido a través de regiones de control de la expresión y de clonación (SEC ID N° 3) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEC ID N° 4). El plásmido se usó para preparar

Biblioteca 1: línea germinal V_K/DVT V_H,
Biblioteca 2: línea germinal V_K/NNK V_H,
Biblioteca 3: línea germinal V_H/DVT V_K, y
Biblioteca 4: línea germinal V_H/NNK V_K en formato de expresión en fagos / ScFv.

Estas bibliotecas se preseleccionaron según la unión a los ligandos genéricos proteína A y proteína L, de modo que la mayoría de los clones y las bibliotecas seleccionadas sean funcionales. Las bibliotecas se seleccionaron en HSA (primera ronda) y β -gal (segunda ronda) o selección con HSA β -gal o selección en β -gal (primera ronda) y HSA β -gal (segunda ronda). Los ScFv solubles de estos clones de PCR se amplifican en la secuencia. Un clon que codifica un anticuerpo K8 específico se eligió para su procesamiento posterior.

La Figura 3 muestra una alineación de las cadenas V_H (V_H simulada (SEC ID N° 5), K8 (SEC ID N° 6), VH2 (SEC ID N° 7), VH4 (SEC ID N° 8), VHC11 (SEC ID N° 9), VHA10sd (SEC ID NO : 10), VHA1sd (SEC ID N° 11), VHA5sd (SEC ID N° 12), VHC5sd (SEC ID N° 13), VHC11sd (SEC ID N° 14), VHC11 SD (SEC ID N° 15)) y cadenas V_K (V_K simulada (SEC ID N° 16), K8 (SEC ID N° 17), E5sc (SEC ID N° 18), C3 (SEC ID N° 19)).

La Figura 4 muestra la caracterización de las propiedades de unión del anticuerpo K8, las propiedades de unión del anticuerpo K8 caracterizadas ELISA de fagos monoclonales, se encontró que el anticuerpo K8 de doble especificidad se unía a HSA y β -gal y se expresaba en la superficie del fago con señales absorbentes mayores que 1,0. No se detectó reactividad cruzada con otras proteínas.

La figura 5 muestra un ELISA de scFv soluble realizado usando concentraciones conocidas del fragmento de anticuerpo K8. Una placa de 96 pocillos se recubrió con 100 microgramos de HSA, BSA y β -gal a 10 μ g/ml y 100 μ g/ml de la Proteína A a una concentración de 1 μ g/ml. 50 microgramos de las diluciones en serie del scFv de K8 se aplicó y se detectaron fragmentos de anticuerpo unidos a la proteína L-HRP. Los resultados del ELISA confirman la naturaleza de doble especificidad del anticuerpo K8.

La figura 6 muestra las características de unión del clon K8V_K/ V_H simulada nalizada usando ELISA de scFv soluble. La producción de los fragmentos de scFv solubles se indujo mediante IPTG como describen Harrison et al, Methods Enzymol. 1996;267:83 - 109 y el sobrenadante que contiene scFv se analizó directamente. El ELISA de los scFv solubles se realizó como se describe en el ejemplo 1 y los scFv unidos se detectaron con Proteína L-HRP Los resultados del ELISA revelaron que este clon todavía era capaz de unirse a β -gal, mientras que la unión a BSA se había anulado.

La Figura 7 muestra la secuencia (SEC ID N° 2 y SEC ID N° 3) de los vectores de dominio variable 1 y 2.

La figura 8 es un mapa del vector de C_H usado para la construcción de un ligando V_H1 / V_H2 multiespecífico.

La figura 9 es un mapa del vector de C_K usado para la construcción de un ligando V_K1/N_K2 multiespecífico.

La Figura 10 muestra un ensayo del receptor de TNF que compaa TAR1-5 dímero 4, TAR1-5-19 dímero 4 TAR1- y 5-19 monómero.

La Figura 11 muestra un ensayo del receptor de TNF de comparación de los dímeros 1 – 6 de TAR1-5. Todos los dímeros se han purificado por FPLC y se muestran los resultados para las especies diméricas óptimas.

La Figura 12 muestra un ensayo del receptor de TNF de los homodímeros 5 – 19 deTAR1 en diferentes formatos. formato dAb-ligador-dAb con el ligador 3U, 5U o 7U ligador, formato Fab y formato ligador de bisagra de cisteína.

La Figura 13 muestra la secuencia simulada de V_H para la biblioteca 1 (secuencia de aminoácidos ((SEC ID N°: 5; secuencias de nucleótidos): hebra codificante (SEC ID N° 20), hebra no codificante (SEC ID N° 21). La secuencia del marco de V_H basada en la secuencia de DP47 - JH4b de la línea germinal. Se han incorporado posiciones en las que la asignación al azar de NNK (N = A o los nucleótidos T o C o G; K = nucleótidos G o T) en la biblioteca 1 y se indican en el texto subrayadas en negrita.

La Figura 14 muestra la secuencia simulada de V_H para la biblioteca 2 (secuencia de aminoácidos ((SEC ID N°: 22; secuencias de nucleótidos): hebra codificante (SEC ID N° 23), hebra no codificante (SEC ID N° 24). La secuencia del marco de V_H basada en la secuencia de DP47 - JH4b de la línea germinal. Se han incorporado posiciones en las que la asignación al azar de NNK (N = A o los nucleótidos T o C o G; K = nucleótidos G o T) en la biblioteca 2 y se indican en el texto subrayadas en negrita.

La Figura 15 muestra la secuencia simulada de V_K para la biblioteca 3 (secuencia de aminoácidos ((SEC ID N°: 16; secuencias de nucleótidos): hebra codificante (SEC ID N° 25), hebra no codificante (SEC ID N° 26). La secuencia del marco de V_K basada en la secuencia de DP_K9 - J_K1 de la línea germinal. Se han incorporado posiciones en las que la asignación al azar de NNK (N = A o los nucleótidos T o C o G; K = nucleótidos G o T) en la biblioteca 3 y se indican en el texto subrayadas en negrita.

La Figura 16 muestra secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los anticuerpos dAb anti MSA MSA 16 (secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 27), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 28) y MSA 26 (secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 29), amino secuencia de ácido (SEC ID N°: 30).

La figura 17 muestra la inhibición Biacore de MSA 16 y 26. Los dAb purificados MSA16 y MSA26 se analizaron mediante inhibición BIAcore para determinar la K_d. Brevemente, los dAb se analizaron para determinar la concentración de dAb requerida para alcanzarr 200RU de respuesta en un chip CM5 biacore recubierto con una densidad elevada de MSA. Una vez que se han determinado las concentraciones requeridas de dAb, el antígeno MSA en un intervalo de concentraciones en torno a la K_d prevista mezcló previamente con el dAb y se incubó durante la noche. La unión al chip de BIAcore recubierto con MSA del dAb en cada una de las premezclas se midió después a un caudal elevado de 30 μ l / minuto.

La Figura 18 muestra los niveles séricos de MSA16 tras la inyección. La semivida del dAb MSA16 se determinó en ratones. El MSA16 se dosificó como inyecciones i.v. individuales a aprox 1,5 mg/kg en ratones CD1. La modelización con un modelo de 2 compartimentos mostró que MSA16 tenía una t_{1/2 α} de 0,98h, una t_{1/2 β} de 36,5 h y una AUC de 913 h.mg/ml. MSA16 tenía una semivida considerablemente alargada en comparación con

HEL4 (un dAb anti-lisozima blanca de huevo de gallina) que tenía una $t_{1/2\alpha}$ de 0,06 h y un $t_{1/2\beta}$ de 0,34 h.

Las figuras 19a-19c muestran un ELISA (Figura 19a) y el ensayo de los receptores TNF (Figura 19b, 19c) que muestra la inhibición de la unión del TNF con un fragmento de tipo Fab que comprende MSA26Ck y TAR1-5-19CH. La adición de MSA con el fragmento de tipo Fab reduce el nivel de inhibición. Una placa de ELISA recubierta con 1 µg/ml de TNF α se sondó con un fragmento Fab de V_KC_H y V_K C_K de especificidad doble y también con un dAb control de unión a TNF α a una concentración calculada para dar una señal similar en el ELISA. Los dAb de especificidad doble y de control se usaron como sondas en la placa de ELISA en presencia y en ausencia de 2 mg/ml de MSA. La señal en el pocillo de doble especificidad se redujo en más del 50%, pero la señal en el pocillo de dAb no se redujo en absoluto (véase la figura 19a). La misma proteína de especificidad también se introdujo en el ensayo de los receptores con y sin MSA y la competencia por MSA también se demostró (véase la Figura 19c). Esto demuestra que la unión de MSA al de especificidad doble es competitiva con la unión al TNF α .

La Figura 20 muestra un ensayo del receptor de TNF que muestra la inhibición de la unión a TNF con un heterodímero dAb de TAR1 - 5-19 y dAb MSA16 unidos por puentes disulfuro. La adición de MSA con el dímero reduce el nivel de inhibición de una manera dependiente de la dosis. El ensayo del receptor de TNF (Figura 19 (b)) se llevó a cabo en presencia de una concentración constante del heterodímero (18 nm) y una serie de diluciones de MSA y HAS. La presencia de HSA en un intervalo de concentraciones (hasta 2 mg / ml) no causó una reducción en la capacidad del dímero para inhibir el TNFTNF α . Sin embargo, la adición de MSA produjo una reducción dependiente de la dosis en la capacidad del dímero para inhibir TNF α (Figura 19a). Esto demuestra que MSA y TNF α compiten por la unión al dímero TAR1 - 5-19, MSA16 unido por Cys. MSA y HSA solos no tuvieron un efecto sobre el nivel de unión al TNF en el ensayo.

Figura 21A-21M muestra las secuencias de aminoácidos (SEC ID N°: 31-98 y SEC ID N°: 373-401 y 431) de varios dominios variables de inmunoglobulina humana que tienen especificidad de unión para el TNFR1 humano. Las secuencias de aminoácidos presentadas son continuas sin huecos; el símbolo ~ se ha insertado en las secuencias para indicar las ubicaciones de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). CDR1 está flanqueada por ~, CDR2 está flanqueada por ~~, y CDR3 está flanqueada por ~~~.

La Figura 22A-22T muestra las secuencias de nucleótidos (SEC ID N°: 99-166 y SEC ID N°: 402-430 y 432) de varios ácidos nucleicos que codifican los dominios variables de inmunoglobulina humana presentados en la Figura 21A-21M. Las secuencias de nucleótidos que se presentan son continuas sin huecos; el símbolo - se ha insertado en las secuencias para indicar la ubicación de las secuencias que codifican las CDR. Las secuencias que codifican CDR1 están flanqueadas por ~, las secuencias que codifican la CDR2 están flanqueadas por ~~, y las secuencias que codifican la CDR3 están flanqueadas por ~~~.

La Figura 23A-23B muestra las secuencias de aminoácidos (SEC ID N°: 167 - 179) de varios dominios variables de inmunoglobulina humana que tienen especificidad de unión para el TNFR1 de ratón. Las secuencias de aminoácidos presentadas son continuas sin huecos. En algunas de las secuencia, el símbolo se ha insertado para indicar la ubicación de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). CDR1 está flanqueada por ~, CDR2 está flanqueada por ~~, y CDR3 está flanqueada por ~~~.

La Figura 24A-24C muestra las secuencias de nucleótidos (SEC ID N°: 180 - 192 y 626) de varios ácidos nucleicos que codifican los dominios variables de inmunoglobulina humana presentados en la Figura 23A-23B. Las SEC ID N° 186 y SEC ID N° 626 codifican ambas la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 173. Las secuencias de la SEC ID N° 626 que codifica CDR1 están flanqueadas por ~, las secuencias que codifican la CDR2 están flanqueadas por ~~, y las secuencias que codifican la CDR3 están flanqueadas por ~~~.

La Figura 25A-25L muestra las secuencias de nucleótidos que codifican varios dominios variables de inmunoglobulina humana y las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de inmunoglobulina humana codificada (SEC ID N°: 193-198 y 200-295).

La Figura 26 es un gráfico que muestra que los formatos de dAb anti-TNFR1 no agonizan sustancialmente el TNFR1 en un ensayo de L929. Las células L929 se cultivaron en medio que contenía un intervalo de concentraciones del monómero dAb anti-TNFR1 (TAR2m-21-23), el monómero TAR2m 21-23 reticulado mediante un anticuerpo anti-myc disponible comercialmente (9E10), dAb anti-TNFR1 dAb/anti-SA de especificidad doble (TAR2m-21-23 3U TAR7m-16), o dAb anti-TNFR1 pegilado (TAR2m-21-23 40K PEG). En el caso del monómero TAR2m-21-23 reticulado por el anticuerpo anti-myc, el dAb y el anticuerpo se mezclaron en una proporción de 2:1 y se pre-incubaron durante una hora a temperatura ambiente para simular los efectos de la reticulación inmunitaria *in vivo* antes del cultivo. (El monómero TAR2m-21-23 incluye un epítopo myc.). El monómero TAR2m-21-23 se incubó con las células L929 a una concentración de 3.000 nM. El monómero TAR2m-21-23 y el anticuerpo anti-Myc se incubaron a una concentración del dAb de 3.000 nM. TAR2m-21-23-3U TAR7m 16 se incubó con las células a concentraciones de 25 nM, 83,3 nM, 250 nM, 833 nM y 2.500 nM. TAR2m-21 - 23 40K PEG se incubó con las células a concentraciones de 158,25 nM, 527,5 nM, 1582,5 nM, 5.275 nM y 15.825 nM. Después de la incubación durante la noche, se evaluó la viabilidad celular. Los resultados revelaron que la incubación de células L929 con 10 nM, 1 nM o 0,1 nM de un anticuerpo IgG anti-TNFR1

comercialmente disponible que se reticula y agoniza TNFR1 (N ° de catálogo AF-425-PB, R & D Systems, Minneapolis, MN) dio como resultado un aumento dependiente de la dosis en las células no viables, lo que demuestra la sensibilidad de estas células a los agonistas de TNFR1. En contraste, la incubación con diversas cantidades de formatos anti-TNFR1 no antagonizó el TNFR1 y no dio lugar a un aumento del número de células no viables en los cultivos, incluso cuando se usó a más de 1000 veces la concentración del anticuerpo IgG anti-TNFR1 disponible comercialmente.

La Figura 27A-27I muestra las secuencias de aminoácidos (SEC ID N°: 433 – 517 y 627) de varios dominios variables de inmunoglobulina humana que tienen especificidad de unión para el TNFR11 humano. Las secuencias de aminoácidos presentadas son continuas sin huecos; el símbolo ~ se ha insertado en las secuencias para indicar las ubicaciones de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). CDR1 está flanqueada por ~, CDR2 está flanqueada por ~ ~, y CDR3 está flanqueada por ~ ~ ~.

La Figura 28A-28O muestra las secuencias de nucleótidos (SEC ID N°: 518 - 602 y 628) de varios ácidos nucleicos que codifican los dominios variables de inmunoglobulina humana presentados en la Figura 27A-27H. Las secuencias de nucleótidos presentadas son continuas sin huecos; el símbolo ~ se ha insertado en las secuencias para indicar la ubicación de las secuencias que codifican las CDR. Las secuencias que codifican CDR1 están flanqueadas por ~, las secuencias que codifican la CDR2 están flanqueadas por ~ ~, y las secuencias que codifican la CDR3 están flanqueadas por ~ ~ ~.

Descripción detallada de la invención

Dentro de esta especificación se han descrito realizaciones de una manera que permite una especificación clara y concisa por escrito, pero está previsto y se apreciará que las realizaciones se pueden combinar de diversas formas o separar sin alejarse de la invención.

Definiciones

"Complementariedad" Dos dominios de inmunoglobulina son "complementarios" cuando pertenecen a las familias de las estructuras que forman parejas o grupos afines o derivan de este tipo de familias y mantienen esta característica. Por ejemplo, un dominio V_H y un dominio V_L de un anticuerpo son complementarios; dos dominios V_H no son complementarios y dos dominios V_L no son complementarios. Los dominios complementarios pueden encontrarse en otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, tales como los dominios V_α y V_β (α y δ) del receptor de células T. En el contexto de la segunda configuración de la presente invención, los dominios no complementarios no se unen a una molécula diana de manera cooperativa, sino que actúan de forma independiente sobre diferentes epítomos objetivo que puedan estar en la misma o en diferentes moléculas. Los dominios que son artificiales, como los dominios basados armazones de proteínas que no se unen a epítomos a menos que se hayan diseñado para ello, no son complementarios. Asimismo, dos dominios a base de (por ejemplo) un dominio de inmunoglobulina y un dominio de fibronectina no son complementarios.

"Inmunoglobulina". Esto se refiere a una familia de polipéptidos que conservan la característica de plegado de la inmunoglobulina de moléculas de anticuerpo, que contiene dos láminas β y, por lo general, un puente disulfuro conservado. Los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas están implicados en muchos aspectos de las interacciones celulares y no celulares *in vivo*, incluyendo papeles generalizados en el sistema inmunológico (por ejemplo, anticuerpos, moléculas receptoras de células T y similares), participación en la adhesión celular (por ejemplo las moléculas ICAM) y la señalización intracelular (por ejemplo, moléculas receptoras, tales como el receptor de PDGF). La presente invención es aplicable a todas las moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas que poseen dominios de unión. Preferiblemente, la presente invención se refiere a anticuerpos.

"Combinación". Los dominios variables de acuerdo con la invención se combinan para formar un grupo de dominios; por ejemplo, los dominios complementarios se pueden combinar, tales como los dominios V_L que se combinan con dominios V_H . Los dominios no complementarios también pueden combinarse. Los dominios se pueden combinar de varias formas, que implican la unión de los dominios por medios covalentes o no covalentes.

"Dominio". Un dominio es una estructura proteica plegada que conserva su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de las discretas propiedades funcionales de las proteínas y, en muchos casos, se pueden añadir, eliminar o transferir a otras proteínas sin que se pierda la función del resto de la proteína y/o del dominio. Por "dominio variable único de anticuerpo" se quiere decir un dominio polipeptídico plegado que comprende secuencias características de los dominios variables del anticuerpo. Por tanto, incluye dominios variables completos del anticuerpo y dominios variables modificados en los que, por ejemplo, uno o más bucles han sido reemplazados por secuencias que no son características de los dominios variables del anticuerpo, o dominios variables del anticuerpo que se han truncado o que comprenden extensiones en los extremos N o C, así como fragmentos plegados de los dominios variables que conservan al menos en parte la actividad de unión y la especificidad del dominio de longitud completa.

"Repertorio". Una colección de diversas variantes, por ejemplo variantes de polipéptidos, que difieren en su secuencia primaria. Una biblioteca usada en la presente invención abarcará un repertorio de polipéptidos que comprenden al menos 1.000 miembros.

"Biblioteca". El término biblioteca se refiere a una mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos heterogéneos. La biblioteca está compuesta por miembros, cada uno de los cuales tiene una secuencia única de polipéptido o de ácido nucleico. Hasta este punto, *biblioteca* es sinónimo de *repertorio*. Las diferencias de secuencia entre los miembros de la biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede tomar la forma de una mezcla sencilla de polipéptidos o ácidos nucleicos o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo bacterias, virus, células animales o vegetales y similares, transformados con una biblioteca de ácidos nucleicos. Preferentemente, cada organismo o célula individual sólo contiene uno o una serie limitada de miembros de la biblioteca. De forma ventajosa, los ácidos nucleicos se incorporan en vectores de expresión con el fin de permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. En un aspecto preferido, una biblioteca puede tomar la forma de una población de organismos huésped, en la que cada organismo contiene una o más copias de un vector de expresión que contiene un único miembro de la biblioteca en forma de ácido nucleico que puede expresarse para producir su miembro polipeptídico correspondiente. Por tanto, la población de organismos huésped tiene el potencial de codificar un gran repertorio de variantes polipeptídicas diversas genéticamente.

Un "ligando multiespecífico de conformación cerrada" describe un ligando multiespecífico como se define en el presente documento que comprende al menos dos dominios de unión al epítipo como se define en el presente documento. El término "conformación cerrada" (ligando multiespecífico) significa que los dominios del ligando de unión al epítipo están dispuestos de tal forma que la unión al epítipo a través de un dominio de unión a un epítipo compite con la unión al epítipo a través de otro dominio de unión a epítipo. Es decir, los epítopos afines pueden unirse a cada dominio de unión al epítipo de forma individual, pero no al mismo tiempo. La conformación cerrada del ligando puede conseguirse usando procedimientos descritos en el presente documento.

"Anticuerpo". Un anticuerpo (p. ej., IgG, IgM, IgA, IgD o IgE) o un fragmento (tales como Fab, F(ab')₂, Fv, Fv unida por disulfuro, scFv, anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada, scFv unido por disulfuro, diacuerpo) derivado de cualquier especie natural que produce un anticuerpo o creado por tecnología de ADN recombinante; aislado de suero, de células B, hibridomas, transfectomas, levaduras o bacterias).

"Ligando de doble especificidad". Un ligando comprende un primer dominio variable único de inmunoglobulina y un segundo dominio variable único de inmunoglobulina como se define en el presente documento, en el que las regiones variables son capaces de unirse a dos antígenos diferentes o dos epítopos en el mismo antígeno que normalmente no están unidos por una inmunoglobulina monoespecífica. Por ejemplo, los dos epítopos pueden estar en el mismo hapteno, pero no son el mismo epítipo o lo suficientemente adyacentes como para estar unidos por un ligando monoespecífico. Los ligandos de doble especificidad según la invención están compuestos por dominios variables que tienen diferentes especificidades, y no contienen pares de dominios variables mutuamente complementarios que tienen la misma especificidad.

"Antígeno". Una molécula que está unida por un ligando según la presente invención. Típicamente, los antígenos están unidos por ligandos de anticuerpos y son capaces de producir una respuesta de anticuerpos *in vivo*. Puede ser un polipéptido, proteína, ácido nucleico u otra molécula. Generalmente, los ligandos de doble especificidad se acuerdan con la invención se seleccionan según la especificidad objetivo contra un antígeno particular. En el caso de anticuerpos convencionales y fragmentos de los mismos, el sitio de unión del anticuerpo definido por los bucles variables (L1, L2, L3 y H1, H2, H3) es capaz de unirse al antígeno.

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

"Ligando genérico". Un ligando que se une a todos los miembros de un repertorio. En general, no unido a través del sitio de unión al antígeno como se ha definido anteriormente. Ejemplos no limitativos incluyen la proteína A, la proteína L y la proteína G.

"Selección" derivada mediante detección selectiva o derivada mediante un proceso de selección darwiniana, en el que las interacciones de unión se realizan entre un dominio y el antígeno o epítipo o entre un anticuerpo y un antígeno o epítipo. Por lo tanto, un primer dominio variable se puede seleccionar según la unión a un antígeno o epítipo en presencia o en ausencia de un dominio variable complementario.

"Estructura marco universal". Una es una única secuencia de estructura marco de anticuerpo correspondiente a las regiones de un anticuerpo de secuencia conservada tal como define Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services) o correspondiente al repertorio o estructura de inmunoglobulinas de la línea germinal humana definida por Chothia y Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917. La invención proporciona el uso de una única estructura marco o un conjunto de dichas estructuras marco, que se ha descubierto que permiten derivar prácticamente cualquier especificidad de unión a través de la variación solo en las regiones hipervariables.

"Semivida". El tiempo necesario para que la concentración en suero del ligando se reduzca un 50%, *in vivo*, por ejemplo debido a la degradación del ligando y / o el aclaramiento o secuestro del ligando por mecanismos naturales.

Los ligandos de la invención se estabilizan *in vivo* y su semivida se incrementa uniéndolos a moléculas que resisten la degradación y/o el aclaramiento o secuestro. Normalmente, dichas moléculas son proteínas naturales que tienen una semivida prolongada *in vivo*. La semivida de un ligando se aumenta si su actividad funcional persiste, *in vivo*, durante un período de tiempo más largo que un ligando similar que no es específico para la molécula de semivida creciente. Por lo tanto, un ligando específico para HSA y una molécula diana se compara con el mismo ligando, en el que la especificidad para HSA no está presente, que no se une a HSA, pero se une a otra molécula. Por ejemplo, puede unirse a un segundo epítipo en la molécula diana. Típicamente, la semivida se incrementa en 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más. Son posibles aumentos en el intervalo de 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x o más de la semivida. Como alternativa, o además de, son posibles los aumentos en el intervalo de hasta 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, 150x de la semivida.

"Inmunoensayo homogéneo". Un inmunoensayo en el que se detecta el analito sin necesidad de una etapa de separación de reactivos unidos y no unidos.

"Sustancialmente idéntica (o" sustancialmente homóloga ")". Una primera secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que contiene un número suficiente de residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, con una cadena lateral similar, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservados) a una segunda secuencia de aminoácidos o de nucleótidos de un modo tal que la primera y la segunda secuencias de aminoácidos o nucleótidos tienen actividades similares. En el caso de los anticuerpos, el segundo anticuerpo tiene la misma especificidad de unión y tiene al menos un 50% de la afinidad del mismo,

Como se usa el presente documento, las expresiones "baja rigurosidad", "rigurosidad media," "alta rigurosidad" o "condiciones rigurosidad muy alta" describen las condiciones para la hibridación y lavado de ácido nucleico. Orientación para la realización de las reacciones de hibridación se puede encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6,3.1 - 6,3.6, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En dicha referencia se describen procedimientos acuosos y no acuosos y se puede utilizar cualquiera de ellos. Condiciones de hibridación específicas mencionadas en el presente documento son las siguientes: 1) condiciones de hibridación de baja rigurosidad en 6X de citrato de sodio / cloruro de sodio (SSC) a aproximadamente 45 ° C, seguido de dos lavados en 0,2 X SSC, 0,1% SDS, al menos a 50 ° C (la temperatura de los lavados puede aumentarse a 55 ° C para condiciones de baja rigurosidad); (2) condiciones de hibridación de rigurosidad media en SSC 6X a aproximadamente 45 ° C, seguido de uno o más lavados en 0,2 X SSC, 0,1% SDS a 60 ° C; (3) condiciones de hibridación de alta rigurosidad en SSC 6X a aproximadamente 45 ° C, seguido por uno o más lavados en 0,2 X SSC, 0,1% SDS a 65 ° C; y, preferentemente, (4) condiciones de hibridación de rigurosidad muy alta son fosfato sódico 0,5 M, 7% de SDS a 65 ° C, seguido de uno o más lavados en 0,2 X SSC, 1% SDS a 65 ° C. Condiciones de rigurosidad muy alta (4) son las condiciones preferidas y las que se deben utilizar a menos que se especifique lo contrario.

Como se define en el presente documento, la expresión "conformación cerrada (ligando multiespecífico) significa que los dominios del ligando de unión al epítipo están unidos o asociados entre sí, opcionalmente por medio de un esqueleto proteico, de forma que la unión al epítipo a través del dominio de unión a un epítipo compite con la unión al epítipo a través de otro dominio de unión a epítipo. Es decir, los epítipos afines pueden unirse a cada dominio de unión al epítipo de forma individual, pero no al mismo tiempo. La conformación cerrada del ligando puede conseguirse usando procedimientos descritos en el presente documento.

"Conformación abierta" significa que los dominios del ligando de unión al epítipo están unidos o asociados entre sí, opcionalmente por medio de un esqueleto proteico, de forma que la unión al epítipo a través del dominio de unión a un epítipo compite con la unión al epítipo a través de otro dominio de unión a epítipo.

Como se hace referencia en el presente documento, el término "compite" significa que la unión de un primer epítipo a su dominio de unión al epítipo afín se inhibe cuando un segundo epítipo se une a su dominio de unión al epítipo afín. Por ejemplo, la unión puede inhibirse estéricamente, por ejemplo mediante bloqueo físico de un dominio de unión o mediante alteración de la estructura o ambiente de un dominio de unión de modo que se reduce su afinidad o aidez por un epítipo.

La expresión "dominio variable único de inmunoglobulina" hace referencia a una región variable de anticuerpo (V_H , V_{HH} , V_L) que se une específicamente a un antígeno o epítipo de forma independiente de otras regiones V o dominios; no obstante, como se usa la expresión en el presente documento, un dominio variable único de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (p. ej., homo o heteromultímero) con otras regiones variables o dominios variables en los que las otras regiones o dominios no son necesarias para la unión al antígeno a través del dominio variable único de inmunoglobulina (es decir, en el que el dominio variable único de inmunoglobulina se une al antígeno de forma independiente de los dominios variables adicionales). "Dominio variable único de inmunoglobulina" no solo abarca un polipéptido de dominio variable único de anticuerpo aislado sino también polipéptidos más grandes que comprenden uno o más monómeros de una secuencia polipeptídica de dominio variable único de anticuerpo. Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" es lo mismo que un polipéptido "dominio variable único de inmunoglobulina" tal como el término se usa en el presente documento. Un polipéptido dominio variable único de inmunoglobulina, como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido dominio variable único de inmunoglobulina de mamífero, preferentemente humano, pero también incluye dAb V_{HH} de roedores (por ejemplo,

tal como se divulga en el documento WO 00/29004, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad) o de camélido. Los dAb de camélidos son polipéptidos del dominio variable único de inmunoglobulina que derivan de especies, entre las que se incluyen camellos, llamas, alpacas, dromedarios y guanacos, y comprenden anticuerpos de cadena pesada desprovistos de forma natural de las cadenas ligeras. V_{HH} . Las moléculas V_{HH} son aproximadamente diez veces más pequeñas que las moléculas de IgG y, como polipéptidos individuales, son muy estables y son resistentes a condiciones de pH y temperatura extremas.

Como se usa en el presente documento, el término "antagonista del receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1)" se refiere a un agente (p. ej., una molécula, un compuesto) que se une al TNFR1 y puede inhibir una (es decir, una o más) función del TNFR1. Por ejemplo, un antagonista del TNFR1 puede inhibir la unión de TNF α a TNFR1 y/o inhibir la transducción de señal mediada por el TNFR1. De acuerdo con esto, los procesos mediados por el TNFR1 y las respuestas celulares (p. ej., la muerte celular inducida por TNF α en un ensayo de citotoxicidad L929 estándar) se pueden inhibir con un antagonista del TNFR1. Un antagonista de TNFR1 puede ser, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña, producto natural, proteína, péptido o peptidomimético. Antagonistas de TNFR1 se pueden identificar, por ejemplo, mediante bibliotecas de detección o colecciones de moléculas, tales como, el Chemical Repository of the National Cancer Institute, como se describe en el presente documento o usando otros procedimientos adecuados. Antagonistas preferidos de TNFR1 son anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos, ligandos y monómeros dAb descritos en el presente documento.

Las secuencias similares u homólogas a las secuencias divulgadas en el presente documento son también parte de la invención. En algunas formas de realización, la identidad de secuencia a nivel de aminoácidos puede ser de aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior. Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" o "similitud" entre dos secuencias (los términos se usan de forma intercambiable en el presente documento) se realizan del siguiente modo. Las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (e.g., se pueden introducir huecos en una o ambas secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos primero y segundo para la alineación óptima y las secuencias no homólogas se pueden descartar para fines comparativos). En una forma de realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para fines comparativos es de al menos 30 %, preferentemente de al menos 40 %, más preferentemente de al menos 50 %, incluso más preferentemente de al menos 60 %, y todavía más preferentemente de al menos 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Después se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está opcuada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en dicha posición (como se usa en el presente documento, "homología" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "identidad" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se han de introducir para la alineación óptima de las dos secuencias.

De forma ventajosa, el algoritmo BLAST (versión 2.0) se emplea para el alineamiento de secuencias, con los parámetros establecidos a sus valores predeterminados. El algoritmo BLAST se describe con detalle en el sitio de la World Wide Web ("www") del Centro Nacional de Información Biotecnológica ("Ncbi") de los Institutos Nacionales de Salud ("NIH") del gobierno de los EE.UU. ("gov"), en el directorio "/ Blast/", en el archivo "blast_help.html". Los parámetros de búsqueda se definen del siguiente modo y se fijan ventajosamente a los parámetros definidos por defecto.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es el algoritmo de búsqueda heurística empleada por los programas blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx; estos programas atribuyen importancia a sus conclusiones utilizando los procedimientos estadísticos de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(6):2264 - 8 (véase el archivo "blast_help.html", como se ha descrito anteriormente) con unas pocas mejoras. Los programas BLAST se ajustaron para la búsqueda de similitud de secuencia, por ejemplo para identificar homólogos a una secuencia de consulta. Los programas generalmente no son útiles para la búsqueda de estilo motivo. Para una discusión de problemas básicos en la búsqueda de similitud de las bases de datos de secuencias, véase Altschul et al., (1994).

Los cinco programas BLAST disponibles en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica realizan las siguientes tareas:

- "blastp" compara una secuencia de consulta de aminoácidos contra una base de datos de secuencias de proteínas;
- "blastn" compara una secuencia de consulta de nucleótidos contra una base de datos de secuencias de nucleótidos;
- "blastx" compara los seis productos de traducción conceptual de marco de una secuencia de consulta de nucleótidos (ambas hebras) contra una base de datos de secuencias de proteínas;
- "tblastn" compara una secuencia de consulta de nucleótidos contra una base de datos de secuencias de nucleótidos traducida de forma dinámica en los seis marcos de lectura (ambas hebras),
- "tblastx" compara las traducciones de seis marcos de una secuencia de consulta de nucleótidos contra las traducciones de seis marcos de una base de datos de secuencia de nucleótidos.

BLAST utiliza los siguientes parámetros de búsqueda:

Visualización del HISTOGRAMA. Histograma de las puntuaciones para cada búsqueda; el valor predeterminado es sí. Véase el parámetro H en el Manual de BLAST).

5 DESCRIPCIONES Restringe el número de descripciones cortas de secuencias coincidentes con respecto al número especificado; el límite predeterminado es de 100 descripciones. (Véase el parámetro V en la página del manual). Véase también PREVISTO y CORTE.

10 ALINEACIONES Restringe las secuencias de bases de datos al número especificado para el que se notifican los pares de segmentos de alta puntuación (HSP); el límite por defecto es 50. Si se producen más secuencias de bases de datos para satisfacer el umbral de significación estadística para la presentación de informes (véase PREVISTO y CORTE más adelante), sólo se indican las coincidencias a las que se atribuye la mayor significación estadística (Véase el parámetro B en el Manual de BLAST).

15 PREVISTO El umbral de significación estadística para indicar coincidencias contra secuencias de la base de datos; el valor por defecto es 10, de tal manera que se espera encontrar 10 coincidencias simplemente por casualidad, de acuerdo con el modelo estocástico de Karlin y Altschul (1990). Si la significación estadística atribuida a una coincidencia es mayor que el umbral PREVISTO, la coincidencia no se indicará. Umbrales PREVISTOS menores son más rigurosos, lo que conduce a la notificación de menos coincidencias por casualidad. Los valores fraccionales son aceptables. (Véase el parámetro E en el Manual de BLAST).

20 CORTE Puntuación de corte para la notificación de pares de segmentos de puntuación alta. El valor por defecto se calcula a partir del valor PREVISTO (véase anteriormente). Los HSP se notifican para una secuencia de base de datos sólo si la significación estadística atribuida a ellos es por lo menos tan alta como se otorgaría a un HSP solo que tenga una puntuación igual al valor de CORTE, Valores de CORTE más altos son más rigurosos, lo que conduce a la notificación de menos coincidencias por casualidad. (Véase el parámetro S en el Manual de BLAST). Normalmente, los umbrales de significación se pueden gestionar de forma más intuitiva utilizando PREVISTO.

25 Especificar MATRIZ , una matriz de puntuación alternativa para BLASTP, BLASTX, TBLASTN y TBLASTX. La matriz por defecto es BLOSUM62 (Henikoff & Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(22):10915 - 9). Opciones alternativas válidas incluyen: PAM40, PAM 120, PAM250 e IDENTITY. No hay matrices de puntuación alternativas disponibles para BLASTN; al especificar la directiva MATRIZ en peticiones BLASTN devuelve una respuesta de error.

30 HEBRA Restringe una búsqueda TBLASTN a sólo la hebra superior o inferior de las secuencias de bases de datos; o restringe una búsqueda BLASTN, BLASTX o TBLASTX a sólo marcos de lectura en la hebra superior o inferior de la secuencia de consulta.

35 FILTRO Enmascara segmentos de la secuencia de consulta que tienen baja complejidad de composición, según lo determinado por el programa SEG de Wootton y Federhen (1993) Computers and Chemistry 17:149 – 163 o segmentos que consisten en repeticiones internas de baja periodicidad, tal como se determina por el programa XNU de Claverie & States, 1993, Computers and Chemistry 17:191 - 201, para BLASTN, por el programa DUST de Tatusov y Lipman (véase el sitio web del NCBI). La filtración puede eliminar informes estadísticamente significativos pero biológicamente no interesantes del resultado de blast (por ejemplo, coincidencias frente a regiones comunes ácidas, básicas o ricas en prolina), dejando las regiones biológicamente más interesantes de la secuencia de consulta disponibles para la coincidencia específica contra las secuencias de bases de datos.

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

45 El filtrado solo se aplica a la secuencia de consulta (o a sus productos de traducción), no a las secuencias de la base de datos. El filtrado por defecto es DUST para BLASTN, SEG para otros programas.

No es inusual que nada en absoluto sea enmascarado por SEG, XNU, o ambos, cuando se aplica a las secuencias en SWISS-PROT, por lo que no se debe esperar que el filtrado proporcione siempre un efecto. Además, en algunos casos, se enmascaran las secuencias en su totalidad, lo que indica que la significación estadística de las coincidencias indicadas contra la secuencia de consulta sin filtrar debe ser sospechosa.

50 NCBI-gi hace que los identificadores NCBI gi se muestren en el resultado, además del nombre de acceso y/o locus.

Lo más oreferentemente, las comparaciones de secuencia se realizan utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST simple proporcionado en la página web del NCBI descrita anteriormente, en el directorio "/ BLAST".

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que un experto en la técnica (p. ej., en cultivo celular, genética molecular,

química de ácido nucleico, técnicas de hibridación y bioquímica) entiende habitualmente. Para los procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos se usan técnicas convencionales (véase, en general, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc. – que se incorporan en la presente memoria descriptiva por referencia) y procedimientos químicos.

El TNFR1 es un receptor transmembrana que contiene una región extracelular que se une al ligando y un dominio intracelular que carece de la actividad de transducción de señal intrínseca pero que se puede asociar con las moléculas de transducción de señal. El complejo del TNFR1 con TNF unido contiene tres cadenas de TNFR1 y tres cadenas de TNF. (Banner *et al.*, *Cell*, 73(3) 431445 (1993).) El ligando TNF está presente como un fragmento, que está unido por tres cadenas de TNFR1. (Id.) Las tres cadenas de TNFR1 están agrupadas juntas en el complejo receptor-ligando y este agrupamiento es un requisito previo para la transducción de señal mediada por el TNFR1. De hecho, agentes multivalentes que se unen al TNFR1, tales como los anticuerpos anti-TNFR1, pueden inducir agrupación de TNFR1 y transducción de la señal en ausencia de TNF y normalmente se usan como agonistas del TNFR1. (Véase, *p.ej.*, Belka *et al.*, *EMBO*, 14(6):11561165 (1995); Mandik-Nayak *et al.*, *J. Immunol*, 167:19201928 (2001).) De acuerdo con esto, los agentes multivalentes que se unen al TNFR1 no suelen ser antagonistas eficaces del TNFR1 aunque bloqueen la unión de TNF α a TNFR1.

La región extracelular del TNFR1 comprende un segmento amino-terminal de trece aminoácidos (aminoácidos 113 de la SEC ID N° 603 (humana); aminoácidos 113 de la SEC ID N° 604 (de ratón)), el dominio 1 (aminoácidos 1453 de la SEC ID N° 603 (humana); aminoácidos 1453 de la SEC ID N° 604 (de ratón)), el dominio 2 (aminoácidos 5497 de la SEC ID N° 603 (humana); aminoácidos 54 - 97 de la SEC ID N° 604 (de ratón)), el dominio 3 (aminoácidos 98 - 138 de la SEC ID N° 603 (humana); aminoácidos 98 - 138 de la SEC ID N° 604 (de ratón)), y el dominio 4 (aminoácidos 139167 de la SEC ID N° 603 (humana); aminoácidos 139 - 167 de la SEC ID N° 604 (de ratón)), seguido de una región proximal a la membrana (aminoácidos 168 - 182 de la SEC ID N° 603 (humana); aminoácidos 168 - 183 de la SEC ID N° 604 (ratón)). (Véase, Banner *et al.*, *Cell* 73(3) 431 - 445 (1993) y Loetscher *et al.*, *Cell* 61(2) 351 - 359 (1990).) Los dominios 2 y 3 entran en contacto con el ligando unido (TNF β , TNF δ). (Banner *et al.*, *Cell*, 73(3) 431445 (1993).) La región extracelular del TNFR1 también contiene una región denominada dominio de ensamblaje de unión pre-ligando o dominio PLAD (aminoácidos 153 de la SEC IND N° 603 (humana); aminoácidos 1 - 53 de la SEC ID N° 604 (de ratón)) (Gobierno de EE.UU., documento WO 01/58953; Deng *et al.*, *Nature Medicine*, doi: 10.1038/nm1304 (2005)).

El TNFR1 se desprende de la superficie de las células *in vivo* a través de un proceso que incluye la proteólisis del TNFR1 en el dominio 4 o en la región proximal en la membrana (aminoácidos 168 - 182 de la SEC ID N° 603; aminoácidos 168 - 183 de la SEC ID N° 604) para producir una forma soluble del TNFR1. El TNFR1 SOLUBLE conserva la capacidad para unir TNF α y, de este modo, funciona como inhibidor endógeno de la actividad del TNF α .

La invención se refiere a un dAb) o ligando que se une a TNFR1 pero no compite con el TNF por la unión a TNFR1. Dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., dAb) o ligando proporciona ventajas como agentes diagnósticos y se pueden usar para unirse y detectar, cuantificar o medir el TNFR1 en una muestra pero no competirán con el TNF en la muestra por la unión a TNFR1. De acuerdo con esto se puede realizar una determinación precisa de si hay presente TNFR1 en la muestra o cuánto TNFR1 hay en la muestra.

El anticuerpo de dominio de la invención también se podría utilizar en un kit de diagnóstico para determinar si hay TNFR1 presente en una muestra o cuánto TNFR1 hay presente en una muestra, que comprende un dAb o ligando que se une TNFR1 pero no compite con el TNF por la unión a TNFR1 e instrucciones de uso (por ejemplo, para determinar la presencia y / o cantidad de TNFR1 en la muestra). El kit puede comprender además uno o más reactivos auxiliares, tales como un tampón adecuado o un reactivo de detección adecuado (por ejemplo, un anticuerpo marcado de forma detectable o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al dAb o ligando que se une al TNFR1 pero no compite con el TNF por la unión a TNFR1).

La invención se refiere a antagonistas de la invención que son antagonistas de TNFR1 (por ejemplo, ligandos descritos en el presente documento) que tienen especificidad de unión para el factor de necrosis tumoral receptor 1 (TNFR1; p55; CD120a). Preferentemente, los antagonistas de las invenciones no tienen especificidad de unión por el Factor de Necrosis Tumoral 2 (TNFR2) o no antagonizan sustancialmente el TNFR2. Un antagonista de TNFR1 no antagoniza sustancialmente el TNFR2 cuando el antagonista (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M o 100 μ M) da lugar a no más de aproximadamente un 5% de inhibición de la actividad mediada por TNFR2 inducida por TNF α (100 pg / ml) en un ensayo de células estándar. Antagonistas particularmente preferidos de TNFR1 son agentes terapéuticos eficaces para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas (son eficaces, tienen eficacia terapéutica). Por ejemplo, en algunas formas de realización, el antagonista de TNFR1 es eficaz en un modelo de enfermedad inflamatoria crónica, tal como el modelo de artritis inducida por colágeno en ratón, modelo Δ ARE de artritis en ratón, modelo de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por dextrano sulfato sódico en ratón, modelo Δ ARE de enfermedad intestinal inflamatoria en ratón, modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica inducida por humo de tabaco o un modelo en primates adecuado (por ejemplo, artritis inducida por colágeno en primates).

Los antagonistas del TNFR1 pueden ser monovalentes o multivalentes. En algunas formas de realización, el

antagonista es monovalente y contiene un sitio de unión que interacciona con TNFR1. Los antagonistas monovalentes se unen a un TNFR1 y no inducen reticulación ni agrupación de TNFR1 sobre la superficie de las células que puede conducir a la activación del receptor y la transducción de la señal.

En otras formas de realización, el antagonista de TNFR1 es multivalente. Los antagonistas multivalentes de TNFR1 pueden contener dos o más copias de un sitio de unión particular para TNFR1 o contener dos o más sitios de unión diferentes que se unen a TNFR1. Por ejemplo, como se ha descrito en la presente memoria descriptiva, el antagonista de TNFR1 puede ser un dímero, trímero o multímero, que comprende dos o más copias de un dAb concreto que se une a TNFR1, o dos o más dAb diferentes que se unen a TNFR1. Preferentemente, un antagonista multivalente de TNFR1 no tiene agonismo sustancial con TNFR1 (actúa como agonista de TNFR1) en un ensayo celular estándar (es decir, cuando está presente a una concentración de 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM o 5.000 µM, tiene como resultado en no más de aproximadamente 5% de la actividad mediada por TNFR1 inducida por TNFα (100 pg/ml) en el ensayo).

En ciertas formas de realización, el antagonista multivalente de TNFR1 contiene dos o más sitios de unión para un epítipo o dominio deseado de TNFR1.

En ciertas formas de realización, el antagonista multivalente de TNFR1 contiene dos o más sitios de unión que se unen a epítipos o dominios diferentes de TNFR1. En un ejemplo, el antagonista multivalente de TNFR1 puede comprender sitios de unión que se unen a dos o más epítipos o dominios deseados de TNFR1. Por ejemplo, los antagonistas multivalentes de TNFR1 pueden comprender sitios de unión para los dominios 1 y 4 de TNFR1. Preferentemente, dichos antagonistas multivalentes de TNFR1 no tienen agonismo con TNFR1 cuando están presentes a una concentración de 1 nM, o de aproximadamente 10 nM, o de aproximadamente 100 nM, o de aproximadamente 1 µM, o de aproximadamente 10 µM, en un ensayo estándar de citotoxicidad en L929 o un ensayo estándar con IL-8 en HeLa como se describe en el presente documento.

Los ligandos de la invención no inhiben la unión de TNFα a TNFR1. Dichos ligandos (y antagonistas) proporcionan ventajas como agentes diagnósticos porque pueden usarse para unirse y detectar, cuantificar o medir TNFR1 en una mezcla y no competirán con el TNF en la muestra por la unión a TNFR1. De acuerdo con esto se puede realizar una determinación precisa de si, o cuánto, TNFR1 hay en la muestra.

Los ligandos de la invención no inhiben la unión de TNFα a TNFR1, pero inhiben la transducción de señales mediada a través de TNFR1. Por ejemplo, un antagonista del TNFR1 puede inhibir la agrupación inducida por TNFα de TNFR1, que precede a la transducción de señales a través de TNFR1. Tales antagonistas proporcionan varias ventajas. Por ejemplo, en la presencia de un antagonista de este tipo, el TNFα puede unirse al TNFR1 expresado en la superficie de las células y eliminarse del entorno celular, pero la transducción de señales mediada por TNFR1 no se activará. Por tanto, la producción inducida por la señal de TNFR1 de TNFα adicional y otros mediadores de la inflamación se inhibirá. Del mismo modo, los antagonistas de TNFR1 que se unen a TNFR1 e inhiben la transducción de señales mediada a través de TNFR1, pero no inhiben la unión del TNFα a TNFR1, no inhibirán la actividad de unión a TNFα y de inhibición de TNFR1 soluble producido endógenamente. De acuerdo con lo anterior, la administración de dicho antagonista a un mamífero que lo necesite puede complementar las vías de regulación endógenas que inhiben la actividad del TNF-alfa y la actividad del TNFR1 *in vivo*. Los ligandos de la invención (i) se unen a TNFR1, (ii) no antagonizan la activación de la transducción de señales mediada por TNFR1 y (iii) no inhiben la unión del TNFα a TNFR1. Dicho ligando se une al TNFR1 soluble y no impiden que el receptor soluble se una al TNFα y, por lo tanto, la administración de dicho antagonista a un mamífero que lo necesite puede complementar las vías de regulación endógenas que inhiben la actividad del TNFα *in vivo* mediante el aumento de la semivida del receptor soluble en el suero. Estas ventajas son particularmente relevantes para los ligandos que se han formateado de modo que tengan un tamaño hidrodinámico más grande mediante, por ejemplo, unión de un grupo PEG, seroalbúmina, transferrina, receptor de transferrina o al menos la porción del mismo de unión a transferrina, una región Fc del anticuerpo, o mediante conjugación a un dominio de anticuerpo. Por ejemplo, un agente (por ejemplo, polipéptido) que i) se unen a TNFR1, (ii) no antagoniza la activación de la transducción de señales mediada por TNFR1, y (iii) no inhibe la unión de TNFα a TNFR1, tal como un monómero dAb, puede formatearse como un fragmento de un anticuerpo de unión al antígeno más grande o como y el anticuerpo (por ejemplo, con el formato de Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv). El tamaño hidrodinámico de un ligando y su semivida en suero también puede incrementarse mediante conjugación o unión de un agente de unión a TNFR1 (p. ej., anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a un antígeno o epítipo que aumenta la semivida *in vivo*, tal como se describe en el presente documento (véase el Anexo 1). Por ejemplo, el agente de unión a TNFR1 (por ejemplo, polipéptido) puede conjugarse o unirse a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-receptor de Fc neonatal, por ejemplo, un dAb anti-SA o anti-receptor de Fc neonatal, Fab, Fab' o scFv, o a un Affibody anti-SA o Affibody anti-receptor de Fc neonatal.

Ejemplos de la albúmina, fragmentos de albúmina o variantes de albúmina adecuados para uso en un ligando de unión a TNFR1-de acuerdo con la invención se describen en el documento WO 2005/077042A2. En particular, en la presente invención se pueden usar las siguientes albúmina, fragmentos de albúmina o variantes de albúmina:

- SEC ID N° 1 como se divulga en el documento WO 2005/077042A2.

- Fragmento o variante de albúmina que comprende o consta de los aminoácidos 1387 de la SEQ ID NO:1 en el documento WO 2005/077042A2;
- Albúmina o Fragmento o variante de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por: (a) los aminoácidos 54 a 61 de SEC ID N° 1 en el documento WO 2005/077042A2; (b) los aminoácidos 76 a 89 de SEC ID N° 1 en el documento WO 2005/077042A2; (c) los aminoácidos 92 a 100 de SEC ID N° 1 en el documento WO 2005/077042A2; (d) los aminoácidos 170 a 176 de SEC ID N° 1 en el documento WO 2005/077042A2; (e) los aminoácidos 247 a 252 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005/077042A2; (f) los aminoácidos 266 a 277 de SEC ID N° 1 en el documento WO 2005/077042A2; (g) los aminoácidos 280 a 288 de SEC ID N° 1 en el documento WO 2005/077042A2; (h) los aminoácidos 362 a 368 de SEC ID N° 1 en el documento WO 2005/077042A2; (i) los aminoácidos 439 a 447 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005/077042A2 (j) los aminoácidos 462 a 475 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005/077042A2; (k) los aminoácidos 478 a 486 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005/077042A2; (l) los aminoácidos 560 a 566 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005/077042A2.

Ejemplos adicionales de albúmina, fragmentos y análogos adecuados para uso en un ligando de unión a TNFR1 de acuerdo con la invención se describen en el documento WO 03/076567A2, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En particular, en la presente invención se pueden usar las siguientes albúmina, fragmentos o variantes:

- Seroalbúmina humana como se describe en el documento WO 03/076567A2, por ejemplo en la figura 3
- Seroalbúmina humana (HA) constituida por polipéptido no glicosilado de cadena sencilla de 585 aminoácidos con un peso molecular de 66,500 (véase Meloun, *et al.*, *FEBS Letters* 58:136 (1975); Behrens, *et al.*, *Fed. Proc.* 34:591 (1975); Lawn, *et al.*, *Nucleic Acids Research* 9:61026114 (1981); Minghetti, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261:6747 (1986));
- Una variante o análogo o fragmento polimórfico de albúmina tal como se describe en Weitkamp, *et al.*, *Ann. Hum. Genet.* 37:219 (1973);
- Un fragmento o variante de albúmina como se describe en el documento EP 322094, por ejemplo HA(1 - 373., HA(1 - 388), HA(1 - 389), HA(1 - 369) y HA(1 - 419) y fragmentos entre 1 - 369 y 1 - 419;
- Un fragmento o variante de albúmina como se describe en el documento EP 399666, por ejemplo HA(1 - 177) y HA(1 - 200) y fragmentos entre HA(1-X), en el que X es cualquier número de 178 a 199.

Cuando (uno o más) restos de extensión de la semivida (p. ej., albúmina, transferrina y fragmentos y análogos de las mismas) se usan para formatear los ligandos de unión a TNFR1 de la invención, se pueden conjugar usando cualquier procedimiento adecuado, tal como, mediante fusión directa con el resto de unión a TNFR1 (p. ej., dAb anti-TNFR1 o fragmento de anticuerpo), por ejemplo usando una construcción de un único nucleótido que codifica una proteína de fusión, en la que la proteína de fusión está codificada en forma de una cadena polipeptídica sencilla con el resto de extensión de la semivida localizado en los extremos N o C del resto de unión a TNFR1. Como alternativa, la conjugación se puede conseguir usando un ligador peptídico entre los restos, por ejemplo un ligador peptídico como se describe en los documentos WO 03/076567A2 o WO 2004/003019.

Algunos ligandos de la invención se unen al TNFR1 humano y al TNFR1 de ratón. Tales ligandos (por ejemplo, antagonistas, monómeros de dAb) proporcionan la ventaja de permitir los estudios preclínicos y clínicos utilizando el mismo ligando y evitan la necesidad de llevar a cabo estudios preclínicos con un ligando sustituto adecuado.

Preferentemente, el antagonista de TNFR1 es un ligando como se describe en el presente documento. Los ligandos comprenden un anticuerpo de dominio (dAb) que tiene especificidad de unión por TNFR1. El ligando puede ser un polipéptido que consta de dicho dAb, o consta esencialmente de dicho dAb. El ligando puede ser también un polipéptido que comprende un dAb en un formato adecuado, tal como un formato de anticuerpo (p. ej., un formato de tipo IgG, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂), o un ligando de especificidad doble que comprende un dAb que se une a TNFR1 y un segundo dAb que se une a otra proteína, antígeno o epítipo diana (p. ej., seroalbúmina) o un ligando multiespecífico como se describe en el presente documento.

Los antagonistas de TNFR1 de la divulgación, incluyendo los ligandos de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención, así como los monómeros de dAb útiles en la construcción de tales ligandos, pueden disociarse de manera ventajosa de su(s) objetivo(s) afín con una K_d de 300 nM a 5 pM (es decir, de 3 x 10⁻⁷ a 5 x 10⁻¹²M), preferentemente de 50 nM a 20 pM, o de 5 nM a 200 pM o de 1 nM a 100 pM, 1 x 10⁻⁷M o menos, 1 x 10⁻⁸M o menos, 1 x 10⁻⁹M o menos, 1 x 10⁻¹⁰M o menos, 1 x 10⁻¹¹M o menos; y / o una constante de velocidad K_{off} de 5 x 10⁻¹s⁻¹ a 1 x 10⁻⁷s⁻¹, preferentemente 1 x 10⁻²s⁻¹ a 1 x 10⁻⁶s⁻¹ o de 5 x 10⁻³s⁻¹ a 1 x 10⁻⁵s⁻¹, o 5 x 10⁻¹s⁻¹ o menos o 1 x 10⁻²s⁻¹ o menos, o 1 x 10⁻³s⁻¹ o menos o 1 x 10⁻⁴s⁻¹ o menos, o 1 x 10⁻⁵s⁻¹ o menos, o 1 x 10⁻⁶s⁻¹ o menos como se determina mediante resonancia de plasmón superficial. La constante de velocidad K_d se define como K_{off}/K_{on}.

En otras formas de realización, el antagonista de la divulgación se une a TNFR1 e inhibe una (es decir, una o más) función de TNFR1 (por ejemplo, la agrupación de receptores, la señalización del receptor o la unión de TNFα a TNFR1) y también se une a otro miembro de la superfamilia de los receptores de TNF. Preferentemente, este tipo de antagonista también inhibe una función (por ejemplo, agrupación de miembros, la señalización o la unión del miembro a su ligando afín) del otro miembro de la superfamilia de receptores de TNF. La superfamilia de los

receptores de TNF es un grupo de proteínas reconocido en la técnica que incluye TNFR1 (p55, CD120a, p60, el miembro 1A de la superfamilia de los receptores de TNF, TNFRSF1A), TNFR2 (p75, p80, CD120b, el miembro 1B de la superfamilia de los receptores de TNF, TNFRSF1B), CD 18 (TNFRSF3, LTBR, TNFR2-RP, TNFR-RP, TNFCR, TNF-R-III), OX40 (TNFRSF4, ACT35, TXGP1L), CD40 (TNFRSF5, p50, Bp50), Fas (CD95, TNFRSF6, APO-1, APTI), DcR3 (TNFRSF6B), CD27 (TNFRSF7, Tp55, S152), CD30 (TNFRSF8, Ki-1, D1S166E), CD137 (TNFRSF9, 4-1BB, ILA), TRAILR-1 (TNFRSF10A, DR4, Apo2), TRAILR2 (TNFRSF10B, DR5, KILLER, TRICK2A, TRICKB), TRAILR3 (TNFRSF10C, DcR1, LIT, TRID), TRAILR4 (TNFRSF10D, DcR2, TRUND), RANK (TNFRSF11A), OPG (TNFRSF11B, OCIF, TR1), DR3 (TNFRSF12, TRAMP, WSL-1, LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3), DR3L (TNFRSF12L), TAC1 (TNFRSF13B), BAFFR (TNFRSF13C), HVEM (TNFRSF14, ATAR, TR2, LIGHTR, HVEA), NGFR (TNFRSF16), BCMA (TNFRSF 17, BCM), AITR (TNFRSF18, GTR), TNFRSF19, FLJ14993 (TNFRSF19L, RELT), DR6 (TNFRSF21), SOBa (TNFRSF22, Tnfrh2, 2810028K06Rik), mSOB (TNFRSF23, Tnfrh1). En algunas formas de realización, el antagonista comprende un primer dAb que se une a TNFR1 e inhibe una función de TNFR1 y un segundo dAb que se une a otro miembro de la superfamilia de receptores de TNF, tales como TNFR2 (CD120b), OX40, CD40, Fas (CD95), TRAILR-1, TRAILR-2, TAC1, BCMA y similares como se ha indicado anteriormente. En algunas formas de realización, el antagonista comprende un primer dAb que se une a TNFR1 e inhibe una función (por ejemplo agrupamiento receptor, señalización del receptor o unión de TNF α a TNFR1) de TNFR1 y también se une a otro miembro de la superfamilia de receptores de TNF, tales como TNFR2 (CD120b), OX40, CD40, Fas (CD95), TRAILR-1, TRAILR-2, TAC1, BCMA y similares como se ha indicado anteriormente.

Ligandos y monómeros de dAb que se unen a TNFR1

La divulgación proporciona ligandos que comprenden un monómero de dAb anti-TNFR1 (por ejemplo, ligando de doble especificidad que comprende dicho dAb) con un K_d de 300 nM a 5 pM (es decir 3×10^{-7} to 5×10^{-12} M), preferentemente de 50 nM a 20 pM, más preferentemente de 5 nM a 200 pM y lo más preferentemente de 1 nM a 100 pM, por ejemplo 1×10^{-7} M o menos, preferentemente 1×10^{-8} M o menos, más preferentemente 1×10^{-9} M o menos, de forma ventajosa 1×10^{-10} M o menos y lo más preferentemente 1×10^{-11} M o menos; y / o una constante de velocidad K_{off} de $5 \times 10^{-1} s^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} s^{-1}$, preferentemente $1 \times 10^{-2} s^{-1}$ a $1 \times 10^{-6} s^{-1}$, lo más preferentemente de $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ a $1 \times 10^{-5} s^{-1}$, por ejemplo $5 \times 10^{-1} s^{-1}$ o menos, preferentemente $1 \times 10^{-2} s^{-1}$ o menos, de forma ventajosa $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ o menos, más preferentemente $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ o menos, todavía más preferentemente $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ o menos y lo más preferentemente $1 \times 10^{-6} s^{-1}$ o menos como se determina mediante resonancia de plasmón superficial.

Preferentemente, el ligando o el monómero de dAb inhibe la unión de TNF alfa al receptor 1 del TNF alfa (receptor p55) con una concentración inhibitoria al 50% (CI50) de 500 nM a 50 pM, preferentemente de 100 nM a 50 pM, más preferentemente de 10 nM a 100 pM, ventajosamente de 1 nM a 100 pM; por ejemplo 50 nM o menos, preferentemente 5 nM o menos, más preferentemente 500 pM o menos, ventajosamente 200 pM o menos, y lo más preferentemente 100 pM o menos. Preferentemente, el objetivo del receptor 1 del TNF es TNF α humano.

Preferentemente, el ligando o dAb se une al TNFR1 humano e inhibe la unión del TNF alfa humano a TNFR1 humano o inhibe la señalización a través del TNFR1 en respuesta a la unión del TNF alfa. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ligando o monómero de dAb pueden unirse a TNFR1 e inhibir la señalización mediada por TNFR1, pero no inhibe sustancialmente la unión de TNF α a TNFR1. En algunas realizaciones, el ligando o monómero de dAb de la invención inhibe la reticulación o agrupamiento del TNFR α inducida TNFR1 en la superficie de una célula. Tales ligandos o dAb (por ejemplo, TAR2m-21-23 descrito en el presente documento) son ventajosos porque pueden antagonizar el TNFR1 de la superficie de la célula, pero no reducir sustancialmente la actividad inhibitoria del TNFR1 soluble endógeno. Por ejemplo, el ligando o dAb puede unirse a TNFR1, pero inhibir la unión de TNF α a TNFR1 en un ensayo de unión al receptor en no más que alrededor del 10%, no más de aproximadamente el 5%, no más de aproximadamente el 4%, no más de aproximadamente el 3 %, no más de aproximadamente el 2%, o no más de aproximadamente el 1%. Además, en estas realizaciones, el ligando o dAb inhibe la reticulación de TNFR1 inducida por TNF α y/o la señalización mediada por TNFR1 en un ensayo de células estándar en al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99%.

El ligando puede ser monovalente (por ejemplo, un monómero dAb) o multivalente (por ejemplo, doble especificidad, multispecifico) como se describe en el presente documento.

En otras formas de realización, el ligando de la invención es multivalente y comprende dos o más monómeros de dAb que se unen a TNFR1. Los ligandos multivalentes pueden contener dos o más copias de un dAb concreto que se une a TNFR1 o contener dos o más dAb que se unen a TNFR1. Por ejemplo, como se ha descrito en el presente documento, el ligando puede ser un dímero, trímero o multímero, que comprende dos o más copias de un dAb concreto que se une a TNFR1, o dos o más dAb diferentes que se unen a TNFR1. En algunos ejemplos, el ligando es un homodímero u homotrímero que comprende dos o tres copias de un dAb particular que se une a TNFR1, respectivamente. Preferentemente, un ligando multivalente de TNFR1 no tiene agonismo sustancial con TNFR1 (actúa como agonista de TNFR1) en un ensayo celular estándar (es decir, cuando está presente a una concentración de 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M o 5.000 μ M, tiene como resultado en no más de aproximadamente 5% de la actividad mediada por TNFR1 inducida por TNF α (100 pg/ml) en el ensayo).

En ciertas formas de realización, el ligando multivalente contiene dos o más dAb que se unen al epítipo o dominio deseado de TNFR1.

En otras formas de realización, el ligando multivalente contiene dos o más dAb que se unen a diferentes epítopos o dominios de TNFR1.

5 Otros ligandos o monómeros de dAb no inhiben la unión de TNF α a TNFR1. Dichos antagonistas proporcionan ventajas como agentes diagnósticos porque pueden usarse para unirse y detectar, cuantificar o medir TNFR1 en una mezcla y no competirán con el TNF en la muestra por la unión a TNFR1. De acuerdo con esto se puede realizar una determinación precisa de si, o cuánto, TNFR1 hay en la muestra.

10 Algunos ligandos y monómeros de dAb no inhiben la unión de TNF α a TNFR1, pero inhiben la transducción de señales mediada a través de TNFR1. Por ejemplo, un ligando o monómero de dAb puede inhibir la agrupación inducida por TNF α de TNFR1, que precede a la transducción de señales a través de TNFR1. Tales ligandos o monómeros de dAb proporcionan varias ventajas, como se discute en el presente documento con respecto a los antagonistas que tienen estas propiedades. En realizaciones particulares, el ligando o el monómero de dAb de este tipo se une al dominio 1 del TNFR1 o al dominio 4 del TNFR1. En ciertas realizaciones, el ligando es un monómero de dAb que se une al dominio 4 del TNFR1.

15 Preferentemente, el ligando o el monómero de dAb neutraliza (inhibe la actividad de) el TNF α o el TNFR1 en un ensayo estándar (p. ej., los ensayos con HeLa estándar o con L929 estándar descritos en el presente documento) con una dosis neutralizante 50 (DN50) de 500 nM a 50 pM, preferentemente de 100 nM a 50 pM, más preferentemente de 10 nM a 100 pM, ventajosamente de 1 nM a 100 pM; por ejemplo 50 nM o menos, preferentemente 5 nM o menos, más preferentemente 500 pM o menos, ventajosamente 200 pM o menos, y lo más preferentemente 100 pM o menos.

20 En ciertas realizaciones, el ligando o monómero DE dAb se une específicamente al freceptor 1 del factor de necrosis tumoral humano (TNFR1; P55) y se disocia del TNFR1 humano con una constante de disociación (K_d) de 50 nM a 20 pM, y una constante de velocidad K_{off} de $5 \times 10^{-1} s^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} s^{-1}$, como se determina mediante resonancia de plasmón superficial.

25 En otras formas de realización, el ligando o el monómero de dAb se une específicamente TNFR1 con una K_d descrita en el presente documento e inhibe la letalidad en un modelo de shock séptico inducido por LPS/D-galactosamina de ratón estándar (es decir, impide o reduce la letalidad en al menos aproximadamente 10%, en comparación con un control adecuado). Preferentemente, el monómero de dAb inhibe la letalidad en al menos aproximadamente un 25%, o en al menos aproximadamente un 50%, en comparación con un control adecuado en un modelo de shock séptico inducido por LPS/D-galactosamina de ratón estándar cuando se administra a aproximadamente 5 mg / kg o más preferentemente de aproximadamente 1 mg / kg.

30 En otras formas de realización, el el ligando o monómero de dAb se une a TNFR1 y antagoniza la actividad del TNFR1 en un ensayo celular estándar con una DN50 de ≤ 100 nM, y a una concentración de $\leq 10 \mu M$, el dAb agoniza la actividad del TNFR1 en ≤ 5 % en el ensayo.

En realizaciones particulares, el ligando o monómero de dAb no agonizan sustancialmente el TNFR1 (actúa como agonista de TNFR1) en un ensayo celular estándar (es decir, cuando está presente a una concentración de 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1000 μM o 5.000 μM , tiene como resultado en no más de aproximadamente 5% de la actividad mediada por TNFR1 inducida por TNF α (100 pg/ml) en el ensayo).

40 En ciertas realizaciones, el ligando o monómero de dAb es sustancialmente resistente a la agregación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente el 9%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 7%, menos de aproximadamente 6%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente 2% o menos de aproximadamente 1% del ligando o agregados de monómero de dAb cuando una solución de 1-5 mg / ml, 5-10 mg / ml, 10-20 mg / ml, 20-50 mg / ml, 50-100 mg / ml, 100-200 mg / ml o 200 - 500 mg / ml de ligando o dAb en un disolvente que se utiliza rutinariamente para la formulación de fármacos, tales como solución salina, solución salina tamponada, solución salina tamponada con citrato, agua, una emulsión, y, cualquiera de estos disolventes con un excipiente aceptable tal como los aprobados por la FDA, se mantiene a aproximadamente 22 ° C, 22-25 ° C, 25-30 ° C, 30-37 ° C, 37 - 40 ° C, 40-50 ° C, 50-60 ° C, 60-70 ° C, 70-80 ° C, 15-20 ° C, 10-15 ° C, 5-10 ° C, 2-5 ° C, 0-2 ° C, -10 ° C a 0 ° C, -20 ° C a -10 ° C, -40 ° C a -20 ° C, -60 ° C a -40 ° C, o -80 ° C a -60 ° C, durante un período de tiempo de, por ejemplo, aproximadamente 10 minutos, 1 hora, 8 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 1 año o 2 años.

55 La agregación se puede evaluar utilizando cualquier procedimiento adecuado, tal como, por microscopia, evaluación de la turbidez de una solución mediante inspección visual o espectroscopia o cualquier otro procedimiento adecuado. Preferentemente, la agregación se evalúa mediante dispersión de luz dinámica. Ligandos o monómeros de dAb que son resistentes a la agregación proporcionan varias ventajas. Por ejemplo, tales ligandos o monómeros de dAb pueden producirse fácilmente con un alto rendimiento como proteínas solubles mediante expresión utilizando

un sistema de producción biológico adecuado, tal como *E. coli*, y se pueden formular y / o almacenar a concentraciones superiores a las de los polipéptidos convencionales, y con menos agregación y pérdida de actividad.

Además, los ligandos o monómeros de dAb que son resistentes a la agregación pueden producirse de manera más económica que otros polipéptidos de unión a antígeno o de unión a epítipo (por ejemplo, anticuerpos convencionales). Por ejemplo, en general, la preparación de polipéptidos de unión a antígeno o de unión a epítipo destinados a aplicaciones *in vivo* incluyen procesos (por ejemplo, filtración en gel) que eliminan polipéptidos agregados. Si no se retiran dichos agregados puede dar lugar a una preparación que no es adecuada para aplicaciones *in vivo* porque, por ejemplo, los agregados de un polipéptido de unión a antígeno destinado a actuar como antagonista pueden funcionar como agonista mediante la inducción de la reticulación o agrupación del antígeno diana. Los agregados de proteínas también pueden reducir la eficacia del polipéptido terapéutico mediante la inducción de una respuesta inmunitaria en el sujeto al que se administran.

En contraste, los ligandos resistentes o monómeros de dAb resistentes a la agregación de la invención se pueden preparar para aplicaciones *in vivo* sin la necesidad de incluir las etapas del proceso que eliminan los agregados, y se pueden utilizar en aplicaciones *in vivos* sin las desventajas mencionadas anteriormente causadas por los agregados de polipéptido.

En algunas formas de realización, el ligando o monómero de dAb se despliega de forma reversible cuando se calienta a una temperatura (T_s) y se enfría hasta una temperatura (T_c), en el que la T_s es mayor que la temperatura de fusión (T_m) del dAb y la T_c es inferior a la de temperatura de fusión del dAb. Por ejemplo, el monómero de dAb puede desplegarse de forma reversible cuando se calienta a 80 ° C y se enfría hasta aproximadamente la temperatura ambiente. Un polipéptido que se despliega de forma reversible pierde función cuando se despliega, pero recupera la función cuando se vuelve a plegar. Estos polipéptidos se distinguen de los polipéptidos que se agregan cuando están desplegados o cuando se vuelven a plegar incorrectamente (polipéptidos mal plegados), es decir, no recuperan la función.

El desplegamiento y replegamiento de los polipéptidos se puede evaluar, por ejemplo, mediante la detección directa o indirecta de la estructura del polipéptido usando cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, la estructura del polipéptido puede detectarse mediante dicroísmo circular (DC) (*por ejemplo*, DC en el UV lejano o DC en el UV cercano), fluorescencia (*por ejemplo*, fluorescencia de las cadenas laterales de triptófano), la susceptibilidad a la proteólisis, resonancia magnética nuclear (RMN), o mediante detección o medición de una función del polipéptido que depende del plegamiento apropiado (por ejemplo, unión a un ligando objetivo, unión al ligando genérico). En un ejemplo, el desplegamiento del polipéptido se evalúa utilizando un ensayo funcional en el que la pérdida de la función de unión (*por ejemplo*, unión a un ligando genérico y / o diana, unión a un sustrato) indica que el polipéptido se ha desplegado.

El grado de desplegamiento y replegamiento de un ligando o monómero de dAb puede determinarse utilizando una curva de desnaturalización o desplegamiento. Se puede producir una curva de desplegamiento representando la temperatura como la ordenada y la concentración relativa del polipéptido plegado como la abscisa. La concentración relativa del ligando plegado o monómero de dAb se puede determinar directa o indirectamente usando cualquier procedimiento adecuado (*por ejemplo*, DC, fluorescencia, ensayo de unión). Por ejemplo, una solución de ligando o de monómero de dAb se puede preparar y determinar la elipticidad de la solución determinada mediante DC. El valor de la elipticidad obtenido representa una concentración relativa de ligando plegado o monómero de dAb de 100%. El ligando o monómero de dAb en la solución se despliega después elevando de forma creciente la temperatura de la solución y la elipticidad se determina en incrementos adecuados (*por ejemplo*, después de cada aumento de un grado en la temperatura). El ligando o monómero de dAb en la solución se vuelve a plegar después reduciendo de forma creciente la temperatura de la solución y la elipticidad se determina en incrementos adecuados. Los datos se pueden representar para producir una curva de desplegamiento y una curva de replegamiento. Las curvas de desplegamiento y replegamiento tienen una forma sigmoidal característica que incluye una porción en la que las moléculas de ligando o de monómero de dAb se pliegan, una transición despliegue / replegamiento en la que las moléculas de ligando o monómero de dAb se despliegan en diversos grados y una porción en la que las moléculas de ligando o monómero de dAb se despliegan. La intersección del eje y de la curva de replegamiento es la cantidad relativa del ligando o monómero de dAb recuperado. Una recuperación de al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60%, o al menos aproximadamente 70%, o al menos aproximadamente 75%, o al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95% es indicativa de que el ligando o el monómero de dAb se despliegan de forma reversible.

En una realización preferida, la reversibilidad del despliegue del ligando o monómero de dAb se determina mediante la preparación de una solución de ligando o de monómero de dAb y la representación de las curvas de desplegamiento y replegamiento con calor. la solución de ligando o de monómero de dAb se puede preparar en cualquier disolvente adecuado, tal como un tampón acuoso que tiene un pH adecuado para permitir que el ligando o monómero de dAb se disuelvan (*por ejemplo*, pH que es de aproximadamente 3 unidades por encima o por debajo del punto isoeléctrico (pI)). La solución de ligando o de monómero de dAb concentra lo suficiente para permitir la detección del desplegamiento/plegamiento. Por ejemplo, la solución de ligando o de monómero de dAb puede ser de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 μM o preferentemente de aproximadamente 1 μM a

aproximadamente 10 μ M.

Si se conoce la temperatura de fusión (T_m) del ligando o monómero de dAb, la solución se puede calentar a aproximadamente diez grados por debajo de la T_m (T_m-10) y el plegamiento se evalúa mediante elipticidad o fluorescencia (por ejemplo, DC en el UV lejano de 200 nm a 250 nm, DC de longitud de onda fija a 235 nm o 225 nm; espectros de emisión fluorescente de triptófano a 300 a 450 nm con excitación a 298 nm) para proporcionar un ligando o monómero de dAb con un plegamiento relativo del 100%. La solución se calienta a continuación a por lo menos diez grados por encima de la T_m ($T_m +10$) en incrementos predeterminados (*por ejemplo*., incrementos de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 grado), y la elipticidad o la fluorescencia se determinan en cada incremento. Entonces, el ligando o monómero de dAb se repliega por enfriamiento hasta al menos T_m-10 en incrementos predeterminados y elipticidad o fluorescencia determinada en cada incremento. Si no se conoce la temperatura de fusión del ligando o el monómero de dAb, la solución se puede desplegar mediante el calentamiento incremental de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 100 °C y después se vuelve a plegar mediante enfriamiento creciente hasta al menos aproximadamente 25 °C, y se determinan la elipticidad o fluorescencia en cada incremento de calentamiento y refrigeración. Los datos obtenidos se pueden representar para producir una curva de desplegamiento y una curva de replegamiento, en la que la intersección del eje y de la curva de replegamiento es la cantidad relativa de proteína replegada recuperada.

En ciertas formas de realización, los ligandos o monómeros de dAb o antagonista de la invención son eficaces en modelos de enfermedades inflamatorias crónicas cuando se administra una cantidad eficaz. En general, una cantidad eficaz es de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg (e.g., aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg). Los expertos en la técnica reconocen los modelos de enfermedad inflamatoria crónica como predictivos de la eficacia terapéutica en seres humanos. La técnica anterior no sugiere el uso de antagonistas de TNFR1 (por ejemplo, antagonistas monovalentes, ligandos tal como se describe en el presente documento) en estos modelos, o a menos que fueran eficaces.

En ciertas formas de realización, el ligando o monómero de dAb es eficaz en el modelo estándar de artritis inducida por colágeno en ratones (Ejemplo 15A). Por ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede reducir la puntuación media de artritis de la suma de las cuatro extremidades en el modelo estándar de artritis inducida por colágeno en ratones, por ejemplo en aproximadamente 1 a aproximadamente 16, aproximadamente 3 a aproximadamente 16, aproximadamente 6 a aproximadamente 16, aproximadamente 9 a aproximadamente 16 o aproximadamente 12 a aproximadamente 16, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede retrasar el inicio de los síntomas de artritis en el modelo estándar de artritis inducida por colágeno en ratones, por ejemplo en aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días o aproximadamente 28 días, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede resultar en una puntuación media de artritis de la suma de las cuatro extremidades en el modelo estándar de artritis inducida por colágeno en ratones de 0 a aproximadamente 3, aproximadamente 3 a aproximadamente 5, aproximadamente 5 a aproximadamente 7, aproximadamente 7 a aproximadamente 15, aproximadamente 9 a aproximadamente 15, aproximadamente 10 a aproximadamente 15, aproximadamente 12 a aproximadamente 15, o aproximadamente 14 a aproximadamente 15.

En otras formas de realización, el ligando o monómero de dAb es eficaz en el modelo Δ ARE de artritis en ratón (Ejemplo 15B). Por ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede reducir la puntuación media de artritis en el modelo Δ ARE de artritis en ratones, por ejemplo en aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5, aproximadamente a aproximadamente 2,5, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede retrasar el inicio de los síntomas de artritis en el en el modelo Δ ARE de artritis en ratones, por ejemplo, en aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días o aproximadamente 28 días, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede tener como resultado una puntuación media de artritis en el modelo Δ ARE de artritis en ratones de 0 a aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1, aproximadamente a aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5.

En otras formas de realización, el ligando o monómero de dAb es eficaz en el modelo Δ ARE de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en ratón (Ejemplo 15B). Por ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede reducir la puntuación media de inflamación aguda y/o crónica en el modelo Δ ARE de EII en ratones, por ejemplo en aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5, aproximadamente a aproximadamente 2,5, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede retrasar el inicio de los síntomas de EII en el en el modelo Δ ARE de EII en ratones, por ejemplo, en aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días,

aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días o aproximadamente 28 días, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede tener como resultado una puntuación media de inflamación aguda y/o crónica en el modelo Δ ARE de EII en ratones de 0 a aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1, aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5.

En otras formas de realización, el ligando o monómero de dAb es eficaz en el modelo de EII inducida por dextrano sulfato sódico (DSS) en ratón (Ejemplo 15C). Por ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede reducir la puntuación media de la gravedad en el modelo DSS de EII en ratones, por ejemplo en aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5, aproximadamente a aproximadamente 2,5, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede retrasar el inicio de los síntomas de EII en el en el modelo DSS de EII en ratones, por ejemplo, en aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días o aproximadamente 28 días, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede tener como resultado una puntuación media de gravedad en el modelo DSS de EII en ratones de 0 a aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1, aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5.

En formas de realización concretas, el ligando o monómero de dAb es eficaz en el modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) inducida por el humo de tabaco en ratones (Ejemplo 15D). Por ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede reducir o retrasar el inicio de los síntomas de EPOC, comparación con un control adecuado.

En otras formas de realización, el ligando comprende un anticuerpo de dominio (dAb) monómero que se une específicamente del receptor I del factor de necrosis tumoral I (TNFR1, p55, CD120a) con una K_d de 300 nM a 5 pM, y comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% homóloga a la secuencia de aminoácidos o un dAb que es TAR2h-205 (SEC ID N° 627).

También se describen en el presente documento ligandos que comprenden un monómero de dAb que se une a TNFR1 y que compite con cualquiera de los dAb divulgados en el presente documento para la unión a TNFR1 (por ejemplo, TNFR1 de ratón y/o ser humano).

Preferentemente, el ligando o monómero de dAb se secreta en una cantidad de al menos aproximadamente 0,5 mg/l cuando se expresa en *E. coli* o en especies de *Pichia* (p. ej., *P. pastoris*). En otras realizaciones preferidas, el monómero de dAb se secreta en una cantidad de al menos aproximadamente 0,75 mg / l, por lo menos aproximadamente 1 mg / l, por lo menos aproximadamente 4 mg / l, por lo menos aproximadamente 5 mg / l, por lo menos aproximadamente 10 mg / l, por lo menos aproximadamente 15 mg / l, por lo menos aproximadamente 20 mg / l, por lo menos aproximadamente 25 mg / l, por lo menos aproximadamente 30 mg / l, por lo menos aproximadamente 35 mg / l, por lo menos aproximadamente 40 mg / l, al menos aproximadamente 45 mg / l, o al menos aproximadamente 50 mg / l, o al menos aproximadamente 100 mg / l, o al menos aproximadamente 200 mg / l, o al menos aproximadamente 300 mg / l, o al menos aproximadamente 400 mg / l, o al menos aproximadamente 500 mg / l, o al menos aproximadamente 600 mg / l, o al menos aproximadamente 700 mg / l, o al menos aproximadamente 800 mg / l, al menos aproximadamente 900 mg / l, o al menos alrededor de 1 g / l cuando se expresa en *E. coli* o en especies de *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*). En otras realizaciones preferidas, el monómero de dAb se secreta en una cantidad de al menos aproximadamente 1 mg/l a al menos aproximadamente 1g/l, de al menos aproximadamente 1 mg/l a al menos aproximadamente 750 mg/l, de al menos aproximadamente 100 mg/l a al menos aproximadamente 1 g/l, de al menos aproximadamente 200 mg/l a al menos aproximadamente 1 g/l, de al menos aproximadamente 300 mg/l a al menos aproximadamente 1 g/l, de al menos aproximadamente 400 mg/l a al menos aproximadamente 1 g/l, de al menos aproximadamente 500 mg/l a al menos aproximadamente 1g/l, de al menos aproximadamente 600 mg/l a al menos aproximadamente 1 g/l, de al menos aproximadamente 700 mg/l a al menos aproximadamente 1 g/l, de al menos aproximadamente 800 mg/l a al menos aproximadamente 1g/l, o de al menos aproximadamente 900 mg/l a al menos aproximadamente 1g/l cuando se expresa en *E. coli* o en especies de *Pichia* (p. ej., *P. pastoris*). Aunque los ligandos y monómeros de dAb descritos en la presente memoria descriptiva se pueden secretar cuando se expresan en *E. coli* o en especies de *Pichia* (e.g., *P. pastoris*), se pueden producir usando cualquier procedimiento adecuado, tal como procedimientos químicos sintéticos o procedimientos de producción biológica que no emplean *E. coli* o especies de *Pichia*.

El monómero de dAb puede comprender cualquier dominio variable de inmunoglobulina adecuado y, preferentemente, comprende un dominio variable humano o un dominio variable que comprende regiones marco humanas. En ciertas formas de realización, el monómero de dAb comprende un marco universal, como se ha

descrito en el presente documento.

El marco universal puede ser un marco V_L (V_L o V_k), tal como un marco que comprende las secuencias de aminoácidos marco codificadas por el segmento génico de inmunoglobulina de la línea germinal humana DPK1, DPK2, DPK3, DPK4, DPK5, DPK6, DPK7, DPK8, DPK9, DPK10, DPK12, DPK13, DPK15, DPK16, DPK18, DPK19, DPK20, DPK21, DPK22, DPK23, DPK24, DPK25, DPK26 o DPK 28. Si se desea, el marco V_H puede comprender además la secuencia de aminoácidos del marco codificada por el segmento génico de inmunoglobulina de la línea germinal humana J_k1 , J_k2 , J_k3 , J_k4 o J_k5 .

En otras realizaciones, el marco universal puede ser un marco V_H , tal como un marco que comprende las secuencias de aminoácidos marco codificadas por el segmento génico de inmunoglobulina de la línea germinal humana DP4, DP7, DP8, DP9, DP10, DP31, DP33, DP38, DP45, DP46, DP47, DP49, DP50, DP51, DP53, DP54, DP65, DP66, DP67, DP68 o DP69. Si se desea, el marco V_H puede comprender además la secuencia de aminoácidos del marco codificada por el segmento génico de inmunoglobulina de la línea germinal humana J_H1 , J_H2 , J_H3 , J_H4 , J_H4b , J_H5 y J_H6 .

En realizaciones particulares, el ligando monómero de dAb comprende el DPK9 V_L o un marco V_H seleccionado de entre el grupo que consiste en DP47, DP45 y DP38.

El monómero de dAb puede comprender un sitio de unión para un ligando genérico, tal como proteína A, proteína L y proteína G.

En ciertas realizaciones, el monómero de dAb comprende una o más regiones marco que comprenden una secuencia de aminoácidos que es la misma que la secuencia de aminoácidos de una región marco correspondiente codificada por un segmento génico de anticuerpo de la línea germinal humana, o las secuencias de aminoácidos de uno o más de dichas regiones marco colectivamente comprenden hasta 5 diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos de dicha región marco correspondiente codificada por un segmento génico de anticuerpo de la línea germinal humana.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de FW1, FW2, FW3 and FW4 del monómero de dAb son las mismas que las secuencias de aminoácidos de las regiones marco correspondientes codificada por un segmento génico de anticuerpo de la línea germinal humana, o las secuencias de aminoácidos de FW1, FW2, FW3 and FW4 contienen colectivamente hasta 10 diferencias de aminoácidos respecto a las secuencias de aminoácidos de las regiones marco correspondientes codificadas por dicho segmento génico de anticuerpo de la línea germinal humana.

En otras formas de realización, el monómero de dAb comprende las regiones FW1, FW2 y FW3, y la secuencia de aminoácidos de dichas regiones FW1, FW2 y FW3 son las mismas que las secuencias de aminoácidos de las regiones marco correspondientes codificadas por los segmentos génicos de anticuerpo de la línea germinal.

En algunas formas de realización, el monómero de dAb no comprende un dominio variable de inmunoglobulina de camélidos o uno o más aminoácidos marco que son únicos para los dominios variables de inmunoglobulina codificados por los segmentos génicos de anticuerpo de la línea germinal de camélidos.

Ligandos y monómeros de dAb que se unen a la seroalbúmina

La invención proporciona un ligando o monómero de dAb (*por ejemplo*, un ligando de doble especificidad que comprende dicho dAb) que se une a la albúmina sérica (SA) con una K_d de 1 nM a 500 μ M (es decir, $\times 10^{-9}$ a 5×10^{-4}), preferentemente de 100 nM a 10 mM. Preferentemente, para un ligando de doble especificidad que comprende un primer dAb anti-SA y un segundo dAb a otra diana, la afinidad (por ejemplo, K_d y / o K_{off} tal como se mide por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, utilizando BiaCore) del segundo dAb por su diana es de 1 a 100.000 veces (preferentemente de 100 a 100.000, más preferentemente de 1.000 a 100.000, o de 10.000 a 100.000 veces) la afinidad del primer dAb por SA. Por ejemplo, el primer dAb se une a la SA con una afinidad de aproximadamente 10 μ M, mientras que el segundo dAb se une a su diana con una afinidad de 100 pM. Preferentemente, la seroalbúmina es seroalbúmina humana (HSA). En una forma de realización, el primer dAb (o un monómero de dAb) se une a la SA (p. ej., HSA) con una K_d de aproximadamente 50, preferentemente 70 y más preferentemente 100, 150 o 200 nM.

En ciertas realizaciones, el monómero de dAb específico para SA comprende la secuencia de aminoácidos de MSA-16 (SEC ID N° 28) o una secuencia que es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% homóloga de la misma.

En otras realizaciones, el monómero de dAb específico para SA comprende la secuencia de aminoácidos de MSA-26 (SEC ID N° 30) o una secuencia que es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% homóloga de la misma.

En ciertas realizaciones, el monómero de dAb que se une a SA resiste la agregación, se despliega de manera

reversible y / o comprende una región marco como se ha descrito anteriormente para los monómeros de dAb que se unen TNFR1.

Moléculas de ácido nucleico, vectores y células huésped

5 La invención proporciona también moléculas aisladas y / o recombinantes de ácidos nucleicos que codifican los ligandos y los monómeros de dAb descritos en el presente documento.

10 La invención también proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención. En ciertas realizaciones, el vector es un vector de expresión que comprende uno o más elementos de control de la resión o secuencias que están operablemente unidas al ácido nucleico recombinante de la invención. Los vectores adecuados (por ejemplo, plásmidos, fagemidos) y elementos de control de la expresión se describen adicionalmente más adelante.

La invención también proporciona una célula huésped recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante o vector de la invención. Las células huésped adecuadas y procedimientos para la producción de la célula huésped recombinante de la invención se describen adicionalmente a continuación.

15 La invención también proporciona un procedimiento para producir un ligando (p. ej., monómero de dAb, ligando de especificidad doble, ligando multiespecífico) de la invención, que comprende mantener una célula huésped recombinante que comprende un ácido nucleico recombinante de la invención en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico recombinante, de modo que se expresa el nucleico recombinante y se produce un ligando. En algunas formas de realización, el procedimiento además comprende aislar el ligando.

Formatos del ligando

20 Los ligandos según la invención se pueden formatear como anticuerpos mono o multiespecíficos o fragmentos de anticuerpos o en estructuras que no son inmunoglobulinas mono o multiespecíficas. Formatos adecuados incluyen cualquier estructura polipeptídica en la que un dominio variable de anticuerpo o la Cordel mismo se puede incorporar para conferir especificidad de unión para el antígeno sobre la estructura. Varios formatos de anticuerpos adecuados que se conocen en la técnica, tales como formatos de tipo IgG, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpo, cadenas ligeras de anticuerpo, homodímeros y heterodímeros de las cadenas pesadas y/o las cadenas ligeras del anticuerpo de cualquiera de los anteriores (e.g., un fragmento Fv (e.g., Fv de cadena sencilla(scFv), un Fv unido por disulfuro), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un dominio variable de anticuerpo sencillo (e.g., un dAb, V_H, V_L), un dAb y versiones modificadas de cualquiera de los anteriores (p. ej., modificados por la unión covalente de polialquilenglicol (p. ej., polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol) u otro polímero adecuado). Véase el documento PCT/GB03/002804, presentado el 30 de junio de 2003, que designa los Estados Unidos, (documento WO 2004/081026) con respecto al PEGilado de dominios variables únicos y dAb, procedimientos adecuados para la preparación de los mismos, incremento de la semivida in vivo de los dominios variables únicos y monómeros y multímeros de dAb PEGilados, los PEG adecuados, tamaños hidrodinámicos preferidos de PEG y tamaños hidrodinámicos preferidos de dominios variables únicos y monómeros y multímeros de dAb PEGilados.

40 En algunas realizaciones, el ligando es un formato de tipo IgG. Dichos formatos tienen la estructura convencional de cuatro cadenas de una molécula de IgG (2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras), en las que una o más de las regiones variables (V_H y/o V_L) se han sustituido con un dAb o dominio variable único de una especificidad deseada. Preferentemente, cada una de las regiones variables (2 regiones V_H y 2 regiones V_L) se sustituye con un dAb o dominio variable único. Los dAb o dominio variables únicos que están incluidos en un formato de tipo IgG pueden tener la misma o diferentes especificidades. En algunas formas de realización, el formato de tipo IgG es tetravalente y puede tener uno, dos, tres o cuatro especificidades. Por ejemplo, el formato de tipo IgG puede ser monoespecífico y comprende 4 dAb que tienen la misma especificidad; biespecífico y comprende 4 dAb que tienen la misma especificidad y otro dAb que tiene una especificidad diferente; biespecífico y comprende 2 dAb que tienen la misma especificidad y dos dAb que tiene una especificidad común pero diferente; trispecífico y comprende dAb primero y segundo que tienen la misma especificidad, un tercer dAb con una especificidad diferente y un cuarto dAb con una especificidad diferente del primero, segundo y tercero dAb; o tetraespecífico y comprende 4 dAb cada uno con una especificidad diferente. Se pueden preparar fragmentos de unión a antígeno de formatos de tipo IgG (p. ej., Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scFv). Preferentemente, los formatos de tipo IgG o fragmentos de unión a antígeno de los mismos no reticulan el TNFR1.

Ligandos, incluidos los monómeros, dímeros y trímeros de dAb, pueden unirse a una región Fc de anticuerpo, que comprende uno o ambos dominios C_{H2} y C_{H3}, y, opcionalmente una región bisagra. Por ejemplo, se pueden usar vectores que codifican ligandos como una secuencia de nucleótidos sencilla a una región Fc para preparar dichos polipéptidos.

55 La divulgación además proporciona dímeros, trímeros y polímeros de los monómeros de dAb mencionados en lo que antecede, de acuerdo con los siguientes aspectos de la presente invención.

Los ligandos se pueden combinar y / o formatear en estructuras de múltiples ligandos no inmunoglobulínicas para

formar complejos multivalentes, que se unen a moléculas diana con el mismo antígeno, proporcionando de este modo avidez superior. En algunas formas de realización, al menos un dominio variable se une a un antígeno para aumentar la semivida del multímero. Por ejemplo, los receptores bacterianos naturales tales como SpA se han utilizado como armazones para el injerto de CDR para generar ligandos que se unen específicamente a uno o más epítomos. Los detalles de este procedimiento se describen en el documento US 5,831,012. Otros armazones adecuados incluyen los basados en fibronectina y aficuerpos. Detalles de los procedimientos adecuados se describen en el documento WO 98/58965. Otros armazones adecuados incluyen lipocalina y CTLA4, como se describe en van den Beuken et al., J. Mol. Biol. (2001) 310, 591 - 601, y armazones tales como los descritos en el documento WO 00/69907 (Medical Research Council), que se basan por ejemplo en la estructura de anillo de GroEL bacteriano u otros polipéptidos de chaperona.

Los armazones proteicos pueden combinarse; por ejemplo, las CDR pueden injertarse en un armazón de CTLA4 y utilizarse junto con los dominios V_H o V_L de inmunoglobulina para formar un ligando. Del mismo modo, la fibronectina, lipocalina y otros armazones se pueden combinar.

Ligandos de especificidad doble o múltiple

Los inventores han descrito, en su solicitud de patente internacional en tramitación WO 03/002609, así como en la solicitud de patente del RU 0230203.2 sin publicar en tramitación, los ligandos de inmunoglobulina con especificidad doble que comprenden dominios variables únicos de inmunoglobulina que tienen cada uno diferentes especificidades. Los dominios pueden actuar en competencia unos con otros o de forma independiente para unir antígenos o epítomos sobre moléculas diana.

Los antígenos o epítomos que aumentan la semivida de un ligando tal como se describe en el presente documento están presentes ventajosamente en las proteínas o polipéptidos que se encuentran en un organismo *in vivo*. Ejemplos incluyen las proteínas de la matriz extracelular, las proteínas de la sangre y las proteínas presentes en varios tejidos en el organismo. Las proteínas actúan reduciendo la velocidad de eliminación del ligando de la sangre, por ejemplo actuando como agentes de carga, o mediante el anclaje del ligando a un sitio de acción deseado. Ejemplos de antígenos / epítomos que aumentan la semivida *in vivo* figuran en el Anexo 1 más adelante.

El incremento de la semivida es útil en las aplicaciones *in vivo* de inmunoglobulinas, especialmente anticuerpos y, más especialmente, fragmentos de anticuerpos de tamaño pequeño. Dichos fragmentos (Fv, unidos por disulfuro, Fab, scFv, dAb) sufren un rápido aclaramiento del cuerpo; por tanto, aunque pueden alcanzar la mayoría de las partes del cuerpo con rapidez y son rápidos de producir y fáciles de manejar, sus aplicaciones *in vivo* han sido limitadas por su breve persistencia *in vivo*. La invención resuelve este problema proporcionando un incremento de la semivida de los ligandos *in vivo* y, en consecuencia, tiempos de persistencia más prolongada en el cuerpo de la actividad funcional del ligando.

Los expertos en la técnica estarán familiarizados con los procedimientos de análisis farmacocinético y la determinación de la semivida de los ligandos. Los detalles pueden encontrarse en Kenneth, A et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in Peters et al, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, published by Marcel Dekker, 2nd Rev. ex edition (1982), que describe parámetros farmacocinéticos tales como las semividas de $t_{1/2}$ alfa y de $t_{1/2}$ beta y el área bajo la curva (AUC).

Las semividas ($t_{1/2}$ alfa y $t_{1/2}$ beta) y la AUC pueden determinarse a partir de una curva de concentración sérica del ligando frente al tiempo. Se puede usar el paquete de análisis WinNonlin (disponible Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, USA) por ejemplo, para modelar la curva. En una primera fase (la fase alfa), el ligando está experimentando principalmente distribución en el paciente, con alguna eliminación. Una segunda fase (fase beta) es la fase terminal, cuando el ligando se ha distribuido y la concentración sérica está disminuyendo a medida que el ligando se elimina del paciente. La semivida $t_{1/2}$ alfa es la semivida de la primera fase y la semivida $t_{1/2}$ beta es la semivida de la segunda fase. Por lo tanto, ventajosamente, la presente invención proporciona un ligando o una composición que comprende un ligando de acuerdo con la invención que tiene una semivida $t_{1/2}$ en el intervalo de 15 minutos o más. En una forma de realización, el extremo inferior del intervalo es de 30 minutos, 45 minutos, 1 hour, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o como alternativa, un ligando o composición de acuerdo con la invención tendrá una semivida $t_{1/2}$ en el intervalo de hasta 12 horas, incluidas. En una forma de realización, el extremo superior del intervalo es 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 horas. Un ejemplo de un intervalo adecuado es de 1 a 6 horas, de 2 a 5 horas o de 3 a 4 horas.

Ventajosamente, la presente divulgación proporciona un ligando o una composición que comprende un ligando de acuerdo con la divulgación que tiene una semivida $t_{1/2}$ en el intervalo de 2,5 horas o más. En una forma de realización, el extremo inferior del intervalo es 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o como alternativa, un ligando o composición tiene una semivida $t_{1/2}$ en el intervalo de hasta e incluidos 21 días. En una forma de realización, el extremo superior del intervalo es de 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días o 20 días. Ventajosamente, un ligando o composición de acuerdo con la invención tendrá una semivida $t_{1/2}$ en el intervalo de 12 a 60 horas. En otra forma de realización, estará en el intervalo de 12 a 48 horas. En otra forma de realización más, estará en el intervalo de 12 a 26 horas.

Además de, o como alternativa a, los criterios anteriores, la presente divulgación proporciona un ligando o una composición que comprende un ligando de acuerdo con la invención que tiene un valor de la AUC (área bajo la curva) en el intervalo de aproximadamente 1 mg.min/ml o más. En una forma de realización, el extremo inferior del intervalo es 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 or 300 mg.min/ml. Además, o como alternativa, un ligando o composición

5 tiene una AUC en el intervalo de hasta 600 mg.min/ml. En una forma de realización, el extremo superior del intervalo es 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 o 50 mg.min/ml. Ventajosamente, un ligando tendrá una AUC en el intervalo seleccionado del grupo constituido por los siguientes: 15 a 150 mg.min/ml, 15 a 100 mg.min/ml, 15 a 75 mg.min/ml, y 15 a 50 mg.min/ml.

Los ligandos de doble especificidad de la invención no incluyen ligandos como se describe en el documento WO 02/02773. Por lo tanto, los ligandos de la presente invención no comprenden pares V_H/V_L complementarios que se unen a uno cualquiera o más antígenos o epítomos cooperativamente. En su lugar, los ligandos según el primer aspecto de la invención comprenden un par V_H/V_L complementario, en el que los dominios V tienen diferentes especificidades. Además, los ligandos según el primer aspecto de la invención comprenden un par V_H/V_L complementario que tiene diferentes especificidades por epítomos o antígenos no relacionados estructuralmente. Los

10 epítomos o antígenos relacionados estructuralmente son epítomos o antígenos que poseen similitud estructural suficiente como para unirse a un par V_H/V_L complementario convencional que actúa de una manera cooperativa para unir un antígeno o epítomo; en el caso de los epítomos relacionados estructuralmente, los epítomos son suficientemente similares en estructura de modo que "encajan" en el mismo bolsillo de unión formado en el sitio de unión al antígeno del dímero V_H/V_L .

La presente invención también proporciona un ligando que comprende un primer dominio variable de inmunoglobulina que tiene una primera especificidad de unión a antígeno o epítomo y un segundo dominio variable de inmunoglobulina que tiene una segunda especificidad de unión a antígeno o epítomo, en el que uno de dichos primero y segundo dominios variables se unen a un antígeno que aumenta la semivida del ligando *in vivo* y los dominios variables no son complementarios entre sí.

El primero y el segundo dominios de unión a antígeno pueden estar asociados covalentemente o no covalentemente. En el caso de que los dominios estén asociados de forma covalente, la asociación puede estar mediada por, por ejemplo, enlaces disulfuro o por un ligador polipeptídico tal como $(Gly_4Ser)_n$, donde n = de 1 a 8, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 7.

En el caso en que los dominios variables se seleccionen de repertorios de genes V seleccionados usando, por ejemplo, tecnología de expresión en fagos tal como se describe en el presente documento, estos dominios variables pueden comprender una región marco universal tal que puede reconocerse mediante un ligando genérico específico tal como se define en el presente documento. El uso de marcos universales, ligandos genéricos y similares se describen en el documento WO 99/20749. En la presente invención, la referencia a la expresión en fagos incluye el uso tanto de fagos y / o fagemidos.

Cuando se usan repertorios de genes V , la variación en la secuencia polipeptídica preferentemente se localiza dentro de los bucles estructurales de los dominios variables. Las secuencias polipeptídicas de cualquier dominio variable pueden alterarse mediante arrastre o mediante mutación con el fin de reforzar la interacción de cada dominio variable con su par complementario. El barajado de ADN se conoce en la técnica y se enseña en, por ejemplo, Stemmer, Nature 370:389 - 391 (1994) y la patente de EE.UU. N° 6.297.053, ambos documentos incorporados en el presente documento por referencia. Otros procedimientos de mutagénesis son bien conocidos para los expertos en la técnica.

En una forma de realización preferida, el "ligando de doble especificidad" es un fragmento Fv de cadena única. En una forma de realización alternativa de la invención, el "ligando de doble especificidad" consiste en una región Fab de un anticuerpo. El término "región Fab" incluye una región Fab en la que se usan dos dominios V_H o dos dominios V_L .

Las regiones variables pueden proceder de anticuerpos dirigidos contra antígenos o epítomos diana. Como alternativa pueden derivar a partir de un repertorio de dominios de anticuerpo únicos tales como los expresados en la superficie del bacteriófago filamentoso. La selección se puede realizar como se describe a continuación.

La presente divulgación proporciona una o más moléculas de ácido nucleico que codifican al menos un ligando de doble especificidad como se define en el presente documento. El ligando de doble especificidad puede estar codificado por una molécula de ácido nucleico sencilla; como alternativa, cada dominio puede estar codificado por una molécula de ácido nucleico separada. Cuando el ligando está codificado por una molécula de ácido nucleico sencillo, los dominios pueden expresarse como un polipéptido de fusión, en la forma de una molécula scFv, o pueden expresarse por separado y unirse posteriormente, por ejemplo usando agentes químicos de unión. Los

50 ligandos expresados a partir de los ácidos nucleicos separados se unirán por los medios adecuados.

El ácido nucleico puede codificar además una secuencia señal para exportación de los polipéptidos desde una célula huésped tras la expresión y se pueden fusionar con un componente de superficie de una partícula de bacteriófago filamentoso (u otro componente de un sistema de visualización de la selección) tras la expresión.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un vector que comprende el ácido nucleico que codifica un ligando de doble especificidad de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona una célula huésped transfectada con un vector que codifica un ligando de doble especificidad de acuerdo con la presente invención.

- 5 La expresión en un vector de este tipo puede configurarse para producir, por ejemplo, sobre la superficie de una partícula de bacteriófago, dominios variables para la selección. Esto permite la selección de las regiones variables expresadas y, por lo tanto, la selección de los "ligandos de doble especificidad" utilizando el procedimiento de la presente invención.

- 10 También se describe en el presente documento un procedimiento para producir un ligando que comprende un primer dominio variable único de inmunoglobulina que tiene una primera especificidad de unión y un segundo dominio variable único de inmunoglobulina que tiene una segunda (diferente) especificidad de unión, siendo una o las dos especificidades de unión específicas de un antígeno que prolonga la semivida del ligando *in vivo*, comprendiendo el procedimiento las etapas de

- 15 a) seleccionar un primer dominio variable por su capacidad para unirse a un primer epítipo,
) seleccionar una segunda región variable por su capacidad para unirse a un segundo epítipo,
 c) combinar los dominios variables; y
 d) seleccionar el ligando por su capacidad para unirse a dicho primer epítipo y a dicho segundo epítipo.

- 20 El ligando se puede unir a los primero y segundo epítopos simultáneamente o, cuando existe competencia entre los dominios de unión para la unión al epítipo, la unión de un dominio puede excluir la unión de otro dominio a su epítipo análogo. En una forma de realización, por lo tanto, la etapa (d) anterior requiere la unión simultánea al primero y segundo epítipo (y posiblemente más); en otra realización, la unión a los primero y segundo epítopos no es simultánea.

Los epítopos están preferentemente en antígenos separados.

- 25 Los ligandos comprenden ventajosamente combinaciones de V_H/V_L o combinaciones de V_H/V_{HO} V_L/V_L de dominios variables de inmunoglobulina, como se ha descrito anteriormente. Los ligandos pueden comprender además dominios V_{HH} de camélidos, siempre que el dominio V_{HH} que es específico de un antígeno que prolonga la semivida del ligando *in vivo* no se una a la lisozima blanca de huevo de gallina (HEL), alfa-amilasa pancreática porcina o NMC-A; HCG, colorante azo RR6 unido a BSA o células HG982 de *S. mutans*, como se describe en Conrath et al., (2001) el documento JBC 276:7346-7350 y el documento WO99/23221, ninguno de los cuales describe el uso de una especificidad para un antígeno que prolonga la semivida para aumentar la semivida del ligando *in vivo*.

- 30 En una forma de realización, dicho primer dominio variable se selecciona según la unión a dicho primer epítipo en ausencia de un dominio variable complementario. En una realización adicional, dicho primer dominio variable se selecciona según la unión a dicho primer epítipo / antígeno en presencia de un tercer dominio variable en el que dicho tercer dominio variable es diferente de dicho segundo dominio variable y es complementario del primer dominio. Del mismo modo, el segundo dominio puede seleccionarse en ausencia o presencia de un dominio variable complementario.

En una realización, los dominios variables derivan de un anticuerpo respectivo dirigido contra el antígeno o epítipo. En una forma de realización preferida, los dominios variables derivan de un repertorio de dominios de anticuerpo variables únicos.

- 40 Combinación de dominios variables únicos

Los dominios útiles en la invención, una vez seleccionados, se pueden combinar mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo procedimientos covalentes y no covalentes.

- 45 Los procedimientos preferidos incluyen el uso de ligadores polipeptídicos, como se describe, por ejemplo, en relación con las moléculas scFv (Bird et al., (1988) Science 242:423-426). La discusión de los ligadores adecuados se proporciona en Bird et al. Science 242, 423 - 426; Hudson et al, Journal Immunol Methods 231 (1999) 177 - 189; Hudson et al, Proc Nat Acad Sci USA 85, 5879 - 5883. Los ligadores son, preferentemente, flexibles, lo que permite la interacción de dos dominios únicos. Un ejemplo de ligador es un ligador $(Gly_4Ser)_n$, en el que $n = 1$ a 8, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 7. También se pueden usar los ligadores utilizados en los diacuerpos, que son menos flexibles (Holliger et al., (1993) PNAS (EE.UU.) 90:6444-6448).

- 50 En una realización, el ligador empleado no es una región bisagra de inmunoglobulina.

Los dominios variables pueden combinarse usando procedimientos distintos a los ligadores. Por ejemplo, el uso de puentes disulfuro, proporcionados a través residuos de cisteína de origen natural o sometidos a ingeniería, puede explotarse para estabilizar los dímeros V_H-V_H V_L-V_L V_H-V_L (Reiter et al., (1994) Protein Eng. 7:697-704) o mediante remodelación de la interfaz entre los dominios variables para mejorar el "ajuste" y, de este modo, la estabilidad de la

interacción (Ridgeway et al., (1996) Protein Eng.:7:617-621; Zhu et al., (1997) Protein Science 6:781-788).

Según sea adecuado se pueden usar otras técnicas para unir o estabilizar dominios variables de inmunoglobulinas, y, en particular dominios V_H de anticuerpo.

De acuerdo con la presente invención, los ligandos de doble especificidad pueden estar en conformaciones "cerradas" en solución. Una configuración "cerrada" es aquella en la que los dos dominios (por ejemplo V_H y V_L) están presentes en forma asociada, tal como la de un par V_H - V_L asociado que forma un sitio de unión del anticuerpo. Por ejemplo, scFv puede estar en una conformación cerrada, dependiendo de la disposición del ligador utilizado para unir los dominios V_H y V_L . Si este es suficientemente flexible para permitir que los dominios se asocien o los mantiene rígidamente en la posición asociada, es probable que los dominios adopten una conformación cerrada.

Del mismo modo, los pares de dominio V_H y los pares de dominio V_L pueden existir en una conformación cerrada. Generalmente, esta será una función de la estrecha asociación de los dominios, tal como mediante un ligador rígido, en la molécula de ligando. Los ligandos en una conformación cerrada serán incapaces de unirse tanto a la molécula que aumenta la semivida del ligando como a una segunda molécula diana. Por lo tanto, el ligando típicamente solo se unirá a la segunda molécula diana en la disociación de la molécula que aumenta la semivida del ligando. Además, la construcción de los dímeros V_H/V_H , V_L/V_L o V_H/V_L sin ligadores proporciona la competencia entre los dominios.

Los ligandos pueden estar, además, en una conformación abierta. En una conformación tal, los ligandos serán capaces de unirse simultáneamente tanto a la molécula que aumenta la semivida del ligando como a la segunda molécula diana. Típicamente, los dominios variables en una configuración abierta son (en el caso de los pares V_H - V_L) se mantienen lo suficientemente separados para que los dominios no interactúen y formen un sitio de unión al anticuerpo y no compitan por la unión a sus respectivos epítopos. En el caso de los dímeros V_H/V_H o V_L/V_L , los dominios no están unidos forzados por ligadores rígidos. Naturalmente, tales emparejamientos de dominio no competirán por la unión al antígeno ni formarán un sitio de unión del anticuerpo.

Los fragmentos Fab y los anticuerpos enteros existirán principalmente en la conformación cerrada, aunque se apreciará que los ligandos de doble especificidad abiertos y cerrados es probable que existan en diversos equilibrios en diferentes circunstancias. Es probable que la unión del ligando a un objetivo desplace el equilibrio hacia la configuración abierta. Por lo tanto, ciertos ligandos de acuerdo con la invención pueden existir en dos conformaciones en solución, una de las cuales (la forma abierta) puede unirse a dos antígenos o epítopos de forma independiente, mientras que la conformación alternativa (la forma cerrada) solo puede unirse a un antígeno o epítopo; por tanto, los antígenos o epítopos compiten por la unión al ligando en esta conformación.

Aunque la forma abierta del ligando de doble especificidad puede existir de este modo en equilibrio con la forma cerrada en solución, se contempla que el equilibrio favorecerá la forma cerrada; además, la forma abierta puede ser secuestrada por unión a la diana en una conformación cerrada. Preferentemente, por lo tanto, ciertos ligandos de doble especificidad de la invención están presentes en un equilibrio entre dos conformaciones (abierta y cerrada).

Los ligandos de doble especificidad se pueden modificar con el fin de favorecer una conformación abierta o cerrada. Por ejemplo, la estabilización de las interacciones V_H - V_L con enlaces disulfuro estabiliza la conformación cerrada. Por otra parte, los ligadores usados para unir los dominios, incluidos los pares de dominio V_H y dominio V_L pueden construirse de tal manera que se favorezca la forma abierta; por ejemplo, los ligadores pueden impedir estéricamente la asociación de los dominios, tal como mediante la incorporación de residuos de aminoácidos grandes en lugares oportunos, o el diseño de una estructura rígida adecuada que mantenga los dominios físicamente separados.

Caracterización del ligando de doble especificidad

La unión del ligando de especificidad doble sus antígenos o epítopos específicos se puede analizar mediante procedimientos que pueden ser familiares para los expertos en la técnica e incluyen ELISA. En una forma de realización preferida de la invención, la unión se analiza usando ELISA de fago monoclonal.

El ELISA de fago puede realizarse de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado: a continuación se indica un ejemplo de protocolo.

Las poblaciones de fagos producidos en cada ciclo de selección se puede someter a detección selectiva según su unión mediante ELISA al antígeno o epítopo seleccionado, para identificar los anticuerpos "policlonales" del fago. Después, se puede realizar el ELISA de los fagos procedentes de colonias bacterianas infectadas sencillas de estas poblaciones para identificar los anticuerpos "monoclonales" de los fagos. También es deseable realizar una detección selectiva de fragmentos solubles de anticuerpo para su unión a antígeno o al epítopo, y esto también se puede realizar mediante ELISA usando reactivos contra, por ejemplo la cola del extremo C o del extremo N (véase, por ejemplo, Winter y col. (1994) Ann. Rev. Immunology 12, 43355 y las referencias citadas en él).

La diversidad de los anticuerpos monoclonales del fago seleccionado también puede evaluarse mediante electroforesis en gel de los productos de la PCR (Marks y col. 1991, *ant.*; Nissim y col. 1994 *supra*), sondaje

(Tomlinson y *col.*, 1992) J. Mol. Biol. 227, 776) o mediante secuenciación del ADN del vector.

Estructura de los ligandos de doble especificidad

5 Como se ha descrito anteriormente, un anticuerpo se define en el presente documento como un anticuerpo (por ejemplo IgG, IgM, IgA, IgA, IgE) o fragmento (Fab, Fv, Fv unido por puentes disulfuro, scFv, diacuerpo) que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera, al menos dos dominios variables de cadena pesada o al menos dos dominios variables de cadena ligera. Puede derivar al menos en parte de cualquiera de las especies de origen natural que producen un anticuerpo o se puede crear mediante tecnología de ADN recombinante; esté aislado de suero, de células B, de hibridomas, de transfectomas, de levaduras o de bacterias).

10 En una forma de realización preferida, el ligando de doble especificidad comprende al menos un dominio variable único de cadena pesada de un anticuerpo y un dominio variable único de cadena ligera de un anticuerpo, o dos dominios variables únicos de cadena pesada o ligera. Por ejemplo, el ligando puede comprender un par V_H/V_L , un par de dominios V_H o un par de dominios V_L .

15 Los dominios variables primero y segundo de un ligando tal pueden estar en la misma cadena polipeptídica. Alternativamente, pueden estar en cadenas polipeptídicas separadas. En el caso de que estén en la misma cadena polipeptídica pueden estar unidos por un ligador, que es, preferentemente una secuencia peptídica, como se ha descrito anteriormente.

Los dominios variables primero y el segundo pueden estar asociados covalentemente o no covalentemente. En el caso en el que estén asociados de forma covalente, los enlaces covalentes pueden ser enlaces disulfuro.

20 En el caso en que los dominios variables se seleccionen de repertorios de genes V seleccionados usando, por ejemplo, tecnología de expresión en fagos tal como se describe en el presente documento, estos dominios variables pueden comprender una región marco universal tal que puede reconocerse mediante un ligando genérico específico tal como se define en el presente documento. El uso de estructuras universales, ligandos genéricos y similares se describe en el documento WO99/20749.

25 Cuando se usan repertorios de genes V, la variación en la secuencia polipeptídica preferentemente se localiza dentro de los bucles estructurales de los dominios variables. Las secuencias polipeptídicas de cualquier dominio variable pueden alterarse mediante arrastre o mediante mutación con el fin de reforzar la interacción de cada dominio variable con su par complementario. El barajado de ADN se conoce en la técnica y se enseña en, por ejemplo, Stemmer, 1994, Nature 370: 389391 y la patente de EE.UU. n° 6.297.053, ambos documentos incorporados en el presente documento por referencia. Otros procedimientos de mutagénesis son bien conocidos para los expertos en la técnica.

En una forma de realización preferida, el "ligando de doble especificidad" es un fragmento Fv de cadena única. En una forma de realización alternativa de la invención, el "ligando de doble especificidad" consiste en formato Fab.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico que codifica al menos un "ligando de doble especificidad" como se define en el presente documento.

35 Un experto en la técnica apreciará que ambos antígenos o epítomos pueden unirse simultáneamente a la misma molécula de anticuerpo. Alternativamente, pueden competir por la unión a la misma molécula de anticuerpo. Por ejemplo, cuando ambos epítomos se unen simultáneamente, ambos dominios variables de un ligando de doble especificidad son capaces de unirse de forma independiente a sus epítomos diana. Cuando los dominios compiten, el dominio variable es capaz de unirse a su objetivo, pero no al mismo tiempo que el otro dominio variable se une a su objetivo afín; o el primer dominio variable es capaz de unirse a su objetivo, pero no al mismo tiempo que el segundo dominio variable se une a su objetivo afín.

Las regiones variables pueden proceder de anticuerpos dirigidos contra antígenos o epítomos diana. Como alternativa pueden derivar a partir de un repertorio de dominios de anticuerpo únicos tales como los expresados en la superficie del bacteriófago filamentoso. La selección se puede realizar como se describe a continuación.

45 En general, las moléculas de ácido nucleico y las construcciones de vector requeridas para la realización de la presente invención se pueden construir y manipular como se expone en los manuales de laboratorio estándar, tales como Sambrook y *col.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, USA.

La manipulación de ácidos nucleicos útiles en la presente invención se lleva a cabo típicamente en vectores recombinantes.

50 Por tanto, en un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un vector que comprende ácido nucleico que codifica al menos un "ligando de doble especificidad" como se define en el presente documento.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, vector se refiere a un elemento pequeño que se usa para introducir ADN heterólogo en las células para su expresión y/o replicación. Un experto en la técnica conoce bien los procedimientos mediante los cuales seleccionar o construir y, posteriormente usar, dichos vectores. Numerosos

5 vectores están públicamente disponibles, incluidos plásmidos bacterianos, bacteriófagos, cromosomas artificiales y vectores episomales. Tales vectores pueden utilizarse para la clonación mutagénesis simples; como alternativa se emplea el vector de expresión génica. Un vector de uso de acuerdo con la invención puede seleccionarse para acomodar una secuencia de codificación de polipéptido de un tamaño deseado, típicamente de 0,25 kilobases (kb) a 40 kb o más de longitud. Una célula huésped adecuada se transforma con el vector después de manipulaciones de clonación *in vitro*. Cada vector contiene varios componentes funcionales, que, en general, incluyen un sitio de clonación (o "poliligador"), un origen de replicación y al menos un gen marcador seleccionable. Si el vector dado es un vector de expresión, posee adicionalmente uno o más de los siguientes: elemento potenciador, promotor, secuencias de la terminación de la transcripción y señal, cada una colocada en las proximidades del sitio de clonación de modo que están operablemente unidas al gen que codifica un ligando de acuerdo con la invención.

10 Generalmente, tanto los vectores de clonación como de expresión contienen secuencias de ácido nucleico que permiten que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Normalmente, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique de forma independiente del ADN cromosómico del huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónomas. Estas secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido de 2 micrómetros es adecuado para levaduras y varios orígenes virales (*p. ej.*, de SV40, de adenovirus) son útiles para los vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el origen de replicación no se necesita para vectores de expresión en mamíferos, a menos que éstos se usen en células de mamífero capaces de replicar niveles altos de ADN, tales como células COS.

De forma ventajosa, un vector de clonación o de expresión puede contener un gen de selección también denominado marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Por tanto, las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, complementan deficiencias auxótrofas o suministran nutrientes cruciales no disponibles en el medio de cultivo.

Dado que la replicación de los vectores que codifican un ligando de acuerdo con la presente invención se realiza de forma más conveniente en *E. coli* se usa un marcador seleccionable en *E. coli*, por ejemplo el gen de β -lactamasa que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Éstos se pueden obtener de plásmidos de *E. coli*, tal como pBR322 o un plásmido pUC tal como pUC18 or pUC19.

Normalmente, los vectores de expresión contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operablemente unido a la secuencia codificadora de interés. Dicho promotor puede ser constitutivo o inducible. La expresión "operablemente unido" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en el modo previsto. Una secuencia control "operablemente unida" a una secuencia codificadora está unida de tal modo que se consigue la expresión de la secuencia codificadora en condiciones compatibles con las secuencias control.

Promotores adecuados para usar con huéspedes procariotas incluyen, por ejemplo, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán generalmente una secuencia de Shine-Dalgarno unida operativamente a la secuencia de codificación.

Los vectores preferidos son los vectores de expresión que permiten la expresión de una secuencia de nucleótidos correspondiente a un miembro de la biblioteca de polipéptidos. Por tanto, la selección con el primer y / o segundo antígeno o epítipo se puede realizar mediante propagación y expresión separadas de un único clon que expresa el miembro de la biblioteca de polipéptidos o mediante el uso de cualquier sistema de visualización de la selección. Como se ha descrito en lo que antecede, un sistema de expresión de selección preferido es la expresión en bacteriófagos. Por lo tanto, se pueden usar los vectores de fagos o fagémidos, por ejemplo, Pit1 o pIT2. Las secuencias líder útiles en la invención incluyen *pelB*, *stII*, *ompA*, *phoA*, *bla* y *pelA*. Un ejemplo son los vectores de fagémidos que tienen un origen de replicación de *E. coli*. (para la replicación bicatenaria) y también un origen de replicación de fagos (para la producción de ADN monocatenario). La manipulación y expresión de dichos vectores es bien conocida en la técnica (Hoogenboom y Winter (1992) *ant.*; Nissim y *col.* (1994) *ant.*). En pocas palabras, el vector contiene un gen de la β -lactamasa para conferir selectividad al fagémido y un promotor *lac* anterior a un casete de expresión que consiste en (de N a C terminal) una secuencia líder de *pelB* (que dirige el polipéptido expresado al espacio periplásmico), un sitio de clonación múltiple (para la clonación de la versión nucleotídica del miembro de la biblioteca), opcionalmente una o más colas peptídicas (para detección), opcionalmente uno o más codones de terminación TAG y la proteína del fago pIII. Por tanto, el uso de varias cepas supresoras y no supresoras de *E. coli* y con la adición de glucosa, isopropilto- β -D-galactósido (IPTG) o un fago colaborador, tal como VCS M13, el vector puede replicarse en forma de un plásmido sin expresión, producir grandes cantidades de solo el miembro de la biblioteca de polipéptidos o producir fagos, algunos de los cuales puede contener al menos una copia de la fusión polipéptido-pIII en su superficie.

La construcción de vectores que codifican ligandos según la invención emplea técnicas de ligación convencionales. Los vectores aislados o los fragmentos de ADN se escinden, se adaptan y se vuelven a ligar en la forma deseada para generar el vector requerido. Si se desea, el análisis para confirmar que las secuencias correctas están presentes en el vector construido se puede realizar de una manera conocida. Los procedimientos adecuados para construir vectores de expresión, preparar *transcritos in vitro*, introducir ADN en células huésped y realizar análisis para evaluar la expresión y la función son conocidos por los expertos en la técnica. La presencia de una secuencia génica en una muestra se detecta, o su amplificación y / o expresión se cuantifica, mediante procedimientos convencionales, tales como análisis de tipo Southern o Northern, transferencia de tipo Western, transferencia en mancha de ADN, ARN o proteína, hibridación *in situ*, inmunocitoquímica o análisis de la secuencia de moléculas de ácidos nucleicos o de proteínas. Los expertos en la técnica preverán fácilmente cómo pueden modificarse estos procedimientos, si se desea.

Antígenos capaces de aumentar la semivida del ligando

Los ligandos de doble especificidad según la invención, en una configuración de la misma, son capaces de unirse a una o más moléculas que pueden aumentar la semivida del ligando *in vivo*. Normalmente, dichas moléculas son polipéptidos que se producen de forma natural *in vivo* y que resisten la degradación o eliminación mediante mecanismos endógenos que eliminan el material no deseado del organismo. Por ejemplo, la molécula que aumenta la semivida del organismo puede seleccionarse de entre las siguientes:

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

Proteínas que se encuentran en la sangre, incluyendo:

proteínas plasmáticas tales como fibrina, α -2 macroglobulina, seroalbúmina, fibrinógeno A, fibrinógeno B, proteína amiloide A sérica, heptaglobin, profilina, ubiquitina, uteroglobulina y β -2-microglobulina;

Las enzimas e inhibidores tales como plasminógeno, lisozima, cistatina C, alfa-1-antitripsina e inhibidor de tripsina de páncreas. El plasminógeno es el precursor inactivo de la serina proteasa plasmina de tipo tripsina. encuentra normalmente circulando en la corriente sanguínea. Cuando el plasminógeno se activa y se convierte en plasmina, despliega un potente dominio enzimático que disuelve las fibras de fibrinógeno que enredan las células sanguíneas en un coágulo de sangre. Esto se denomina fibrinólisis.

Proteínas del sistema inmunológico, como IgE, IgG, IgM.

Proteínas de transporte, tales como proteína de unión a retinol, α -1 microglobulina.

Defensinas tales como beta-defensin 1, defensinas de neutrófilos 1,2 y 3.

Proteínas que se encuentran en la barrera hematoencefálica o en tejidos neurales, tales como el receptor de melanocortina, mielina, transportador de ascorbato.

Proteínas de fusión de ligando específico del receptor de la transferrina-agente neurofarmacéutico específicas de los receptores de transferrina (véase el documento US5977307);

receptor de células endoteliales de los capilares del cerebro, transferrina, receptor de la transferrina, insulina, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF 1), receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF 2), receptor de la insulina.

Proteínas localizadas en el riñón, tales como policistina, colágeno tipo IV, transportador K1 de aniones orgánicos, antígeno de Heymann.

Proteínas localizadas en el hígado, por ejemplo alcohol deshidrogenasa, G250.

Factor X de la coagulación sanguínea

α 1 antitripsina

TNF 1 α

Proteínas localizadas en el pulmón, tal como el componente secretor (se une a IgA).

Proteínas localizadas en el corazón, por ejemplo HSP 27. Esto se asocia con una miocardiopatía dilatada.

Proteínas localizadas en la piel, por ejemplo queratina.

Proteínas específicas del hueso, tales como proteínas morfogénicas de hueso (BMP), que son una subpoblación de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β que demuestran actividad osteogénica. Ejemplos incluyen BMP-2, -4, -5, -6, -7 (también denominada proteína osteogénica (OP-1) y -8 (OP-2).

- 5 Proteínas específicas de tumor, incluyendo el antígeno del trofoblasto humano, el receptor de herceptina, el receptor de estrógenos, catepsinas por ejemplo, catepsina B (que se encuentran en el hígado y el bazo).

- 10 Proteínas específicas de enfermedad, tales como antígenos expresados sólo en células T activadas: incluidas LAG-3 (gen de activación de linfocitos), ligando de osteoprotegerina (OPGL) véase *Nature* 402, 304309 1999, OX40 (un miembro de la familia de los receptores de TNF, expresado en las células T y la única molécula de células T coestimuladoras que se sabe que están específicamente reguladas por incremento en células productoras de virus de la leucemia de células T humana de tipo -I (HTLV-I). Véase *J Immunol.* 2000 Jul 1;165(1):263 - 70; metaloproteasas (asociadas con artritis/cáncer) incluidas CG6512 de *Drosophila*, paraplegina humana, FtsH humana, AFG3L2 humana, ftsH murino; y factores de crecimiento angiogénico, incluido el factor de crecimiento fibroblástico ácido (FGF-1), el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF-2), factor de crecimiento endotelial vascular /factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF), factor transformante de crecimiento α (TGF α), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), angiogenina, interleukina-3 (IL-3), interleukina-8 (IL-8), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento placentario (P1GF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas midkine BB (PDGF), y fractalkina.

Proteínas de estrés (proteínas del shock térmico)

- 20 Las HSP normalmente se encuentran intracelularmente. Cuando se encuentran extracelularmente es indicativo de que la célula ha muerto y sus componentes se han diseminado. Esta muerte celular no programada (necrosis) se produce solo como resultado de traumatismo, enfermedad o lesión, y, por tanto, *in vivo*, las HSP desencadenan una respuesta del sistema inmunitario, que luchará contra la infección y la enfermedad. Una doble especificidad que se une a una HSP extracelular puede localizarse en un sitio de la enfermedad.

Proteínas implicadas en el transporte de Fc

- 25 Receptor de Brambell (conocido también como FCRB)

Este receptor de Fc tiene dos funciones, ambas potencialmente útiles para liberación

Las funciones son

El transporte de IgG de la madre al niño a través de la placenta

- 30 la protección de IgG de la degradación prolongando así su semivida en suero de la IgG. Se cree que el receptor recicla la IgG del endosoma.

Véase, Holliger et al, *Nat Biotechnol* 1997 Jul;15(7):632 - 6.

- 35 Los ligandos pueden diseñarse para ser específicos para los objetivos antes mencionados sin requerir ningún aumento o incrementar la semivida *in vivo*. Por ejemplo, los ligandos según la invención pueden ser específicos de los objetivos seleccionados de los anteriores que son específicos de tejido, lo que permite la focalización específica de tejido del ligando de doble especificidad, o un monómero de dAb que se une a una diana terapéuticamente relevante específica de tejido, independientemente de cualquier aumento en la semivida, aunque esto puede resultar. Además, cuando el ligando o el monómero de dAb está dirigido al riñón o al hígado, esto puede redirigir el ligando o el monómero de dAb a una ruta de aclaramiento alternativa *in vivo* (por ejemplo, el ligando puede alejarse del aclaramiento hepático al aclaramiento renal).

- 40 Uso de ligandos multiespecíficos de acuerdo con la segunda configuración de la invención

- 45 Los ligandos multiespecíficos de acuerdo con el procedimiento de la segunda configuración de la presente invención se pueden emplear en aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, en aplicaciones de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, en aplicaciones de reactivos y ensayos *in vitro* y similares. Por ejemplo, las moléculas de anticuerpo se pueden utilizar en técnicas de ensayo basadas en anticuerpos, tales como técnicas de ELISA, de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

- 50 Como se mencionó anteriormente, los ligandos multiespecíficos según la invención son de uso en procedimientos de diagnóstico, profilácticos y terapéuticos. Los anticuerpos multiespecíficos según la invención son de uso para el diagnóstico en análisis Western y detección de proteínas *in situ* por procedimientos inmunohistoquímicos estándar; para su uso en estas aplicaciones, los ligandos pueden marcarse de acuerdo con técnicas conocidas en la materia. Además, dichos polipéptidos de anticuerpo pueden usarse de forma preparativa en procedimientos de cromatografía de afinidad, cuando forman complejos con un soporte cromatográfico, tal como una resina. Todas estas técnicas son bien conocidas para los expertos en la materia.

Usos de diagnóstico de los ligandos multiespecíficos de conformación cerrada incluyen ensayos homogéneos para

analitos que explotan la capacidad de los ligandos multiespecíficos de conformación cerrada para unirse a dianas en competición, de tal modo que dos dianas no pueden unirse simultáneamente (una conformación cerrada) o, alternativamente, su capacidad para unirse dos dianas silmultáneamente (una conformación abierta).

Composiciones y usos terapéuticos y de diagnóstico

5 La invención proporciona composiciones que comprenden un antagonista del factor de necrosis tumoral (TNFR1) que se une al TNFR1 e inhibe la transducción de señal a través de TNFR1; (i) en el que dicho antagonista no innhíbe la unión de TNF α to TNFR1; (ii) en el que dicho antagonista es un anticuepro de dominio (dAb); y (iii) en el que dicho dAb comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos de TAR2h-205 (SEC ID N ° 627 en la Figura 271), y un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente, y procedimientos terapéuticos y de diagnóstico que emplean los ligandos o las composiciones de la invención. Antagonistas y ligandos (por ejemplo, ligandos de doble especificidad, ligandos multiespecíficos, monómeros de dAb) de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se pueden emplear en aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, en aplicaciones de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, en aplicaciones de reactivos y ensayos *in vitro* y similares.

15 Los usos terapéuticos y profilácticos de los antagonistas y ligandos (por ejemplo, ligandos multiespecíficos, ligandos de doble especificidad, monómeros de dAb) de la invención implican la administración de antagonistas y / o ligandos de acuerdo con la invención a un mamífero receptor, tal como un ser humano. Los ligandos de doble especificidad o multiespecíficos (p. ej., formatos de anticuerpos de doble especificidad) se van a unir a los antígenos multimérico con gran avidez. Ligandos duales o multiespecíficos pueden permitir el entrecruzamiento de dos antígenos, por ejemplo en el reclutamiento de células T citotóxicas para mediar en la muerte de las líneas de células tumorales.

Se prefieren los ligandos sustancialmente puros o proteínas de unión de los mismos, por ejemplo, monómeros de dAb, de al menos 90 a 95% de homogeneidad para la administración a un mamífero, y del 98 al 99% o más de homogeneidad es el más preferido para usos farmacéuticos, especialmente cuando el mamífero es un ser humano. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad según se desee, los ligandos pueden usarse diagnósticamente o terapéuticamente (incluyendo de forma extracorpórea) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes y similares (Lefkovite y PEMIS, (1979 y 1981) Immunological Methods, Volumes I and II, Academic Press, NY).

Por ejemplo, los ligandos o proteínas de unión de los mismos, por ejemplo, monómeros de dAb, de la presente invención típicamente encontrarán utilidad en la prevención, supresión o tratamiento de estados inflamatorios incluyendo las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas. Por ejemplo, los antagonistas y / o ligandos se pueden administrar para tratar, suprimir o prevenir una enfermedad crónica inflamatoria, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o viral, trastornos autoinmunes (que incluyen, pero no se limitan a, diabetes de tipo I, asma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis psoriásica, espondiloartropatía (por ejemplo, espondilitis anquilosante), lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), miastenia grave y síndrome de Behcet), psoriasis, endometriosis, y adherencias abdominales (por ejemplo, tras cirugía abdominal).

En la presente solicitud, el término "prevención" implica la administración de la composición protectora antes de la inducción de la enfermedad. "Supresión" se refiere a la administración de la composición después de un acontecimiento inductor, pero antes de la aparición clínica de la enfermedad. "Tratamiento" implica la administración de la composición protectora después de que los síntomas de la enfermedad se ponen de manifiesto.

Se dispone de sistemas de modelos animales que se pueden usar para detectar la eficacia de los antagonistas de TNFR1 de la invención (p. ej., ligandos, anticuerpos o proteínas de unión de los mismos) en la protección contra, o el tratamiento de, la enfermedad. En la técnica se conocen procedimientos para analizar el lupus eritematoso sistémico (LES) en ratones susceptibles (Knight *et al.* (1978) J. Exp. Med., 147: 1653; Reinersten *et al.* (1978) New Eng. J. Med., 299: 515). La miastenia gravis (MG) se analiza en ratones SJL/J hembras mediante la inducción de la enfermedad con proteína AchR sluble de otra especie (Lindstrom *et al.* (1988) Adv. Immunol., 42: 233). La artritis se induce en una cepa susceptible de ratones mediante inyección de colágeno de tipo II (Stuart *et al.* (1984) Ann. Rev. Immunol., 42: 233). Se ha descrito un modelo mediante el cual se induce artritis adyuvante en ratas susceptibles mediante inyección de proteína del shock térmico micobacteriana (Van Eden *et al.* (1988) Nature, 331: 171). Se induce tiroiditis en ratones mediante la administración de tiroglobulina, tal como se ha descrito (Maron *et al.* (1980) J. Exp. Med., 152: 1115). La diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) se produce de forma natural o se puede inducir en ciertas cepas de ratones, tales como las descritas por Kanasawa *et al.* (1984) Diabetologia, 27: 113. EAE en ratas y ratones sirve como modelo para la EM en seres humanos. En este modelo se induce enfermedad desmielinizante mediante la administración de proteína básica de mielina (véase Paterson (1986) *Textbook of Immunopathology*, Mischer *et al.*, eds., Grune and Stratton, New York, pp. 179 - 213; McFarlin *et al.* (1973) Science, 179: 478; y Satoh *et al.* (1987) J. Immunol., 138: 179).

En general, los presentes antagonistas (p. ej., ligandos) se utilizarán en forma purificada junto con transportadores farmacológicamente adecuados. Normalmente, estos transportadores incluyen soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, todas incluyendo medios salinos y/o tamponados. Vehículos

parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico y solución de Ringer lactato. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si son necesarios para mantener un complejo polipeptídico en suspensión, se pueden escoger de espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.

5 Vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y de nutrientes y reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de ringer. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Edition). Se puede usar una variedad de formulaciones adecuadas, incluidas formulaciones de liberación extendida.

10 Los antagonistas (p. ej., ligandos) de la presente invención se pueden usar en forma de composiciones administradas por separado o junto con otros agentes. Éstos pueden incluir varios fármacos inmunoterapéuticos, tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino, e inmunotoxinas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de varios agentes citotóxicos o de otro tipo junto con los antagonistas (p. ej., ligandos) de la presente invención, o incluso combinaciones de ligandos de acuerdo con la presente invención que tienen diferentes especificidades, tales como ligandos seleccionados usando diferentes antígenos o epítopos diana, se hayan combinado o no antes de la administración.

La vía de administración de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención puede ser cualquiera de las conocidas habitualmente por los expertos en la técnica. Para terapia, incluida la inmunoterapia sin limitaciones, sus ligandos seleccionados de la invención se pueden administrar a cualquier paciente de acuerdo con técnicas estándar. La administración se puede realizar de cualquier modo, incluidas las vías parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, mediante la vía pulmonar o, también, adecuadamente, mediante infusión directa con un catéter. La dosificación y la frecuencia de administración dependerán de la edad, el sexo y la afección del paciente, la administración concurrente de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros que el médico ha de tener en cuenta. La administración puede ser local (p. ej., liberación local en los pulmones mediante administración pulmonar, p. ej., administración intranasal) o sistémica, según lo indicado.

Los ligandos de la presente invención se pueden liofilizar para su almacenamiento y reconstituirse en un transportador adecuado antes de usar. Se ha mostrado que esta técnica es eficaz con las inmunoglobulinas convencionales y se pueden emplear las técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la materia. Los expertos en la técnica pueden apreciar que la liofilización y reconstitución pueden conducir a varios grados de pérdida de actividad del anticuerpo (p. ej., con inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG), y que los niveles de uso pueden tener que ajustarse de forma creciente para compensar.

Las composiciones que contienen los presentes antagonistas de la invención (p. ej., ligandos) o un cóctel de las mismas se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En ciertas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para conseguir al menos una inhibición, supresión, modulación, muerte parciales, o algún otro parámetro mensurable, de una población de células seleccionadas se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades necesarias para alcanzar esta dosificación dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmunitario del paciente pero, en general, varían de 0,0005 a 5,0 mg de ligando, por ejemplo anticuerpo, receptor (p. ej., un receptor de células T) o proteína de unión de los mismos por kilogramo de peso corporal, siendo las dosis de 0,05 a 2,0 mg/kg las más habituales. Para aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes ligandos o cócteles de los mismos también se pueden administrar a dosis similares o ligeramente menores, para prevenir, inhibir o retrasar el inicio de la enfermedad (p. ej., para mantener la remisión o quiescencia, o prevenir la fase aguda). El clínico experto podrá determinar el intervalo de dosificación adecuado para tratar, suprimir o prevenir la enfermedad. Cuando un antagonista de TNFR1 (p. ej., ligando) se administra para tratar, suprimir o prevenir una enfermedad inflamatoria crónica, se puede administrar hasta cuatro veces al día, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes o una vez cada dos meses, a una dosis de, por ejemplo, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg. En formas de realización concretas, el ligando de TNFR1 (e.g., antagonista) se administra para tratar, suprimir o prevenir una enfermedad inflamatoria crónica una vez cada dos semanas o una vez al mes a una dosis de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg (e.g., aproximadamente 10 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg.)

El tratamiento o terapia realizado usando las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva se considera "eficaz" si se reducen uno o más síntomas (p. ej., en al menos 10 % o al menos un punto en una escala de evaluación clínica) respecto a dichos síntomas presentes antes del tratamiento, o respecto a dichos síntomas en un individuo (humano o animal) no tratado con dicha composición u otro control adecuado. Obviamente, los síntomas varían en función de la enfermedad o trastorno diana, pero un clínico o técnico experto los puede medir. Dichos síntomas se pueden medir mediante, por ejemplo, monitorización del nivel de uno o más indicadores bioquímicos de la enfermedad o trastorno (p. ej., niveles de una enzima o metabolito correlacionados con la enfermedad, números de células afectadas etc.), mediante monitorización de las manifestaciones físicas (p. ej., inflamación, tamaño del tumor etc.) o mediante una escala de evaluación clínica aceptada, por ejemplo la escala Expanded Disability Status Scale (para la esclerosis múltiple), el cuestionario Irvine Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (evaluación de 32 puntos de la calidad de vida con respecto a la función intestinal, síntomas sistémicos, función social y estado emocional, la puntuación varía de 32 a 224, en el que las puntuaciones más altas indican una mejor calidad de vida), la escala Quality of Life Rheumatoid Arthritis Scale u otras escalas de evaluación clínica aceptadas conocidas en el campo. Una reducción sostenida (p. ej., un día o más, preferentemente más prolongada) en los síntomas de la enfermedad o trastorno e al menos un 10 % o en uno o más puntos en una escala clínica dada es indicativa de tratamiento "eficaz". De igual forma, la profilaxis realizada usando una composición como se ha descrito en la presente memoria descriptiva es "eficaz" si el inicio o gravedad de uno o más síntomas se retrasa, reduce o anula con respecto a dichos síntomas en un individuo similar (humano o animal) no tratado con la composición.

Una composición que contiene un antagonista (p. ej., ligando) o un cóctel de las mismas de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en contextos profilácticos y terapéuticos para ayudar en la alteración, inactivación, muerte o eliminación de una población celular diana seleccionada en un mamífero. Además, los repertorios seleccionados de polipéptidos descritos en la presente memoria descriptiva se pueden usar de forma extracorpórea o *in vitro* de forma selectiva para matar, depencionar o, de otro modo, eliminar de forma eficaz una población celular diana de un grupo heterogéneo de células. La sangre de un mamífero se puede combinar de forma extracorpórea con los ligandos, por ejemplo anticuerpos, receptores de superficie celular o proteínas de unión de los mismos, de modo que mata las células no deseadas o, de otro modo, son eliminadas de la sangre para devolverla al mamífero de acuerdo con técnicas estándar.

Una composición que contiene un antagonista (p. ej., ligando) o de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en contextos profilácticos y terapéuticos para ayudar en la alteración, inactivación, muerte o eliminación de una población celular diana seleccionada en un mamífero.

Los antagonistas anti-TNFR1 (p. ej., ligandos, monómeros de dAb) se pueden administrar y/o formular juntos con uno o más agentes activos o terapéuticos adicionales. Cuando un antagonista de TNFR1 (p. ej., ligando, monómero de dAb) se administra con un agente terapéutico adicional, el antagonista de TNFR1 se puede administrar antes, de forma simultánea o después de la administración del agente adicional. En general, el antagonista de TNFR1 (p. ej., ligando, monómero de dAb) y el agente adicional se administran de un modo que se produce un solapamiento del efecto terapéutico.

En una realización, la invención proporciona el uso de un ligando de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, supresión o prevención de una enfermedad inflamatoria crónica.

En una realización, la invención proporciona el uso de un ligando de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, supresión o prevención de artritis (p. ej., artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica).

En otra realización, la invención proporciona el uso de un ligando de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, supresión o prevención de la psoriasis.

En otra realización, la invención proporciona el uso de un ligando de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, supresión o prevención de una enfermedad inflamatoria intestinal (p. ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa).

En otra realización, la invención proporciona el uso de un ligando de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, supresión o prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (p. ej., bronquitis crónica, bronquitis obstructiva crónica, enfisema).

En otra realización, la invención es el uso de un ligando de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, supresión o prevención de neumonía (p. ej., neumonía bacteriana, tal como *Staphylococcal pneumonia*),

La invención proporciona el uso de un ligando de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, supresión o prevención de otras enfermedades pulmonares además de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la neumonía. Otras enfermedades pulmonares que se pueden tratar, suprimir o prevenir de acuerdo con la invención incluyen, por ejemplo, fibrosis quística y asma (p. ej., asma resistente a esteroides).

Por tanto, en otra realización, la invención proporciona el uso de un ligando de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, supresión o prevención de una enfermedad pulmonar (p. ej., fibrosis quística,

asma).

En formas de realización concretas, un antagonista de la invención se administra vía liberación pulmonar, tal como mediante inhalación (p. ej., intrabronquial, intranasal o inhalación oral, gotas intranasales) o mediante administración sistémica (p. ej., parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea).

- 5 En otra forma de realización, la invención proporciona el uso de un ligando de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, supresión o del shock séptico, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de TNFR1 (p. ej., un ligando que comprende un monómero de dAb que se une a TNFR1).

- 10 En una forma de realización preferida de la invención, la enfermedad es cáncer o una enfermedad inflamatoria (p. ej., artritis reumatoide, asma o enfermedad de Crohn).

Ejemplos

La invención se describe adicionalmente para fines ilustrativos únicamente, mediante los ejemplos siguientes. Como se usa en el presente documento, con fines de nomenclatura de dAb, el TNF α humano se denomina TAR1 y el receptor 1 del TNF α humano (receptor p55) se denomina TAR2.

- 15 Los ejemplos relacionados con TAR1 solo están incluidos con fines ilustrativos y de soporte de los procedimientos de identificación y preparación de dAb.

Ejemplo 1. Selección de un anticuerpo de scFv de doble especificidad (K8) dirigido contra la seroalbúmina humana (HSA) y β -galactosidasa (β -gal).

- 20 Este ejemplo explica un procedimiento de preparación de un anticuerpo de doble especificidad dirigido contra β -gal and HSA en el que un repertorio de dominios variables V_K unidos a un dominio V_H de la línea germinal (simulado) se selecciona según su unión a β -gal y un repertorio de dominios variables V_H unidos a un dominio V_K de la línea germinal se selecciona según su unión a HSA. Los dominios variables de V_H HSA y V_K β -gal seleccionados se combinan y los anticuerpos se seleccionan según la unión a β -gal y HSA. La HSA es una proteína de semivida creciente hallada en sangre humana.

- 25 En este experimento se usaron cuatro bibliotecas de anticuerpos de fagos humanos.

Biblioteca 1	Línea germinal V_K /DVT V_H	$8,46 \times 10^7$
Biblioteca 2	Línea germinal V_K /NNK V_H	$9,64 \times 10^7$
Biblioteca 3	Línea germinal V_H /DVT V_K	$1,47 \times 10^8$
Biblioteca 4	Línea germinal V_H /NNK V_K	$1,45 \times 10^8$

Todas las bibliotecas se basan en un marco humano único para V_H (V3 - 23/DP47 y JH4b) y V_K (O12/02/DPK9 y JK1) con una diversidad de cadenas laterales incorporadas en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR2 y DR3).

- 30 La biblioteca 1 y la biblioteca 2 contienen una secuencia V_K mientras que la secuencia V_H está diversificada en las posiciones H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97 y H98 (codificados por DVT o NNK, respectivamente) (Figura 1). La biblioteca 3 y la biblioteca 4 contienen una secuencia V_H simulada, mientras que la secuencia V_K está diversificada en las posiciones L50, L53, L91, L92, L93, L94 and L96 (codificados por DVT o NNK, respectivamente) (Figura 1). Las bibliotecas están en el formato del fagemido pIT2/ScFv (Figura 2) y se han preseleccionado según la unión a los ligandos genéricos, proteína A y proteína L, de modo que la mayoría de los clones y las bibliotecas no seleccionadas sean funcionales. Los tamaños de las bibliotecas mostradas anteriormente corresponden a los tamaños después de la preselección. La biblioteca 1 y la biblioteca 2 se mezclaron antes de las selecciones en antígeno para dar una única biblioteca V_H / V_K simulada y la biblioteca 3 y la biblioteca 4 se mezclaron para formar una única biblioteca V_K / V_H simulada.

- 40 Se realizaron tres rondas de selecciones en β -gal usando la biblioteca V_K / V_H simulada y se realizaron tres rondas de selecciones en HSA usando la biblioteca V_H / V_K simulada.

- 45 En el caso de β -gal, los títulos del fago subieron de $1,1 \times 10^6$ en la primera ronda a $2,0 \times 10^8$ en la segunda ronda. En el caso de HSA, los títulos del fago subieron de 2×10^4 en la primera ronda a $1,4 \times 10^9$ en la segunda ronda. Las selecciones se realizaron como describen Griffith *et al.*, (1993), a excepción de que el fago colaborador KM13 (que contiene una proteína pII con un sitio de escisión con proteasa entre los dominios D2 y D3) se usó y el fago eluyó con 1 mg/ml de tripsina en PBS. La adición de tripsina escinde las proteínas pIII derivadas del fago colaborador

(pero no del fagemido) y eluye fusiones scFv-fago unidas mediante escisión en la cola c-myc (Figura 2), de modo que proporciona un enriquecimiento adicional para los fagos que expresan scFv funcionales y una correspondiente reducción del fondo (Kristensen & Winter, *Folding & Design* 3: 321 - 328, Jul 9, 1998). Las selecciones se realizaron usando inmunotubos recubiertos con HSA o β -gal a una concentración de 100 μ g/ml-

5 Para comprobar la unión, se sometió a detección selectiva a 24 colonias de la tercera ronda de cada selección mediante ELISA de fago monoclonal. Las partículas de fago se produjeron como describen Harrison *et al.*, *Methods Enzymol.* 1996;267:83 - 109. Placas de ELISA de 96 pocillos se recubrieron con 100 μ l de HSA o β -gal a una concentración de 10 μ g/ml en PBS durante la noche a 4° C. Se siguió un protocolo estándar de ELISA (Hoogenboom *et al.*, 1991) usando detección del fago unido con un conjugado anti-M13-HRP. Una selección de clones dio señales de ELISA superiores a 1,0 con 50 μ l de sobrenadante.

10 Después, se realizaron preparaciones de ADN de la biblioteca V_H/V_K simulada seleccionada en HSA y de la biblioteca V_K/V_H simulada seleccionada en β -gal usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Para acceder a la mayor parte de la diversidad, realizaron preparaciones de ADN de cada una de las tres rondas de selecciones y después se juntaron para cada uno de los antígenos. Las preparaciones de ADN se digirieron después con SalI/NotI durante la noche a 37°C. Tras la purificación en gel de los fragmentos, las cadenas V_K de la biblioteca V_K/V_H simulada seleccionada en β -gal se ligaron en lugar de una cadena V_K simulada de la biblioteca V_H/V_K simulada seleccionada en HSA, creando una biblioteca de $3,3 \times 10^9$ clones.

15 Esta bibliotecas se seleccionó en HSA (primera ronda) y β -gal (segunda ronda) o selección con HSA β -gal o selección en β -gal (primera ronda) y HSA β -gal (segunda ronda). Las selecciones se realizaron como se ha descrito en lo que antecede. En cada caso, después de la segunda ronda se analizaron 48 clones según su unión a HSA y β -gal mediante el ELISA de fago monoclonal (como se ha descrito en lo que antecede) y mediante ELISA de los fragmentos scFv solubles. Los fragmentos de anticuerpo solubles se produjeron como han descrito Harrison *et al.*, (1996) y se siguió el protocolo de ELISA estándar Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19: 4133, a excepción de que se usó 2 % de Tween/PBS como tampón de bloqueo y los scFv unidos se detectaron con Proteína L-HRP. Tres clones (E4, E5 y E8) de la selección HSA/ β -gal y dos clones (K8 y K10) de la selección β -gal/HSA pudieron unirse a ambos antígenos. Los scFv de estos clones se amplificaron mediante PCR y se secuenciaron como han descrito by Ignatovich *et al.*, (1999) *J Mol Biol* 1999 Nov 26;294(2):457 - 65, usando los cebadores LMB3 y pH ENseq. El análisis de secuencia reveló que todos los clones eran idénticos. Por tanto, solo un clon que codifica un anticuerpo de especificidad doble (K8) se eligió para su procesamiento posterior (Figura 3).

30 Ejemplo 2. Caracterización de las propiedades de unión del anticuerpo K8

En primer lugar, las propiedades de unión del anticuerpo K8 se caracterizaron mediante el ELISA de fago monoclonal. Una placa de 96 pocillos se revistió con 100 μ l de HSA y β -gal junto con fosfatasa alcalina (APS), seroalbúmina bovina (BSA), aglutinina de cacahuete, lisozima y citocromo c (para comprobar la reactividad cruzada) a una concentración de 10 μ g/ml en PBS durante la noche a 4° C. El fagemido del clon K8 clone se rescató con KM13 como describen Harrison *et al.*, (1996) y el sobrenadante (50 μ l) que contie el fago analizado directamente. Se siguió un protocolo de ELISA estándar (Hoogenboom *et al.*, 1991) usando detección del fago unido con un conjugado anti-M13-HRP. Se encontró que el anticuerpo K8 de doble especificidad se une a HSA y β -gal cuando se expresan sobre la superficie del fago con señales de absorbancia superiores a 1,0 (Figura 4). También se observó una unión fuerte a BSA (Figura 4). Dado que HSA and BSA tienen una homología del 76% a nivel de aminoácidos, no es sorprendente que el anticuerpo K8 reconoce ambas proteínas relacionadas estructuralmente. No se detectó reactividad cruzada con otras proteínas (Figura 4).

En segundo lugar, las propiedades de unión del anticuerpo K8 se analizaron en un ELISA scFv soluble. La producción del fragmento de scFv soluble se indujo mediante IPTG como describen Harrison *et al.*, (1996). Para determinar los niveles de expresión del scFv de K8, los fragmentos de anticuerpo soluble se purificaron del sobrenadante de inducciones de 50 ml usando columnas de Proteína A-Sefarosa como describen Harlow and Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, (1988) Cold Spring Harbor. Después se midió la DO_{280} y la concentración proteica se calculó como describen Sambrook *et al.*, (1989). El scFv de K8 se produjo en el sobrenadante a 19 mg/l.

Después se realizó un ELISA de scFv soluble usando concentraciones conocidas del fragmento de anticuerpo K8. Una placa de 96 pocillos se recubrió con 100 μ l de HSA, BSA y β -gal a 10 μ g/ml y 100 μ l de la Proteína A a una concentración de 1 μ g/ml. 50 μ l de las diluciones en serie del scFv de K8 se aplicó y se detectaron fragmentos de anticuerpo unidos a la proteína L-HRP. Los resultados del ELISA confirmaron la naturaleza de doble especificidad del anticuerpo K8 (Figura 5).

Para confirmar la unión a β -gal se determina mediante el dominio V_K y la unión a HSA/BSA por el dominio V_H del anticuerpo scFv K8, el dominio V_K se cortó del ADN del scFv K8 mediante digestión con SalI/NotI y se ligó en un vector pT2 digerido con SalI/NotI que contienen una cadena V_H simulada (Figuras 1 y 2). Las características de unión del clon resultante K8 V_K/V_H simulada se analizaron mediante ELISA de scFv soluble. La producción de los fragmentos de scFv solubles se indujo mediante IPTG como describen Harrison *et al.*, (1996) y el sobrenadante (50 μ l) que contiene scFv analizados directamente. El ELISA de los scFv solubles se realizó como se describe en el ejemplo 1 y los scFv unidos se detectaron con Proteína L-HRP. Los resultados del ELISA revelaron que este clon

todavía era capaz de unirse a β -gal, mientras que la unión a BSA se había anulado (Figura 6).

Ejemplo 3. Selección de los antígenos A y B de los anticuerpos de dominio único V_H y anticuerpos de dominio V_K único dirigidos contra los antígenos C y D.

5 Este ejemplo describe un procedimiento para preparar anticuerpos de dominio V_H único dirigidos contra los antígenos A y B y anticuerpos de dominio V_K único dirigidos contra los antígenos C y D seleccionando los repertorios de dominios variables únicos de anticuerpo vírgenes para la unión a estos antígenos en ausencia de los dominios variables complementarios.

Las selecciones y la caracterización de los clones de unión se realizan como se ha descrito anteriormente (véase el ejemplo 5, documento PCT/GB 02/003014). Se eligen cuatro clones para el trabajo posterior:

10 VH1 - Anti A V_H
 VH2 - Anti B V_H
 VK1 - Anti C V_K
 VK2 - Anti D V_K

15 Los procedimientos descritos anteriormente en los ejemplos 1 – 3 se pueden usar de un modo similar al descrito para producir moléculas dimericas que comprenden combinaciones de dominios V_H (es decir, ligandos de V_H - V_H) y combinaciones de dominios V_L (ligandos de V_L - V_L).

Ejemplo 4. Creación y caracterización de los anticuerpos scFv de especificidad doble ($VH1/VH2$ dirigidos contra los antígenos A y B y $VK1/VK2$ dirigidos contra los antígenos C y D).

20 Este ejemplo demuestra que los anticuerpos scFv de especificidad doble ($VH1/VH2$ dirigidos contra los antígenos A y B y $VK1/VK2$ dirigidos contra los antígenos C y D) podrían crearse combinando los dominios únicos V_K y V_H seleccionados contra los respectivos antígenos en un vector de scFv.

25 Para crear el anticuerpo de especificidad doble $VH1/VH2$, el dominio único $VH1$ se escinde del vector de dominio variable (Figura 7) mediante digestión *NcoI/XhoI* y se liga en el vector 2 del dominio variable digerido con *NcoI/XhoI* (Figura 7) para crear el vector 2 con el dominio variable $VH1$. El dominio único $VH2$ se amplifica mediante PCR a partir del vector 1 del dominio variable usando cebadores para introducir un sitio de restricción con *SalI* en el extremo 5' y un sitio de restricción con *NotI* en el extremo 3'. El producto de la PCR se digiere después con *SalI/NotI* y se liga en el vector 2 de dominio variable $VH1$ digerido con *SalI/NotI* para crear el vector 2 de dominio variable $VH1/VH2$.

30 El vector 2 de dominio variable $VK1/VK2$ se crea de un modo similar. La naturaleza de especificidad doble del $VH1/VH2$ scFv y el $VK1/VK2$ scFv producidos se analiza en un ELISA de scFv soluble como se ha descrito anteriormente (véase el Ejemplo 6, documento PCT/GB 02/003014). El ELISA de competición se realiza como se ha descrito anteriormente (véase el ejemplo 8, documento PCT/GB 02/003014).

Posibles resultados:

- 35 • $VH1/VH2$ scFv puede unirse a los antígenos A y B de forma simultánea
- $VK1/VK2$ scFv puede unirse a los antígenos C y D de forma simultánea
- La unión de $VH1/VH2$ scFv es competitiva (cuando se une al antígeno A, $VH1/VH2$ scFv no se puede unir al antígeno B)
- La unión de $VK1/VK2$ scFv es competitiva (cuando se une al antígeno C, $VK1/VK2$ scFv no se puede unir al antígeno D)

40 **Ejemplo 5. Construcción de Fab de $VH1/VH2$ y Fab $VK1/VK2$ de especificidad doble y análisis de sus propiedades de unión**

45 Para crear $VH1/VH2$ Fab, el dominio único de $VH1$ se liga al vector de CH digerido con *NcoI/XhoI* (Figura 8) para crear $VH1/CH$ y el dominio único de $VH2$ se liga al vector de CK digerido con *SalI/NotI* (Figura 9) para crear $VH2/CK$. El ADN del plásmido de $VH1/CH$ y $VH2/CK$ se usa para co-transformar las células de *E. coli* competentes como se ha descrito anteriormente (véase el Ejemplo 8, documento PCT/GB 02/003014).

El clon que contiene los plásmidos $VH1/CH$ and $VH2/CK$ se induce después con IPTG para producir $VH1/VH2$ Fab soluble como se ha descrito anteriormente (véase el Ejemplo 8, documento PCT/GB 02/003014).

El $VK1/VK2$ Fab se produce de un modo similar.

50 Las propiedades de unión de los Fab producidos se analizan mediante ELISA de competición como se ha descrito anteriormente (véase el ejemplo 8, documento PCT/GB 02/003014).

Posibles resultados:

- VH1/VH2 Fab puede unirse a los antígenos A y B de forma simultánea
- VK1/VK2 Fab puede unirse a los antígenos C y D de forma simultánea
- La unión de VH1/VH2 Fab es competitiva (cuando se une al antígeno A, VH1/VH2 Fab no se puede unir al antígeno B)
- La unión de VK1/VK2 Fab es competitiva (cuando se une al antígeno C, VK1/VK2 Fab no se puede unir al antígeno D)

Ejemplo 6. Dímeros de dAb quelantes

Resumen

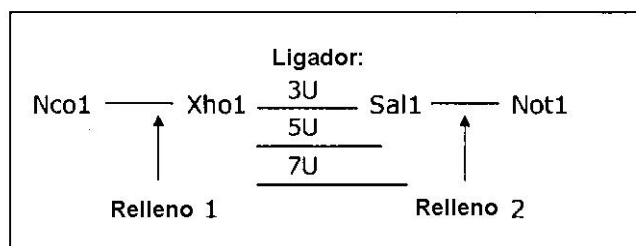
Los homodímeros VH and VK se crean en un formato de dAb-ligador-dAb usando ligadores polipeptídicos flexibles. Los vectores se crearon en el formato dAb-ligador-dAb que contiene ligadores de glicina-serina de longitudes diferentes 3U:(Gly₄Ser)₃ (SEC ID N° 199), 5U:(Gly₄Ser)₅ (SEC ID N° 629), 7U:(Gly₄Ser)₇ (SEC ID N° 630). Se crearon bibliotecas de dímeros usando dAb de guía cadena arriba del ligador. TAR1 - 5 (VK), TAR1 - 27(VK), TAR2 - 5(VH) or TAR2 - 6(VK) y una biblioteca de los correspondientes segundos dAb después del ligador. Usando este procedimiento se detectaron nuevos dAb diméricos. El efecto de la dimerización sobre la unión al antígeno se determinó mediante ELISA y BIAcore y en ensayos de neutralización celular y de unión al receptor. La dimerización de TAR1 - 5 y TAR1 - 27 tuvo como resultado una mejora significativa de la afinidad de unión y de los niveles de neutralización.

1.0 Procedimientos

1.1 Generación de la biblioteca

1.1.1 Vectores

Se diseñaron los vectores pEDA3U, pEDA5U and pEDA7U para introducir diferentes longitudes del ligador compatibles con el formato dAb-ligador-dAb. Para pEDA3U, oligoligadores sentido y antisentido de 73 pares de bases se hibridaron usando un programa de hibridación lenta (95° C-5 min, 80° C-10 min, 70° C-15 min, 56° C-15 min, 42° C hasta su uso) en tampón que contiene NaCl 0,1 M, Tris-HCl 10mM a pH 7,4 y se clonaron usando los sitios de restricción *Xho1* y *Not1*. Los ligadores abarcados 3 unidades (Gly₄Ser) y una región de relleno alojada entre los sitios de clonación *Sal1* y *Not1* (esquema 1). Con el fin de reducir la posibilidad de seleccionar dAb monoméricos para expresión en fagos, la región de relleno se diseñó para incluir 3 codones de terminación, un sitio de restricción *Sac1* y una mutación de desplazamiento de marco para sacar la región fuera del marco cuando no había un segundo dAb presente. Para pEDA5U y 7U debido a la longitud de los ligadores requeridos, se diseñaron oligoligadores solapantes para cada vector, se hibridaron y se alargaron usando Klenow. Después, el fragmento se purificó y se digirió usando las enzimas adecuadas antes de clonar usando los sitios de restricción *Xho1* y *Not1*.



Esquema 1

1.1.2 Preparación de la biblioteca

El gen V de N-terminal correspondiente al dAb de guía se clonó cadena arriba del ligador usando los sitios de restricción *Nco1* y *Xho1*. Los genes VH tienen sitios compatibles existentes, aunque la clonación de los genes VK requirió la introducción de sitios de restricción adecuados. Esto se consiguió usando cebadores de PCR de modificación (VK-DLIBF: 5' cggccatggcgctcaacggacat (SEC ID N° 377); VKXho1R: 5' atgtgcgctcgagcgcttgattt 3' (SEC ID N° 378)) en 30 ciclos de amplificación mediante PCR usando una mezcla 2:1 de SuperTaq (HTBiotechnology Ltd) y *pfu* turbo (Stratagene). El sitio *Nco1* en el extremo 5' se mantuvo y se destruyó el sitio *Sal1* adyacente y se introdujo el sitio *Xho1* en el extremo 3'. Los 5 dAb de guía se clonaron en cada uno de los 3 vectores diméricos. TAR1 - 5 (VK), TAR1 - 27(VK), TAR2 - 5(VH), TAR2 - 6(VK) y TAR2 - 7(VK). Todas las construcciones se verificaron mediante análisis de la secuencia.

Habiendo clonado los dAb de guía cadena arriba del ligador en cada uno de los vectores (pEDA3U, 5U y 7U): TAR1 - 5 (VK), TAR1 - 27(VK), TAR2 - 5(VH) or TAR2 - 6(VK) una biblioteca de los correspondientes segundos dAb se clonaron después del ligador. Para conseguir esto, las bibliotecas de dAb complementario se amplificaron mediante

PCR del fago recuperado de las selecciones de la ronda 1 de una biblioteca VK contra TNF α humano (a una diversidad de aproximadamente 1×10^6 tras la ronda 1) cuando TAR1 - 5 o TAR1 - 27 son los dAb de guía o una biblioteca de VH o VK contra el receptor de TNF p55 humano (ambos a una diversidad de aproximadamente 1×10^5 tras la ronda 1) cuando TAR2 - 5 o TAR2 - 6 son, respectivamente, los dAb de guía. Para las bibliotecas de VK se realizó una amplificación por PCR usando cebadores en 30 ciclos de amplificación por PCR usando una mezcla de 2;1 de SuperTaq y *pfu* turbo. Las bibliotecas de VH se amplificaron por PCR usando cebadores con el fin de introducir un sitio de restricción *Sal*I en el extremo 5' del gen. Las PCR de la biblioteca de dAb se digirieron con las enzimas de restricción adecuados, se ligaron en los correspondientes vectores cadena abajo del ligador, usando sitios de restricción *Sal*I/*Not*I y se sometieron a electroporación en células TG1 competentes recién preparadas.

Los títulos alcanzados para cada biblioteca son los siguientes:

TAR1 - 5: pEDA3U = 4×10^8 , pEDA5U = 8×10^7 , pEDA7U = 1×10^8
 TAR1 - 27: pEDA3U = $6,2 \times 10^8$, pEDA5U = 1×10^8 , pEDA7U = 1×10^9
 TAR2h-5: pEDA3U = 4×10^7 , pEDA5U = 2×10^8 , pEDA7U = 8×10^7
 TAR2h-6: pEDA3U = $7,4 \times 10^8$, pEDA5U = $1,2 \times 10^8$, pEDA7U = $2,2 \times 10^8$

1.2 Selecciones

1.2.1 TNF α

Las selecciones se realizaron usando TNF α humano recubriendo de forma pasiva inmunotubos. Brevemente, inmunotubos se recubren durante la noche con 1-4 ml de antígeno requerido. Los inmunotubos se lavaron a continuación 3 veces con PBS y se bloquearon con 2% de leche en polvo en PBS durante 1-2 horas y se lavaron 3 veces más con PBS. La solución del fago se diluye en 2% de leche en polvo en PBS y se incubaba a temperatura ambiente durante 2 horas. Los tubos se lavan a continuación con PBS y el fago se eluye con 1mg/ml de tripsina-PBS. Se investigaron tres estrategias de selección para las bibliotecas del dímero TAR 1-5. Las selecciones de primera ronda se realizaron en inmunotubos utilizando TNF α humano recubierto en 1 μ g/ml o 20 μ g/ml con 20 lavados en PBS 0,1% de Tween. Las células TG1 se infectan con el fago eluido y los títulos se determinan (por ejemplo, Marks et al J Mol Biol 1991 Dec 5;222(3):581 - 97, Richmann et al Biochemistry. 1993 Aug 31;32(34):8848 - 55).

Los títulos recuperados fueron:

pEDA3U = $2,8 \times 10^7$ (1 μ g/ml TNF) $1,5 \times 10^8$ (20 μ g/ml TNF),
 pEDA5U = $1,8 \times 10^7$ (1 μ g/ml TNF), $1,6 \times 10^8$ (20 μ g/ml TNF)
 pEDA7U = 8×10^6 (1 μ g/ml TNF), 7×10^7 (20 μ g/ml TNF).

Las selecciones segunda ronda se realizaron utilizando 3 procedimientos diferentes.

1. En inmunotubos, 20 lavados con incubación durante la noche seguidos de otros 10 lavados.
2. En inmunotubos, 20 lavados seguidos por 1 hora de incubación a temperatura ambiente en tampón de lavado con (1 μ g/ml de TNF α) y 10 lavados adicionales.
3. Selección en perlas de estreptavidina utilizando 33 pmoles de TNF α humano biotinilado (Henderikx et al., Selection of antibodies against biotinylated antigens. Antibody Phage Display : Methods and protocols, Ed. O'Brien and Atkin, Humana Press). Los clones individuales de las selecciones de la ronda 2 se recogieron en placas de 96 pocillos y se realizaron preparaciones de sobrenadante crudo en formato de placa de 96 pocillos con 2 ml.

Tabla 1.

	Concentración de recubrimiento con TNF α humano del immuno humano Ronda 1	Selección de la ronda 2 Procedimiento 1	Selección de la ronda 2 Procedimiento 2	Selección de la ronda 2 Procedimiento 3
pEDA3U	1 μ g/ml	1×10^9	$1,8 \times 10^9$	$2,4 \times 10^{10}$
pEDA3U	20 μ g/ml	6×10^9	$1,8 \times 10^{10}$	$8,5 \times 10^{10}$
pEDA5U	1 μ g/ml	9×10^8	$1,4 \times 10^9$	$2,8 \times 10^{10}$

(continuación)

	Concentración de recubrimiento con TNF α humano del immuno humano Ronda 1	Selección de la ronda 2 Procedimiento 1	Selección de la ronda 2 Procedimiento 2	Selección de la ronda 2 Procedimiento 3
pEDA5U	20 $\mu\text{g/ml}$	9.5×10^9	$8,5 \times 10^9$	$2,8 \times 10^{10}$
pEDA7U	1 $\mu\text{g/ml}$	7.8×10^8	1.6×10^8	4×10^{10}
pEDA7U	20 $\mu\text{g/ml}$	1×10^{10}	8×10^9	1.5×10^{10}

Para TAR1-27, las selecciones se llevaron a cabo como se describe anteriormente con las siguientes modificaciones. Las selecciones de la primera ronda se realizaron en inmunotubos utilizando TNF α humano recubierto en 1 $\mu\text{g/ml}$ o 20 $\mu\text{g/ml}$ con 20 lavados en PBS 0,1% de Tween. Las selecciones de la segunda ronda se realizaron en inmunotubos utilizando 20 lavados con incubación durante la noche, seguidos de otros 20 lavados. Los clones individuales de las selecciones de la ronda 2 se recogieron en placas de 96 pocillos y se realizaron preparaciones de sobrenadante crudo en formato de placa de 96 pocillos con 2 ml.

Los títulos de TAR1-27 son los siguientes:

Tabla 2.

	Conc. de recubrimiento del inmunotubo con TNF α humano	Ronda 1	Ronda 2
pEDA3U	1 $\mu\text{g/ml}$	4×10^9	6×10^9
pEDA3U	20 $\mu\text{g/ml}$	5×10^9	$4,4 \times 10^{10}$
pEDA5U	1 $\mu\text{g/ml}$	1.5×10^9	$1,9 \times 10^{10}$
pEDA5U	20 $\mu\text{g/ml}$	3.4×10^9	$3,5 \times 10^{10}$
pEDA7U	1 $\mu\text{g/ml}$	$2,6 \times 10^9$	5×10^9
pEDA7U	20 $\mu\text{g/ml}$	7×10^9	$1,4 \times 10^{10}$

1.2.2 RECEPTOR 1 DE TNF (RECEPTOR p55; TAR2)

Las selecciones se llevaron a cabo tal como se describe anteriormente solo para las bibliotecas TAR2h-5. Se realizaron 3 rondas de selecciones en inmunotubos utilizando 1 $\mu\text{g/ml}$ del receptor de TNF p55 humano o 10 $\mu\text{g/ml}$ del receptor de TNF p55 humano con 20 lavados en PBS 0,1% de Tween con incubación durante la noche seguido de otros 20 lavados. Los clones individuales de las secciones de las rondas 2 y 3 se recogieron en placas de 96 pocillos y se realizaron preparaciones de sobrenadante crudo en formato de placa de 96 pocillos con 2 ml.

Los títulos de TAR2h-5 son los siguientes:

Tabla 3.

	Concentración de recubrimiento de los inmunotubo con el receptor de TNF humano p55 Ronda 1	Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
pEDA3U	1 $\mu\text{g/ml}$	$2,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^9$

(continuación)

	Concentración de recubrimiento de los inmunotubo con el receptor de TNF humano p55 Ronda 1	Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
pEDA3U	10 µg/ml	$3,1 \times 10^7$	7×10^7	1×10^9
pEDA5U	1 µg/ml	$2,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$5,7 \times 10^8$
pEDA5U	10 µg/ml	$3,7 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$	$2,9 \times 10^9$
pEDA7U	1 µg/ml	$1,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$1,4 \times 10^9$
pEDA7U	10 µg/ml	$1,6 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	3×10^{10}

1.3 Cribado

5 Los clones individuales de las secciones de las rondas 2 o 3 se recogieron de cada una de las bibliotecas de 3U, 5U y 7U de los diferentes procedimientos de selección, según fuera adecuado. Los clones se cultivaron en 2x TY con 100 µg/ml de ampicilina y 1% de glucosa durante la noche a 37 ° C. Una dilución 1/100 de este cultivo se inoculó en 2 ml de 2x TY con 100 µg/ml de ampicilina y glucosa 0,1% en 2 ml, formato de placa de 96 pocillos y se cultivaron a 37 ° C agitando hasta que la DO600 fue aproximadamente 0,9. El cultivo se indujo con IPTG 1 mM durante la noche a 30 ° C. Los sobrenadantes se aclararon mediante centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos en una placa centrífuga Sorval. El sobrenadante preparados se usaron para la selección inicial.

1.3.1 ELISA

15 La actividad de unión de las proteínas recombinantes dimericas se comparó con el monómero mediante ELISA de la proteína A/L o mediante ELISA del antígeno. Brevemente, una placa de 96 pocillos se recubre con antígeno o proteína A / L durante la noche a 4 ° C. La placa se lavó con 0,05% de Tween-PBS, se bloqueó durante 2 horas con 2% de Tween-PBS. La muestra se añadió a la placa incubada durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lava y se incuba con el reactivo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lava y desarrolla con sustrato TMB. La proteína A / L-HRP o India-HRP se utilizó como un reactivo secundario. Para los ELISA del antígeno, las concentraciones de antígeno utilizadas fueron 1 µg/ml en PBS durante TNFα humano y el receptor de THF humano 1. Debido a la presencia del dAb de guía en la mayoría de los casos, los dímeros dieron una señal de ELISA positiva, por tanto, la determinación de la tasa *off* se examinó mediante BIAcore.

1.3.2 BIAcore

25 El análisis BIAcore se llevó a cabo para los clones TAR1-5 y TAR2h-5. Para el cribado, el TNFα humano se acopló a un chip CM5 a alta densidad (aproximadamente 10.000 RU). 50 µl de TNFα humano (50 µg/ml) se acopló al chip en 5 µl/min en tampón de acetato - pH 5,5. La regeneración del chip tras el análisis usando los procedimientos estándar no es posible debido a la inestabilidad del TNFα humano, por lo tanto, después de analizar cada muestra, el chip se lavó durante 10 minutos con tampón. Para los clones TAR1-5, los sobrenadantes de la selección de la ronda 2 se seleccionaron mediante BIAcore.

48 clones se seleccionaron de cada una de las bibliotecas de 3U, 5U y 7U obtenidos utilizando los siguientes procedimientos de selección:

30 R1: inmunotubo 1 µg/ml de TNFα humano, R2 inmunotubo 1 µg/ml de TNFα humano, lavado durante la noche.

R1: inmunotubo 20 µg/ml de TNFα humano, R2 inmunotubo 20 µg/ml de TNFα humano, lavado durante la noche.

R1: inmunotubo 1 µg/ml de TNFα humano, R2 33 pmoles perlas de biotiniladas TNFα humano.

R1: inmunotubo 20 µg/ml TNFα humano, R2 33 pmoles perlas de biotiniladas TNFα humano.

35 Para el cribado, el receptor de TNF humano p55 se acopló a un chip de CM5 a alta densidad (aproximadamente 4000 RU). 100 µl de receptor de TNF humano p55 (10 µg / ml) se acopló al chip en 5 µl/min en tampón de acetato – a pH 5,5. Se examinaron las condiciones de regeneración estándar (glicina pH 2 o pH 3) pero en cada caso se eliminó el antígeno de la superficie del chip, por tanto, como con TNFα, por lo tanto, después de analizar cada

muestra, el chip se lavó durante 10 minutos con tampón.

Para TAR2-5, se seleccionaron los sobrenadantes de los clones de la selección de la ronda 2. 48 clones se seleccionaron de cada una de las bibliotecas 3U, 5U y 7U, utilizando los procedimientos de selección siguientes:

5 R1: inmunotubo 1 µg/ml del receptor de TNF humano p55, R2, inmunotubo 1 µg/ml del receptor de TNF humano p55, lavado durante la noche.

R1: inmunotubo 10 µg/ml del receptor de TNF humano p55, R2, inmunotubo 10 µg/ml del receptor de TNF humano p55, lavado durante la noche

1.3.3 Análisis del receptor y las células

La capacidad de los dímeros para neutralizar en el análisis del receptor se realizó de la siguiente manera:

10 Unión al receptor

Los dAb anti-TNF-α se analizaron por su capacidad para inhibir la unión del TNF al receptor de TNF recombinante 1 (p55). Brevemente, placas Maxisorp se incubaron durante la noche con 30 mg/ml de anticuerpo monoclonal de ratón de Fc anti-humano (Zymed, San Francisco, EE.UU.). Los pocillos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene 0,05 % de Tween-20 y, después, se bloquearon con 1 % de BSA en PBS antes de
15 incubar con 100 ng/ml de la proteína de fusión del receptor del TNF 1 Fc (R&D Systems, Minneapolis, EE.UU.). El dAb anti-TNF-α se mezcló con TNF, que después se añadió a los pocillos lavados a una concentración final de 10 ng/ml. La unión de TNF se detectó con 0,2 mg/ml de anticuerpo anti-TNF biotinilado (HyCult biotechnology, Uden, Países Bajos), seguido por una dilución de 1 en 500 de estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (Amersham Biosciences, 20 UK) e incubación con sustrato TMB KPL, Gaithersburg, EE.UU.). La reacción se detuvo
20 mediante la adición de HCl y la absorbancia se leyó a 450 nm. La actividad del dAb anti-TNF conduce a una disminución de la citotoxicidad de TNF y, por tanto, a un incremento en la absorbancia en comparación con el control sólo de TNF.

Ensayo de citotoxicidad de L929

Los dAb anti-TNF se analizaron también para determinar la capacidad para neutralizar la actividad citotóxica del TNF en fibroblastos de ratón L929 (Evans, T. (2000) Molecular Biotechnology 15, 243248). Brevemente, las células L929
25 se sembraron en placas de microtitulación se incubaron durante la noche con dAb anti-TNF-α, 100 pg/ml de TNF y 1 mg/ml de actinomicina D (Sigma, Poole, Reino Unido). La viabilidad de las células se midió leyendo la absorbancia a 490 nm, seguido por una incubación con [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3 carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (Promega, Madison, EE.UU.). La actividad del dAb anti-TNF conduce a una disminución de la citotoxicidad
30 de TNF y, por tanto, a un incremento en la absorbancia en comparación con el control sólo de TNF.

En la criba inicial, los sobrenadantes preparados para el análisis BIAcore, descritos anteriormente, también se utilizaron en el ensayo de receptor. Un análisis más detallado de dímeros seleccionados también se llevó a cabo en el receptor y de células utilizando ensayos de proteínas purificadas.

Ensayo de HeLa IL-8

35 Los dAb anti-TNFR1 o anti-TNF alfa se analizaron para determinar la capacidad de neutralizar la inducción de la secreción de IL-8 por TNF en células HeLa (procedimiento adaptado del de Akesson, L. et al (1996) Journal of Biological Chemistry 271, 30517-30523, que describe la inducción de IL-8 por la IL-1 en HUVEC; en el presente documento se fijan en la inducción por TNF alfa humano y se usan células HeLa en lugar de la línea de células HUVEC). Brevemente, las células HeLa en placas de microtitulación se incubaron durante la noche con dAb y 300
40 pg de TNF. Después de la incubación, el sobrenadante se aspiró de las células y se midió la concentración de la IL-8 a través de un ELISA de tipo sándwich (R & D Systems). La actividad anti-TNFE1 de dAb conduce a una disminución en la secreción de IL-8 en el sobrenadante en comparación con solo el control de TNF.

El ensayo de L929 se utiliza a lo largo de los siguientes experimentos; sin embargo, se prefiere el uso del ensayo de HeLa con IL-8 para medir los ligandos anti-receptor 1 de TNF p55; la presencia de p55 de ratón en el ensayo L929
45 presenta ciertas limitaciones en su uso.

1.4 Análisis de la secuencia

Los dímeros que demostraron tener propiedades interesantes en el BIAcore y las detecciones del ensayo de receptores se secuenciaron. Las secuencias se detallan en el listado de secuencias.

1.5 Formateo

1.5.1 Dímeros TAR1-5-19

Los dímeros TAR1-5 que mostraron buenas propiedades de neutralización fueron reformateados y analizados en los ensayos celulares y de receptores. El dAb de guía de TAR1-5 se substituyó con el clon madurado por afinidad TAR1-5-19. Para lograr esto, el TAR1-5 se clonó fuera del par dímero individual y se substituyó con TAR1-5-19, que se había amplificado por PCR. Además, los homodímeros TAR1-5-19 también se construyeron en los vectores 3U, 5U y 7U. La copia de en N terminal del gen se amplificó por PCR y se clonó como se ha descrito anteriormente y el fragmento del gen en C-terminal se clonó usando los sitios de restricción existentes *Sal1y Not1*.

1.5.2 Mutagénesis

El codón de terminación ámbar presente en dAb2, uno de los dAb en C-terminal en los pares del dímero TAR1-5 se mutó a una glutamina mediante mutagénesis dirigida al sitio.

1.5.3 Fab

Los dímeros que contienen TAR1-5 o TAR1-5-19 se reformatearon en vectores de expresión de Fab. Los dAb se clonaron en vectores de expresión que contienen los genes CK o CH utilizando los sitios de restricción *Sfi1y Not1* y se verificaron por análisis de la secuencia. El vector CK deriva de un vector basado en pUC de resistencia a ampicilina y el vector CH procede de un vector pACYC resistente al cloranfenicol. Para la expresión de Fab se cotransformaron las construcciones dAb-CH y DAB-CK en células HB2151 y se cultivaron en 2x TY que contiene 0,1% de glucosa, ampicilina 100 µg/ml y cloranfenicol 10 µg/ml.

1.5.3 Dimerización de la bisagra

Se examinó la dimerización de los dAb mediante la formación de enlaces de cistina. Una secuencia corta de aminoácidos EPKSGDKTHTCPPCP (SEC ID N° 379) una forma modificada de la bisagra IgGC1 humana se sometió a ingeniería en la región C terminal en el dAb. Una oligonucleótido que codifica para esta secuencia se sintetizó e hibridó, como se ha descrito anteriormente. El ligador se clonó en el vector que contiene PEDTA TAR1-5-19 usando los sitios de restricción *Xho1y Not1*. La dimerización se produce *in situ* en el periplasma.

1.6 Expresión y purificación

1.6.1 Expresión

Los sobrenadantes se prepararon en el formato de placa de 96 pocillos con 2 ml para el cribado inicial como se ha descrito anteriormente. Tras el proceso de selección inicial se analizaron más dímeros seleccionados. Construcciones Dímero se expresaron en TOP10F 'o células HB2151 como sobrenadantes. En resumen, una colonia individual de una placa recién estriada se cultivó durante la noche a 37 ° C en 2x TY con ampicilina 100µg/ml y 1% de glucosa. Una dilución 1/100 de este cultivo se inoculó en 2x TY con ampicilina 100µg/ml y 0,1% de glucosa y se cultivó a 37 ° C agitando hasta que la DO600 fue aproximadamente 0,9. El cultivo se indujo con IPTG 1 mM durante la noche a 30 ° C. Las células se separaron por centrifugación y el sobrenadante se purificó con proteína A o L agarosa.

Los dímeros bisagra de cisteína y Fab se expresaron como proteínas periplásmicas en células HB2152. Una dilución 1/100 de un cultivo de una noche se inoculó en 2x TY con 0,1% de glucosa y los antibióticos apropiados y se cultivó a 30 ° C agitando hasta que la DO600 fue de aproximadamente 0,9. El cultivo se indujo con IPTG 1 mM durante 3-4 horas a 25 ° C. Las células se recogieron por centrifugación y el sedimento se resuspendió en tampón de preparación periplásmico (Tris-HCl 30 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, 20% de sacarosa). Después de la centrifugación el sobrenadante se conservó y el sedimento se resuspendió en MgSO₄, 5 mM, El sobrenadante se recogió de nuevo por centrifugación, se combinó y se purificó.

1.6.2 Purificación de la proteína A/L

La optimización de la purificación de proteínas de dímero de agarosa de proteína L (Affitech, Noruega) o agarosa de proteína A se examinó (Sigma, Reino Unido). La proteína se eluyó por lotes o por elución en columna utilizando una bomba peristáltica. Se analizaron tres tampones pH2.6 tampón fosfato-citrato 0,1 M, glicina 0,2 M pH 2,5 y glicina 0,1 M pH 2,5. La condición óptima se determinó que era en condiciones de bomba peristáltica utilizando glicina 0,1 M pH 2,5 sobre 10 volúmenes de columna. La purificación de la proteína A se llevó a cabo condiciones de bomba peristáltica utilizando glicina 0,1 M pH 2,5.

1.6.3 Purificación FPLC

La purificación adicional se llevó a cabo mediante análisis de FPLC en el sistema 100 de AKTA Explorer (Amersham Biosciences Ltd). Los dímeros TAR1-5 y TAR1-5-19 se fraccionaron mediante cromatografía de intercambio

catiónico (1 ml Resource Q Amersham Biosciences Ltd) se eluyó con un gradiente de NaCl 0-1M en tampón de acetato 50 mM pH 4. Los dímeros de la bisagra se purificaron mediante intercambio iónico (1 ml Resource Q Amersham Biosciences Ltd.) eluido con un gradiente de NaCl 0-1M en Tris HCl 25mM, pH 8,0. Los Fab se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño usando un Superose 12 (Amersham Biosciences Ltd) de a un caudal de la columna de 0,5 ml/min en PBS con 0,05% de Tween. Tras la purificación, las muestras se concentraron utilizando concentradores vivaspin con un corte de 5K (Vivascience Ltd).

2.0 Resultados

2.1 Dímeros TAR1-5

6 x 96 clones se recogieron de la ronda de selección 2 que abarca todas las bibliotecas y las condiciones de selección. Las preparaciones de sobrenadante realizaron y analizaron por antígeno y proteína L en ELISA, BIAcore y en los ensayos de receptores. En los ELISA, los clones positivos a la unión se identificaron de cada procedimiento de selección y se distribuyeron en las bibliotecas 3U, 5U y 7U. Sin embargo, como siempre había dAb de guía no fue posible discriminar entre los aglutinantes de alta y baja afinidad por este procedimiento por lo tanto, se llevó a cabo análisis BIAcore.

El análisis BIAcore se realizó utilizando los sobrenadantes de 2 ml. El Análisis BIAcore reveló que las tasas de K_{off} del dímero habían mejorado mucho en comparación con TAR1-5 monomérico. La tasa K_{off} del monómero estaba en el rango de 10^{-1} M en comparación con las tasas de K_{off} dímero que estaban en el rango de 10^{-3} - 10^{-4} M. 16 clones que parecían tener tasas off muy lentas se seleccionaron y procedían de las bibliotecas 3U, 5U y 7U y se secuenciaron. Además se analizaron los sobrenadantes para determinar la capacidad de neutralizar TNF α humano en el ensayo de receptor.

6 clones principales (d1-d6 a continuación) que neutralizaron en estos ensayos y se han secuenciado. Los resultados muestran que, de los 6 clones obtenidos sólo hay 3 segundos dAb diferentes (DAB1, Dab2 y DAB3) sin embargo, cuando el segundo dAb se encuentra más de una vez, están unidos a dligadores de difeente longitud.

TAR1-5D1: 3U ligador 2° dAb = dAb1 - 1µg/ml Ag inmunotubo lavado durante la noche

TAR1-5d2: ligador 3U 2° dAb = dAb2 - 1µg/ml Ag inmunotubo lavado durante la noche

TAR1-5D3: 5U ligador 2° dAb = dAb2 - 1µg/ml Ag inmunotubo lavado durante la noche

TAR1-5d4: ligador 5U 2° dAb = DAB3 - 20µg/ml Ag inmunotubo lavado durante la noche

TAR1-5d5: ligador 5U 2° dAb = dAb1 - 20µg/ml Ag inmunotubo lavado durante la noche

TAR1-5d6: ligador 7U 2nddAb = dAb1-R1: 1µg/ml Ag inmunotubo lavado durante la noche, R2: cuentas

Los 6 clones principales se analizaron adicionalmente. La proteína se produjo a partir del periplasma y el sobrenadante, se purificó con proteína L agarosa y se examinó en los ensayos celulares y de receptores. Los niveles de neutralización fueron variables (Tabla 1). Se determinaron las condiciones óptimas para la preparación de proteína. La proteína producida a partir de células HB2151 como sobrenadantes dio el mayor rendimiento (aproximadamente 10 mgs / L de cultivo). Los sobrenadantes se incubaron con proteína L agarosa durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 ° C. Las perlas se lavaron con PBS / NaCl y se empaquetaron en una columna FPLC utilizando una bomba peristáltica. Las perlas se lavaron con 10 volúmenes de columna de PBS / NaCl y se eluyeron con glicina 0,1 M pH 2,5. En general, la proteína dimérica eluye después del monómero.

Los dímeros TAR1-5D1-6 se purificaron mediante FPLC. Se obtuvieron tres especies, mediante purificación por FPLC y se identificaron mediante SDS PAGE. Una especie corresponde al monómero y las otras dos especies corresponden a los dímeros de diferentes tamaños. La mayor de las dos especies es, posiblemente, debido a la presencia de marcadores C terminales. Estas proteínas se analizaron en el ensayo con receptores. Los datos presentados en la tabla 1 representan los resultados óptimos obtenidos a partir de las dos especies diméricas (Figura 11)

Los tres segundos dAb de los pares del dímero (es decir, dAb1, dAb2 y DAB3) se clonaron como monómeros y se analizaron mediante ELISA y en el ensayo de células y receptores. Los tres dAb unen específicamente a TNF mediante ELISA de antígeno y no sufren reacciones cruzadas con plástico o BSA. Como monómeros, ninguno de los dAb neutralizar en los ensayos de células o receptores.

2.1.2 Dímeros TAR1-5-19

TAR1-5-19 se sustituyó por TAR1-5 en los 6 clones principales. El análisis de todos los dímeros TAR1-5-19 en los ensayos de células y los receptores se realizó utilizando la proteína total (proteína L purificada solamente) a menos que se indique lo contrario (Tabla 2). TAR1-5-19d4 y TAR1-5-19d3 tienen la mejor DN50 en el ensayo de células, esto es consistente con los resultados del análisis del receptor y es una mejora sobre el monómero TAR1-5-19 (DN50~ 30 nM). Aunque los dímeros TAR1-5 purificados dan resultados variables en los análisis de receptores de células y los dímeros TAR1-5 fueron más consistentes. La variabilidad se demostró al utilizar diferentes tampones de elución durante la purificación de proteínas. La elución usando tampón fosfato-citrato 0,1 M pH2.6 o glicina 0,2 M pH 2,5, aunque la eliminación de todas las proteínas de la agarosa proteína L en la mayoría de los casos la hacía menos funcional.

TAR1-5-19d4 se expresó en el fermentador y se purificó en FPLC de intercambio catiónico para dar un dímero completamente puro. Como con TAR1-5d4 se obtuvieron tres especies, mediante purificación por FPLC que corresponde al monómero y dos especies de dímero. Se secuenciaron los aminoácidos de este dímero. TAR1-5-19 monómero y TAR1-5-19d4 se analizaron en la continuación en el análisis del receptor y la CI resultante para el monómero fue 30 nM y para el dímero fue 8 nM. Los resultados del ensayo de receptores se compararon de TAR1-5-19 monómero, TAR1-5-19d4 y TAR1-5d4 se muestran en la figura 10.

Los homodímeros TAR1-5-19 se hicieron en los vectores 3U, 5U y 7U, expresaron y purificaron en proteína L. Se examinaron las proteínas en los ensayos de células y receptores y las CI50 (para el ensayo del receptor) y las DN50 (para ensayo de células) se determinaron (tabla 3, figura 12).

2.2 Fab

Los dímeros TAR1-5 y TAR1-5-19 también se clonaron en formato Fab, expresaron y se purificaron en proteína L agarosa. Fab se evaluaron en los ensayos de receptores (Tabla 4). Los resultados mostraron que para ambos dímeros TAR1-5-19 y TAR1-5, los niveles de neutralización fueron similares a los dímeros Gly4Ser ligadores originales de los que derivan. Se expresó un TAR1-5-19 Fab donde TAR1-5-19 se demostró en ambos CH y CK, la proteína L se purificó y se evaluó en el estudio de los receptores. La CI50 resultante fue aproximadamente de 1 nM.

2.3 Dímeros TAR1-27

3 x 96 clones se recogieron a partir de la ronda de selección 2 que abarca todas las bibliotecas y las condiciones de selección. Preparaciones de sobrenadante de 2 ml se hicieron para el análisis en ELISA y bioensayos. Antígeno ELISA dio 71 clones positivos. El análisis del receptor de sobrenadantes en bruto proporcionó 42 clones con propiedades inhibitorias (unión del TNF 0-60%). En la mayoría de los casos las propiedades inhibitorias se correlacionaron con una fuerte señal de ELISA. 42 clones fueron secuenciados, 39 de éstos tienen secuencias únicas segundo dAb. Los 12 dímeros que dieron las mejores propiedades inhibitorias fueron analizados.

Los 12 clones neutralizantes se expresaron como preparaciones de sobrenadante de 200 ml y se purificó en la proteína L. Éstos fueron evaluados por la proteína L y el antígeno de ELISA, BIAcore y en el análisis del receptor. Señales de ELISA positivas fuertes se obtuvieron en todos los casos. El análisis BIAcore reveló todos los clones de tener rápido dentro y fuera de las tasas. Las tasas de descuento se han mejorado en comparación con el monómero TAR1-27, sin embargo la tasa de descuento de TAR1-27 dímeros era más rápido (Koff se encuentra aproximadamente en el rango de 10⁻¹ y 10⁻²M) que los dímeros TAR1-5 examinados anteriormente (Koff es aproximadamente en el rango de 10⁻³ a 10⁻⁴M). La estabilidad de los dímeros purificados se cuestionó y por lo tanto, con el fin de mejorar la estabilidad, la adición de 5% de glicerol, 0,5% de Triton X100 o 0,5% de NP40 (Sigma) se incluyó en la purificación de 2 TAR1-27 dímeros (d2 y d16). La adición de NP40 o Triton X100™ mejoró el rendimiento del producto purificado aproximadamente 2 veces. Ambos dímeros se evaluaron en el ensayo del receptor. Tar1-27d2 dio CI50 de ~ 30 nM en todas las condiciones de purificación. TAR1-27d16 no mostró ningún efecto de neutralización cuando se purificó sin la utilización de agentes estabilizantes pero dio una CI50 de ~ 50 nM cuando se purifica en condiciones de estabilización. No se realizó ningún análisis.

2.4 Dímeros TAR2-5

3 x 96 clones se recogieron a partir de las selecciones de la segunda ronda que abarcan todas las bibliotecas y las condiciones de selección. Preparaciones de sobrenadante de 2 ml se hicieron para el análisis. Proteína A y de antígenos ELISA se llevaron a cabo para cada placa. 30 clones interesantes fueron identificados como teniendo buenos fuera de las tasas por BIAcore (Koff oscila entre 10⁻² a 10⁻³M). Los clones se secuenciaron y 13 dímeros únicos fueron identificados por análisis de la secuencia.

Tabla 4: Dímeros TAR1-5

Dímero	Tipo de la célula	Purificación	Fracción proteica		Condiciones de elución	Ensayo de receptor / célula
TAR1-5d1	HB2151	Proteína L + FPLC	pequeñas diméricas	especies	Glicina 0,1 M pH 2,5	RA ~ 30 nM
TAR1-5d2	HB2151	Proteína L + FPLC	pequeñas diméricas	especies	Glicina 0,1 M pH 2,5	RA ~ 50 nM
TAR1-5d3	HB2151	Proteína L + FPLC	grandes diméricas	especies	Glicina 0,1 M pH 2,5	RA ~ 300 nM
TAR1-5d4	HB2151	Proteína L + FPLC	pequeñas diméricas	especies	Glicina 0,1 M pH 2,5	RA ~ 3 nM
TAR1-5d5	HB2151	Proteína L + FPLC	grandes diméricas	especies	Glicina 0,1 M pH 2,5	RA ~ 200 nM
TAR1-5d6	HB2151	Proteína L + FPLC	Especies grandes	diméricas	Glicina 0,1 M pH 2,5	RA ~ 100 nM

* Obsérvese que el dímero 2 y el dímero 3 dímero tienen el mismo segundo dAb (llamado dAb2), sin embargo, tienen diferentes longitudes de ligador (d2 = (Gly₄Ser)₃, d3 = (Gly₄Ser)₃). dAb1 es el dAb pareja de los dímeros 1, 5 y 6. DAB3 es es el dAb pareja del dímero 4. Ninguno de los dAb asociados se neutralizan solos. La purificación por FPLC es por intercambio de cationes a menos que se indique lo contrario. Las especies diméricas óptimas para cada dímero obtenidas por FPLC se determinaron en estos ensayos.

Tabla 5: Dímeros TAR1-5-19

Dímero	Tipo de la célula	Purificación	Fracción proteica	Condiciones de elución	Ensayo de receptor / célula
TAR1-5-19d1	TOP10F '	Proteína L	La proteína total	Glicina 0,1 M de pH 2,0	RA ~ 15 nM
5-19 TAR1-d2 (sin codón de terminación)	TOP10F '	Proteína L	Proteína total	Glicina 0,1 M de pH 2,0 + 0,05% de NP40	RA ~ 2nM
TAR1-5-19d3 (sin codón de terminación)	TOP10F '	Proteína L	Proteína total	Glicina 0,1 M de pH 2,5 + 0,05% de NP40	RA ~ 8 nM
TAR1-5-19d4	TOP10F '	Proteína L + FPLC	Fracción FPLC purificado	Glicina 0,1 M pH 2,0	RA ~ 2-5 nM CA ~ 12 nM
TAR1-5-19d5	TOP10F '	Proteína L	Proteína total	Glicina 0,1 M pH 2,0 + NP40	RA ~ 8 nM CA ~ 10 nM
TAR1-5-19 d6	TOP10F '	Proteína L	Proteína total	Glicina 0,1 M de pH 2,0	RA ~ 10 nM

Tabla 6: Homodímeros TAR1-5-19

Dímero	Tipo de la célula	Purificación	Fracción proteica	Condiciones de elución	Ensayo de receptor / célula
TAR1-5-19 homodímero	3U	HB2151	Proteína L	Proteína total	Glicina 0,1 M pH 2,5 RA ~ 20 nM CA ~ 30 nM
TAR1-5-19 homodímero	5U	HB2151	Proteína L	Proteína total	Glicina 0,1 M pH 2,5 RA ~ 2nM CA ~ 3 nM
TAR1-5-19 homodímero	7U	HB2151	Proteína L	Proteína total	Glicina 0,1 M pH 2,5 RA ~ 10 nM CA ~ 15 nM
TAR1-5-19 bisagra	cys	HB2151	Proteína L + FPLC	Fracción de dímero purificada por FPLC	Glicina 0,1 M pH 2,5 RA ~ 2nM
TAR1-5-19CH / TAR1-5-19 CK	/	HB2151	Proteína	Proteína total	Glicina 0,1 M pH 2,5 RA ~ 1 nM

Tabla 7: Fab TAR1-5/TAR1-5-19

Dímero	Tipo de la célula	Purificación	Fracción proteica	Condiciones de elución	Ensayo de receptor / célula
TAR1-5CH / dAb1 CK	HB2151	Proteína L	Proteína total	0,1 M pH2.6 citrato	RA ~ 90nm
TAR1-5CH / dAb2 CK	HB2151	Proteína L	Proteína total	Glicina 0,1 M pH 2,5	RA ~ 30 nM CA ~ 60 nM
dAb3CH / TAR1-5CK	HB2151	Proteína L	Proteína total	0,1 M pH2.6 citrato	RA ~ 100n M
TAR1-5-19CH / dAb1 CK	HB2151	Proteína L	Proteína total	Glicina 0,1 M pH 2,0	RA ~ 6 nM
dAb1 CH / TAR1-5-19CK	HB2151	Proteína L	Glicina 0,1 M pH 2,0	Myc / flag	RA ~ 6 nM
TAR1-5-19CH / dAb2 CK	HB2151	Proteína L	Proteína total	Glicina 0,1 M pH 2,0	RA ~ 8 nM CA ~ 12 nM
TAR1-5-19CH / dAb3CK	/	HB2151	Proteína L	Proteína total	Glicina 0,1 M pH 2,0 RA ~ 3 nM

5 Ejemplo 7. Dimerización de dAb mediante unión de cisteína terminal

Resumen

Para Dimerización de dAb, una cisteína libre ha sido diseñado en el extremo C-terminal de la proteína. Cuando se expresa la proteína forma un dímero que puede purificarse por un procedimiento de purificación de dos pasos.

Construcción por PCR del dímero TAR1-5-19CYS

- 10 Véase el ejemplo 8 que describe el trímero de dAb. El protocolo trímero da lugar a una mezcla de monómero, dímero y trímero.

Expresión y purificación de del dímero TAR1-5-19CY

El dímero se purificó a partir del sobrenadante del cultivo por captura en proteína L agarosa como se describe en el ejemplo 8.

Separación de monómero TAR1-5-19CYS del dímero TAR1-5-19CYS

- 5 Antes de la separación por intercambio catiónico, la muestra mixta de monómero / dímero era intercambio de tampón en 50 mM de acetato de sodio tampón a pH 4,0 utilizando una columna PD-10 (Amersham Pharmacia), siguiendo las directrices del fabricante. A continuación, la muestra se aplicó a la columna de cationes un Recurso 1 ml de cambio S (Amersham Pharmacia), que había sido pre-equilibrada con 50 mM de acetato de sodio pH 4,0. El monómero y el dímero se separaron usando el siguiente gradiente de sal en 50 mM de acetato de sodio pH 4,0:

Cloruro sódico 150 a 200 mM sobre 15 volúmenes de columna

- 10 Cloruro de sodio 200 a 450 mM sobre 10 volúmenes de columna

Cloruro de sodio 450 a 1000 mM sobre 15 volúmenes de columna

Las fracciones que contenían dímero sólo se identificaron utilizando SDS-PAGE y luego combinaron y el pH aumentó a 8 mediante la adición de 1/5 volumen de Tris 1 M pH 8,0.

Ensayo de unión funcional in vitro: análisis del receptor TNF y análisis de células

- 15 La afinidad del dímero para el TNF α humano se determinó usando el ensayo de células y receptores de TNF. La CI50 en el ensayo del receptor fue de aproximadamente 0,3-0,8 nM; la DN50 en el ensayo de células fue de aproximadamente 3-8 nM.

Otros posibles formatos de dímero TAR1-5-19CYS

Dímeros PEG y dímeros de maleimida sintéticos adaptados

- 20 La Compañía Nektar (Shearwater) ofrece diversos PEG bi-maleimida [mPEG2-(MAL)2 or mPEG-(MAL)2] que permitirían formatear el monómero como un dímero con un ligador pequeño separando los dAb y estando ambos unidos a un PEG de tamaño variable de 5 a 40 kDa. Se ha demostrado que mPEG-(MAL)2 5kDa (es decir [TAR1-5-19]-Cys-maleimida-PEG x 2, en el que las maleimidas están unidas en el dímero) tiene una afinidad en el ensayo de receptores de TNF de ~ 1-3 nM. Asimismo, el dímero también se puede producir usando TMEA (Tris[2-maleimidoetil]amina) (Pierce Biotechnology) u otros ligadores bifuncionales.
- 25

También es posible producir el dímero disulfuro usando un procedimiento de acoplamiento químico usando 2,2'-ditiopiridina (Sigma Aldrich) y el monómero reducido.

Adición de un ligador polipeptídico o bisagra en el extremo C del dAb.

- 30 Un pequeño ligador ((Gly₄Ser)_n en el que n=1 a 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, una inmunoglobulina (p. ej., la región bisagra de la IgG o secuencia peptídica aleatoria (p. ej., seleccionada de una biblioteca de secuencias peptídicas aleatorias) se pueden someter a ingeniería entre el dAb y el residuo de cisteína terminal. Esto se puede usar después para fabricar dímeros como se ha indicado anteriormente.

Ejemplo 8. Dimerización de dAb

Resumen

- 35 Para la dimerización de dAb se requiere una cisteína libre en el extremo C de la proteína. El residuo de cisteína, una vez reducido para dar el tiol libre, puede usarse para acoplar de forma específica la proteína a una molécula de maleimida trimérica, por ejemplo TMEA (Tris[2-maleimidoetil]amina).

Construcción mediante PCR de TAR1-5-19CYS

- 40 Los siguientes oligonucleótidos se usaron para, específicamente, PCR de TAR1-5-19 con los sitios *Sall* and *Bam*HI para clonación y también introducir un residuo de cisteína en C-terminal:

Sall

~~~~~

Trp Ser Ala Ser Thr Asp\* Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 TGG AGC GCG TCG ACG GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCT CTG TCT GCA TCT GTA  
 ACC TCG CGC AGC TGC CTG TAG GTC TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGA GAC AGA CGT AGA CAT

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr Leu His Trp  
 61 GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT GAT AGT TAT TTA CAT TGG  
 CCT CTG GCA CAG TGG TAG TGA ACG GCC CGT TCA GTC TCG TAA CTA TCA ATA AAT GTA ACC

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln  
 121 TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AGT GCA TCC GAG TTG CAA  
 ATG GTC GTC TTT GGT CCC TTT CGG GGA TTC GAG GAC TAG ATA TCA CGT AGG CTC AAC GTT

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 181 AGT GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC  
 TCA CCC CAG GGT AGT GCA AAG TCA CCG TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro  
 241 AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG GTT GTG TGG CGT CCT  
 TCG TCA GAC GTT GGA CTT CTA AAA CGA TGC ATG ATG ACA GTT GTC CAA CAC ACC GCA GGA

BamHI  
 ~~~~~

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Cys *** ** Gly Ser Gly
 301 TTT ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG TGC TAA TAA GGA TCC GGC
 AAA TGC AAG CCG GTT CCC TGG TTC CAC CTT TAG TTT GCC ACG ATT ATT CCT AGG CCG

(* inicio de la secuencia TAR1-5-19CYS ; secuencia de aminoácidos TAR1-5-19CYS (SEC ID N° 293; TAR1-5-19CYS secuencia de nucleótidos (SEC ID N°294, hebra de codificación; SEC ID N°295, hebra no codificante)
 5 cebador directo5'-TGGAGCGCGTTCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCA-3' (SEC ID N°296) cebador inverso 5'-TTAGCAGCCGGATCCTTATTAGCACCGTTTGATTCCAC-3' (SEC ID N°297)

La reacción de PCR (volumen de (50 µl) se fijó del siguiente modo: dNTP 200µM, 0,4 µM de cada cebador, 5 µl de 10x tampón *PfuTurbo* (Stratagene), 100 ng del plásmido molde (que codifica TAR1-5-19), 1µl de la enzima *PfuTurbo* (Stratagene) y el volumen ajustado a 50 µl usando agua estéril. Se usaron las siguientes condiciones de PCR: Etapa de desnaturalización inicial a 94° C durante 2 minutos, después 25 ciclos 94° C durante 30 segundos, 64 °c durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, También se incluyó una etapa de extensión final de 72 °C durante 5 minutos. El producto de la PCR se purificó y digirió con *Sall* y *BamHI* y se ligó en el vector que también se había cortado con las mismas enzimas de restricción. Los clones correctos se verificaron mediante secuenciación del ADN.

15 Expresión y purificación deTAR1-5-19CYS

El vector TAR1-5-19CYS se transformó en células BL21 (DE3) pLysS químicamente competentes (Novagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Las células portadoras del plásmido con dAb se seleccionaron usando 100µg/ml de carbenicilina y 37 µg/ml de cloranfenicol. Los cultivos se fijaron en matraces de Erlenmeyer de 2 l que contenían 500 caldo (Sigma-Aldrich), 100µg/ml de carbenicilina y 37 µg/ml de cloranfenicol. Los cultivos se cultivaron a 30 °C a 200 rpm hasta una DO600 de 1-1.5 y se indujeron con IPTG 1 Mm (isoproil-beta-D-tiogalactopiranosido, de Melford Laboratories). La expresión del dAb se dejó continuar durante 12-16 horas a 30 °C. Se encontró que la mayoría de los dAb estaban presentes en los medios de cultivo. Por tanto, las células se separaron del medio mediante centrifugación (8.000xg for 30 min), y el sobrenadante se usó para purificar el dAb. Por litro de sobrenadante, se añadieron 30 ml de proteína L agarosa (Affitech) y el dAb se dejó unir de forma discontinua con agitación durante 2 horas. Después, la resina se dejó sedimentar por gravedad durante otra hora antes de eliminar el sobrenadante. Después, la agarosa se empaquetó en una columna XK 50 (Amersham Phamacia) y se lavó con 10 volúmenes de coumna de PBS. El dAb unido se eluyó con glicina 100 mM a pH ,20 y las fracciones con la proteína se neutralizaron mediante la adición de 1/5 volúmenes de Tris 1M a pH 8,0. Por litro de sobrenadante de cultivo se aislaron 20 mg de proteína pura que contenían una proporción 50:50 de monómero:dímero.

30 Trimerización de PCR de TAR1-5-19CYS

2.5 ml de TAR1-5-19CYS 100 µM se redujeron con ditiotreitól 5 mM y se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después, la muestra se intercambió con tampón usando una columna PD-10 (Amersham Pharmacia). La

columna se había preequilibrado con EDTA 5 mM, fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 y la muestra se aplicó y eluyó siguiendo las directrices del fabricante. La muestra se introdujo en hielo hasta que se necesitó. TMEA (Tris[2-maleimidoetil]amina) se adquirió en Pierce Biotechnology. Se preparó una solución 20 mM de TMEA en 100% de DMSO (dimetilsulfóxido). Se encontró que una concentración de TMEA superior a 3:1 (proporción molar de dAb:TMEA causaba la rápida precipitación y reticulación de la proteína. Asimismo, la tasa de precipitación y reticulación fue mayor a medida que aumentaba el pH. Por tanto, el uso de 100 μ M redujo TAR1-5-19CYS, se añadió TMEA 25 μ M para trimerizar la proteína y la reacción se dejó progresar a temperatura ambiente durante dos horas. Se encontró que la adición de aditivos tales como glicerol o etilenglicol hasta 20% (v/v) reducía significativamente la precipitación del trímero a medida que progresaba la reacción de acoplamiento. Después del acoplamiento, el análisis SDS-PAGE mostró la presencia de monómero, dímero y trímero en solución.

Purificación de TAR1-5-19CYS trimérico

Se añadieron 40 μ l de ácido acético glacial al 40% por ml de reacción de TMEA-TAR1-5-19cys para reducir el pH a ~4. La muestra se aplicó después a 1 ml de columna de intercambio catiónico Resource S (Amersham Pharmacia), que se había preequilibrado con acetato sódico 50 mM a pH 4,0. El dímero y el trímero se separaron parcialmente usando un gradiente de sales de cloruro sódico 340 a 450 mM, acetato sódico 50 mM a pH 4,0 sobre 30 volúmenes de columna. Las fracciones que contienen solo trímero se identificaron usando SDS-PAGE y después se combinaron y el pH se aumentó a 8 mediante la adición de 1/5 del volumen de Tris 1M a pH 8,0. Para evitar la precipitación del trímero durante las etapas de concentración (usando concentradores vivaspin de corte a 5K, Vivascience), se añadió 10% de glicerol a la muestra.

Ensayo de unión funcional *in vitro*: ensayo de receptores de TNF y ensayo celular

La afinidad del trímero para el TNF α humano se determinó usando el ensayo de células y receptores de TNF. La CI₅₀ en el ensayo del receptor fue de 0,3 nM; la DN₅₀ en el ensayo de células fue de aproximadamente 3 a 10 nM (p. ej., .3nM).

Otros posibles formatos de trímero TAR1-5-19CYS

TAR1-5-19CYS también se puede formatear en un trímero usando los reactivos siguientes:

Trímeros PEG y trímeros de maleimida sintéticos adaptados

Nektar (Shearwater) ofrece una serie de PEG de múltiples brazos que se pueden modificar químicamente en el extremo terminal del PEG. Por tanto, el uso de un trímero PEG con un grupo funcional de maleimida al final de cada brazo permitiría la trimerización del dAb de un modo similar al indicado anteriormente usando TMEA. El PEG también puede tener la ventaja de aumentar la solubilidad del trímero, de modo que se evita el problema de la agregación. Por tanto, se podría producir un trímero de dAb en el que cada dAb tiene una cisteína en C-terminal que está unida a un grupo funcional maleimida, estando los grupos funcionales maleimida unidos a un trímero PEG.

Adición de un ligador polipeptídico o bisagra en el extremo C del dAb.

Un pequeño ligador ((Gly₄Ser)_n en el que n=1 a 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, una inmunoglobulina (p. ej., la región bisagra de la IgG o secuencia peptídica aleatoria (p. ej., seleccionada de una biblioteca de secuencias peptídicas aleatorias) se pueden someter a ingeniería entre el dAb y el residuo de cisteína terminal. Cuando se usa para hacer multímeros (p. ej., trímeros o dímeros), de nuevo introduciría un grado más alto de flexibilidad y distancia entre los monómeros individuales, lo que puede mejorar las características de unión a la diana, por ejemplo una diana de múltiples subunidades, tales como TNF α .

Ejemplo 9. Selección de una colección de anticuerpos de dominio único (dAb) dirigidos contra la seroalbúmina humana (HSA) y la seroalbúmina de ratón (MSA).

Este ejemplo explica un procedimiento para fabricar un anticuerpo de dominio único (dAb) dirigido contra la seroalbúmina. Se describe la selección de dAb contra la seroalbúmina de ratón (MSA) y seroalbúmina humana (HSA). En este experimento se usaron tres bibliotecas de anticuerpos de expresión en fagos humanos, cada una basada en un único marco humano para V_H (véase la Figura 13: secuencia de V_H simulada basada en V3-23/DP47 y JH4b) o V_K (véase la Figura 15: secuencia de V_K simulada basada en o12/o2/DPK9 y Jk1) con diversidad de cadenas laterales codificada por los codones NNK, incorporada en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3).

Biblioteca 1 (V_H):

Diversidad en las posiciones: H30, H31, H33, H35, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H97, H98.

Tamaño de la biblioteca: $6,2 \times 10^9$

Biblioteca 2 (V_H):

Diversidad en las posiciones: H30, H31, H33, H35, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H97, H98, H99, H100, H100a, H100b.

5 Tamaño de la biblioteca: $4,3 \times 10^9$

Biblioteca 3 (V_K):

Diversidad en las posiciones: L30, L31, L32, L34, L50, L53, L91, L92, L93, L94, L96 Tamaño de la biblioteca: 2×10^9

10 Las bibliotecas V_H y V_K se preseleccionaron según la unión a los ligandos genéricos proteína A y proteína L, respectivamente, de modo que la mayoría de los clones y las bibliotecas no seleccionadas sean funcionales. Los tamaños de las bibliotecas mostradas anteriormente corresponden a los tamaños después de la preselección.

15 Se realizaron dos rondas de selección con seroalbúmina usando cada una de las bibliotecas por separado. Para cada selección, se recubrieron inmunotubos con el antígeno (nunc) en 4 ml de PBS a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. En la primera ronda de selección, cada una de las tres bibliotecas se sometió a detección por separado frente a HSA (Sigma) y MSA (Sigma). En la segunda ronda de selección, el fago de cada una de las seis primeras selecciones de las rondas se sometió a detección contra (i) el mismo antígeno de nuevo (p. ej., 1ª ronda MSA, 2ª ronda MSA) y (ii) contra el antígeno recíproco (por ejemplo, 1ª ronda de MSA, 2ª ronda de HSA), resultando en un total de doce segundas selecciones. En cada caso, después de la segunda ronda de selección, se analizaron 48 clones para determinar la unión a HSA y MSA. Fragmentos dAb solubles se produjeron como se describe para los fragmentos scFv por Harrison et al, Methods Enzymol.1996; 267:83-109y el protocolo de ELISA estándar fue seguida (Hoogenboom et al. (1991) Nucleic Acids Res., 19: 4133) Excepto que el 2% de Tween PBS se utilizó como un tampón de bloqueo y los dAb unidos se detectaron, ya sea con proteína L-HRP (Sigma) (para la V_K s) y proteína A-HRP (Amersham Pharmacia Biotech) (para la V_H s).

25 dAb que dieron una señal por encima del fondo que indica la unión a MSA, HSA o ambos se pusieron a prueba en forma insoluble de ELISA para la unión a plástico solo pero todos eran específicos para la albúmina de suero. Los clones fueron secuenciados (véase el tabla 2 siguiente) que revela que se habían identificado 21 secuencias dAb únicas. La similitud mínima (en el nivel de aminoácidos) entre los clones dAb seleccionados V_K fue 86,25% (69/80) x 100; el resultado cuando todos los restos diversificados son diferentes, por ejemplo, los clones 24 y 34). La similitud mínima entre la V_H clones dAb seleccionados fue del 94% ((127/136) x100).

30 A continuación, los dAb unión a la albúmina de suero se ensayaron para determinar su capacidad para capturar el antígeno biotinilado de la solución. Protocolo ELISA (como anteriormente) ha sido seguido excepto que la placa de ELISA se revistió con 1 $\mu\text{g/ml}$ proteína L (para los clones V_K) y de la proteína 1 $\mu\text{g/ml}$ A (para la V_H clones). Soluble dAb fue capturado de la solución como en el protocolo y la detección fue con MSA o HSA biotinilados y estreptavidina HRP. El MSA y HSA biotinilado se habían preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con el objetivo de conseguir un promedio de 2 biotinas por molécula de albúmina de suero. Se identificaron veinte clones que capturaron MSA biotinilado de la solución en el ELISA. Dos de estos (clones 2 y 38 a continuación) capturaron también HSA biotinilado. A continuación, los dAb se ensayaron para determinar su capacidad para unirse a MSA recubierto en un chip BIAcore CM5. Se encontraron ocho clones que unía a MSA en el biacore.

Tabla 8.

dAb (toda la MSA biotinilada de captura)	H o K	CDR1	CDR2	CDR3	¿Se une a en biacore ?	¿Captura la HAS biotinilada?
Biblioteca 3 de V_K molde (simulada)	K	XXXLX (SEC ID N°298)	XASXLQS (SEC ID N°299)	QQXXXXPXT (SEC ID N°300)		

40

ES 2 471 943 T3

(continuación)

dAb (toda la MSA biotinilada de captura)	H o κ	CDR1	CDR2	CDR3	¿Se une a en biacore ?	¿Captura la HAS biotinilada?
2,4,7,41,	κ	SSYLN (SEC ID N°301)	RASPLQS (SEC ID N°302)	QQTYSVPPT (SEC ID N°303)		✓ los 4 se unen
38, 54	κ	SSYLN (SEC ID N°304)	RASPLQS (SEC ID N°305)	QQTYRIPPT (SEC ID N°306)		✓ ambos se unen
46,47,52,56	κ	FKSLK (SEC ID N°307)	NASYLQS (SEC ID N°308)	QQVYWPVT (SEC ID N°309)		
13, 15	κ	YYHLK (SEC ID N°310)	KASTLQS (SEC ID N°311)	QQVRKVPRT (SEC ID N°312)		
30,35	κ	RRYLK (SEC ID N°313)	QASVLQS (SEC ID N°314)	QQGLYPIT (SEC ID N°315)		
19,	κ	YNWLK (SEC ID N°316)	RASSLQS (SEC ID N°317)	QQNVVIPRT (SEC ID N°318)		
22,	κ	LWHLR (SEC ID N°319)	HASLLQS (SEC ID N°320)	QQSAVYPKT (SEC ID N°321)		
23,	κ	FRYLA (SEC ID N°322)	HASHLQS (SEC ID N°323)	QQRLLYPKT (SEC ID N°324)		
24,	κ	FYHLA (SEC ID N°325)	PASKLQS (SEC ID N°326)	QQRARWPRT (SEC ID N°327)		
31,	κ	IWHLN (SEC ID N°328)	RASRLQS (SEC ID N°329)	QQVARVPRT (SEC ID N°330)		
33,	κ	YRYLR (SEC ID N°331)	KASSLQS (SEC ID N°332)	QQYVGYPRT (SEC ID N°333)		
34,	κ	LKYLK (SEC ID N°334)	NASHLQS (SEC ID N°335)	QQTTYYPIT (SEC ID N°336)		
53,	κ	LRYLR (SEC ID N°337)	KASWLQS (SEC ID N°338)	QQVLYYPQT (SEC ID N°339)		

ES 2 471 943 T3

(continuación)

dAb (toda la MSA biotinilada de captura)	H o κ	CDR1	CDR2	CDR3	¿Se une a en biacore ?	¿Captura la HAS biotinilada?
11,	κ	LRLSK (SEC ID N°340)	AASRLQS (SEC ID N°341)	QQVVYWPAT (SEC ID N°342)	✓	
12,	κ	FRHLK (SEC ID N°343)	AASRLQS (SEC ID N°344)	QQVALYPKT (SEC ID N°345)	✓	
17,	κ	RKYLR (SEC ID N°346)	TASSLQS (SEC ID N°347)	QQNLFWPRT (SEC ID N°348)	✓	
18,	κ	RRYLN (SEC ID N°349)	AASSLQS (SEC ID N° 350)	QQMLFYPKT (SEC ID N°351)	✓	
16, 21	κ	IKHLK (SEC ID N°352)	GASRLQS (SEC ID N°353)	QQGARWPQT (SEC ID N°354)	✓	
25,26	κ	YYHLK (SEC ID N°355)	KASTLQS (SEC ID N°356)	QQVRKVPRT (SEC ID N°357)	✓	
27,	κ	YKHLK (SEC ID N°358)	NASHLQS (SEC ID N°359)	QQVGRYPKT (SEC ID N°360)	✓	
55,	κ	FKSLK (SEC ID N°361)	NASYLQS (SEC ID N°362)	QQVVYWPVT (SEC ID N°363)	✓	
Biblioteca 1 (y 2) de V _H (molde simulada)	H	XXYXXX (SEC ID N°364)	XIXXXGXXTXYADS VKG (SEC ID N°365)	XXXX (XXXX) FDY (SEC ID N°366)		
8, 10	H	WVYQMD (SEC ID N°367)	SISAFGAKTLYADS VKG (SEC ID N°368)	LSGKFDY (SEC ID N°369)		
36,	H	WSYQMT (SEC ID N°370)	SISSFGSSTLYADS VKG (SEC ID N°371)	GRDHNYSFLDY (SEC ID N°372)		

En todos los casos los marcos eran idénticos a los marcos en la secuencia ficticia correspondiente, con diversidad en las CDR como se indica en la tabla anterior.

De los ocho clones que unían la MSA en el biacore, dos clones que están altamente expresados en *E. coli* fueron elegidos para el estudio adicional (véase el ejemplo 10). Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos completas para MSA16 y 26 se dan en la figura 16.

Ejemplo 10. Determinación de la afinidad y la semivida en suero de ratón de la unión de dAb de MSA16 y NSA26 a MSA.

Los dAb MSA16 y MSA26 se expresaron en el periplasma de *E. coli* y se purificaron usando absorción por lotes a la resina de afinidad de proteína-L agarosa (Affitech, Noruega) seguido de elución con glicina a pH 2,2. Los dAb purificados se analizaron a continuación por biacore de inhibición para determinar la K_d . Brevemente, las MSA16 y MSA26 purificadas se analizaron para determinar la concentración de dAb requerida para conseguir 200 UR de respuesta en un chip CM5 biacore recubierto con una densidad elevada de MSA. Una vez que se han determinado las concentraciones requeridas de dAb, el antígeno de MSA a un intervalo de concentraciones en torno a la K_d prevista se mezcló previamente con el dAb y se incubó durante la noche. La unión al chip de BIAcore recubierto de MSA de dAb en cada una de las premezclas se midió después a una alta velocidad de flujo de 30 μ l / minuto. Las curvas resultantes se usaron para crear gráficos Klotz, que dieron una K_d estimada de 200 nM para MSA16 y 70 nM para MSA 26 (Figura 17 A y B).

A continuación, los clones MSA16 y MSA26 se clonaron en un vector de expresión con la etiqueta HA (secuencia de ácido nucleico: TATCCTTATGATGTTCTGATTATGCA (SEC ID N° 373) y la secuencia de aminoácidos: YPYDVDPDYA (SEC ID N° 374) y 2-10 mg cantidades eran expresado en *E. coli* y se purificó a partir del sobrenadante con proteína L-resina de afinidad de agarosa (Affitech, Noruega) y se eluyó con glicina a pH 2,2. Semivida en suero de los dAb se determinó en el ratón. MSA26 y MSA16 se dosificaron como inyecciones iv individuales en aprox 1.5mg/kg en ratones CD1. Análisis de los niveles en suero fue de anti-HA (Abcam, UK) de captura de cabra y la proteína L-HRP (Invitrogen) de detección ELISA que fue bloqueado con un 4% Marvel. Lavado estaba con 0,05% de Tween PBS. Las curvas de calibración de concentraciones conocidas de dAb se establecieron en presencia de suero 1xmouse para garantizar la comparabilidad con las muestras de prueba. Modelado con un modelo de 2 compartimentos demostró MSA-26 tenía un $t_{1/2\alpha}$ de 0.16hr, un $t_{1/2\beta}$ de 14.5hr y un área bajo la curva (AUC) de 465hr.mg/ml (datos no mostrados) y MSA-16 tenía un $t_{1/2\alpha}$ de 0.98hr, un $t_{1/2\beta}$ de 36.5hr y una AUC de 913hr.mg/ml (figura 18). Ambos clones anti-MSA habían prolongado considerablemente la semivida en comparación con HEL4 (un dAb anti-lisozima blanca de huevo de gallina) que tenía una $t_{1/2\alpha}$ de 0,06 h, y un $t_{1/2\beta}$ de 0,34 h.

Ejemplo 11. Creación de fragmentos de tipo Fab de doble especificidad VH-VH y Vk-Vk

Este ejemplo describe un procedimiento para la fabricación de VH- VH y Vk-Vk específicos duales como fragmentos de tipo Fab. Antes de construir cada uno de los Fragmentos de tipo Fab descritos, los dAb que se unen a dianas de elección fueron seleccionados primero a partir de bibliotecas de dAb similares a los descritos en el ejemplo 9. AVHdAb, HEL4, que se une a la lisozima de huevo de gallina (Sigma) fue aislado y una segunda VHDAB (TAR2h-5) que se une al receptor de TNF α (sistemas de I + D y) también se aisló. Las secuencias de éstos se dan en la lista de secuencias. Un dAb de Vk que se une TNF α (-5-19 TAR1) se aisló por selección y maduración de afinidad y la secuencia también se expone en la lista de secuencias. Un segundo dAb de Vk (MSA 26) descrito en el ejemplo 9 cuya secuencia está en la figura 17B se utilizó también en estos experimentos.

Los ADN de vectores de expresión que contienen los cuatro dAb descritos anteriormente se digirieron con las enzimas Sall y NotI para escindir el ADN que codifica el dAb. Una banda del tamaño esperado (300-400 pb) se purificó pasando la digestión en un gel de agarosa y escindiendo la banda, seguido de purificación en gel utilizando el kit de purificación en gel de Qiagen (Qiagen, Reino Unido). A continuación, se inserta el ADN que codifica para los dAb en cualquiera de los C_H o vectores de C_k (figs. 8 y 9) como se indica en la tabla a continuación.

Tabla 9.

dAb	Antígeno diana	dAb V _H o dAb V _k	Insertado en el vector	cola terminal) (C	Resistencia a los antibióticos
HEL4	Lisozima de huevo de gallina	V _H	C _H	Myc	Cloranfenicol
TAR2-5	Receptor de TNF	V _H	C _k	Marcador	Ampicilina

(continuación)

dAb	Antígeno diana	dAb V _H dAb V _K	Insertado en el vector	cola (C terminal)	Resistencia a los antibióticos
TAR1-5-19	TNF α	Vk	C _H	Myc	Cloranfenicol
MSA 26	Seroalbúmina de ratón	Vk	Ck	Marcador	Ampicilina

Las construcciones V_HC_H y V_H Ck se cotransformaron en células HB2151. Por separado, el V_K C_H y construcciones V_K Ck fueron contrasformados en células HB2151. Los cultivos de cada una de las líneas celulares cotransformadas se cultivaron durante la noche (en 2x TY que contenía 5% de glucosa, cloranfenicol y ampicilina 100 µg/ml 10 µg/ml para mantener la selección de antibióticos, tanto para C_H y plásmidos Ck). Los cultivos de una noche se usaron para inocular medio fresco (2x TY, 10 µg/ml cloranfenicol y 100 µg/ml ampicilina) y se hicieron crecer a OD 0,7-0,9 antes de la inducción mediante la adición de IPTG para expresar su C_H y Ck construye. Expresado como Fab fragmento fue purificado a continuación a partir del periplasma por la proteína A de purificación (por la contrasformada V_HC_H y V_HCk) y MSA de purificación de resina de afinidad (para la contrasformada V_K C_H y V_K Ck).

Doble especificidad V_H-V_H

La expresión de V_H C_H and V_H Ck de doble especificidad se analizó pasando la proteína por un gel. El gel se transfirió y se pudo detectar una banda del tamaño previsto para el fragmento Fab sobre la transferencia Western mediante la cola myc y la cola flag, lo que indica que las partes V_H C_H y V_H Ck del fragmento de tipo Fab estaban presentes. Después, con el fin de determinar si las dos mitades de la doble especificidad estaban presentes en el mismo fragmento de tipo Fab, una placa de ELISA se revistió durante la noche a 4 °C con 100 µl por pocillo de lisozima de huevo de gallina (HEL) a 3 mg/ml in en tampón de bicarbonato sódico. La placa se bloqueó después (como se describe en el ejemplo 1) con 25 de tween PBS, seguido de incubación con el fragmento de tipo Fab de doble especificidad V_H C_H /V_H Ck. La detección de la unión de la doble especificidad a HEL se produjo a través de la cadena no afín usando 9e10 (un anticuerpo monoclonal que se une a la cola de myc, Roche) el complejo anti- IgG-HRP de ratón (Amersham Pharmacia Biotech). La señal para el fragmento de tipo Fab de doble especificidad V_H C_H /V_H Ck fue 0,154 en comparación con una señal de fondo de 0,069 para la cadena V_H Ck expresada sola. Esto demuestra que el fragmento de tipo Fab tiene especificidad de unión por el antígeno diana.

Especificidad doble V_K-V_K

Después de purificar el fragmento de tipo Fab con especificidad doble V_K C_H y V_K Ck cotransformado en una resina de afinidad por MSA, la proteína resultante se usó para sondear una placa de ELISA revestida con 1 µg/ml de TNF α y una placa de ELISA revestida con 10 µg/ml de MSA. Como se ha precedido, en ambas placas de ELISA había señales por encima de la basal cuando se detectó con la proteína L-HRP (datos no mostrados). Esto indicó que la fracción de proteína capaz de unirse a MSA (y, por tanto, purificarse en la columna de afinidad de MSA) también podía unirse al TNF α en un ELISA posterior, lo que confirma la especificidad doble del fragmento de anticuerpo. Esta fracción de proteína se usó después para dos experimentos posteriores. En primer lugar, una placa de ELISA recubierta con 1 µg/ml de TNF α se sondeó con un fragmento Fab de V_KC_H y V_K C_K de especificidad doble y y también con un dAb control de unión a TNF α a una concentración calculada para dar una señal similar en el ELISA. Los dAb de especificidad doble y de control se usaron como sondas en la placa de ELISA en presencia y en ausencia de 2 mg/ml de MSA. La señal en el pocillo de doble especificidad se redujo en más del 50%, pero la señal en el pocillo de dAb no se redujo en absoluto (véase la figura 19a). La misma proteína también se introdujo en el ensayo de los receptores con y sin MSA y la competencia por MSA también se demostró (véase la Figura 19c). Esto demuestra que la unión de MSA al de especificidad doble es competitiva con la unión al TNF α .

Ejemplo 12. Creación de una especificidad doble V_K- V_K unida por cys con especificidad doble específica de seroalbúmina de ratón y TNF α

Este ejemplo describe un procedimiento para fabricar un fragmento de especificidad doble específico de seroalbúmina y de TNF α de ratón mediante acoplamiento químico a través de un enlace disulfuro. Tanto MSA16 (del ejemplo 1) como dAb TAR1-5-19 se clonaron en un vector basado en pET con una cisteína en C terminal y sin marcadores. Los dos dAb se expresaron a niveles de 4-10 mg y se purificaron del sobrenadante usando la resina de afinidad de proteína L-agarosa (Affitieh, Noruega). Los dAb marcados con cisteína se redujeron después con ditiotretol. El dAb TAR1-5-19 se acopló después con ditiopiridina para bloquear la reformación de los enlaces disulfuro en la formación de los homodímeros PEP 1-5-19. Los dos dAb diferentes se mezclaron a continuación a un

Ph 6,5 para estimular la formación de enlaces disulfuro y la generación de heterodímeros TAR1-5-19, MSA16 unidos por cys. Este procedimiento para producir conjugados de dos proteínas distintas se describió originalmente en King *et al.* (King TP, Li Y Kochoumian L Biochemistry. 1978 voll7:1499-506 Preparation of protein conjugates via intermolecular disulfide bond formation.) Los heterodímeros se separaron de las especies monoméricas mediante intercambio catiónico. La separación se confirmó mediante la presencia de una banda del tamaño previsto en un gel de SDS. Las especies heterodiméricas resultantes se analizaron en el ensayo de receptores de TNF y se encontró que tenían una CI50 para neutralizar el TNF de aproximadamente 18 nM. A continuación, el ensayo de receptores se repitió con una concentración constante del heterodímero (18 nM) y una serie de diluciones de MSA y HSA. La presencia de HSA en un intervalo de concentraciones (hasta 2 mg / ml) no causó una reducción en la capacidad del dímero para inhibir el TNF α . Sin embargo, la adición de MSA produjo una reducción dependiente de la dosis en la capacidad del dímero para inhibir TNF α (Figura 20). Esto demuestra que MSA y TNF α compiten por la unión al dímero TAR1 - -5-19, MSA16 unido por Cys.

Sumario de datos

En el Anexo 4 se presenta un resumen de los datos obtenidos en los experimentos expuestos en los ejemplos anteriores.

Ejemplo 13

Actividad de dAb anti-TNFR1 de ratón y dAb anti-TNFR1 humano

Tabla 10 Actividad de los dAb anti-TNFR1 de ratón

dAb	Actividad (CI50)	
	Ensayo de células L929	Ensayo de unión a receptor
TAR2m-19	10 μ M	2 μ M
TAR2m-20	n/d	150 nM
TAR2m-21	400 nM	n/d
TAR2m-24	1 μ M	1,3 μ M
TAR2m-21-23	1 nM	n/d
TAR2m-21-07	10 nM	n/d
TAR2m-21-43	6nM	n/d
TAR2m-21-48	6nM	n/d
TAR2m-21-10	30 nM	n/d
TAR2m-21-06	100 nM	n/d
TAR2m-21-17	300 nM	n/d
n/d, no determinado		

Tabla 11 Actividad de los dAb anti-TNFR1 humano

dAb	Actividad (CI50)	
	Ensayo de células HeLa IL-8	Ensayo de unión a receptor
TAR2h-10	50 nM	30 nM
TAR2h-12	100 nM	n/d
TAR2h-13	300 nM	n/d
TAR2h-14	300 nM	30 nM
TAR2h-15	n/d	5 nM
TAR2h-16	200 nM	30 nM
TAR2h-17	n/d	100 nM
TAR2h-18	400 nM	n/d
TAR2h-22	n/d	200 nM
TAR2h-27	3000 nM	30 nM
TAR2h-29	300 nM	300 nM
TAR2h-32	100 nM	n/d
TAR2h-34	n/d	300 nM
TAR2h-35	800 nM	n/d
TAR2h-41	30 nM	8nM
TAR2h-42	10 nM	15 nM
TAR2h-44	300 nM	10 nM
TAR2h-47	n/d	8nM
TAR2h-51	n/d	80 nM
TAR2h-67	300 nM	n/d
TAR2h-10-1	n/d	10 nM
TAR2h-10-2	n/d	11 nM
TAR2h-10-3	n/d	11 nM

(continuación)

dAb	Actividad (CI50)	
	Ensayo de células HeLa IL-8	Ensayo de unión a receptor
TAR2h-10-4	n/d	8 nM
TAR2h-10-5	n/d	11 nM
TAR2h-10-7	30 nM	n/d
TAR2h-10-27	10 nM	2nM
TAR2h-10-55	20 nM	n/d
n/d, no determinado		

Ensayo de liberación de IL-8 en MRC-5

Las actividades de determinados dAb que se unen a TNFR1 se evaluaron en el siguiente ensayo de células MRC-5. El ensayo se basa en la inducción de la secreción de IL-8 por TNF en células MRC-5 y se adapta del procedimiento descrito en Alceson, L. et al. *Journal of Biological Chemistry* 271:30517-30523 (1996), que describe la inducción de IL-8 por IL-1 en HUVEC. La actividad de los dAb se analizó evaluando la inducción de IL-8 por el TNF α humano usando células MRC-5 en lugar de la línea celular HUVEC. En pocas palabras, las células MRC-5 se sembraron en placas de microtitulación y las placas se incubaron durante la noche con dAb y TNF α humano (300 pg/ml). Tras la incubación, el sobrenadante del cultivo se aspiró y la concentración de IL-8 en el sobrenadante se midió mediante un ELISA de tipo sándwich (R&D Systems). La actividad de dAb anti-TNFR1 tuvo como resultado una disminución de la secreción de IL-8 en el sobrenadante en comparación con los pocillos control que se incubaron solo con TNF α .

Ejemplo 14. Modelo de shock séptico en ratones

La eficacia *in vivo* de un dAb anti-TNFR1 se evaluó en un modelo experimental bien establecido para el síndrome del shock séptico (Rothe *et al.*, *Circulatory Shock* 44:51-56, (1995)). La muerte inducida por LPS en este modelo depende de la activación de TNFR-1 (p55). En este modelo, se sensibilizó a los ratones a la toxicidad de LPS usando D-galactosamina (D-GalN). La dosis de LPS letal para los animales silvestres en este estudio era de aproximadamente 10 ng.

LPS (*Salmonella enteritidis*, Sigma, EE.UU.) y D-Galactosamina (D-GalN, Sigma, EE.UU.) se inyectaron por vía intraperitoneal. Los ratones control sensibilizados con D-GalN (10 mg/ratón) murieron en 18 horas después de la exposición a LPS (10 ng). La mortalidad de los ratones no sensibilizados se registró en un periodo de 1 día después de la exposición.

Los ratones recibieron un ligando de doble especificidad que se une a TNFR1 de ratón y a seroalbúmina de ratón (TAR2m-21-23 3U TAR7m-16; TAR7m-16 también se denomina en el presente documento MSA16) o ENBREL® (entarecept; Immunex Corporation) mediante inyecciones intraperitoneales 4 horas antes de la administración de LPS. (Véase la Tabla 12). La supervivencia se monitorizó a intervalos de 4-6 horas en un periodo de 48 horas. La eficacia de los dAb anti-TNFR1 de ratón se demostró mediante la supervivencia.

Tabla 12.

Grupo de tratamiento	Agente y dosis	Dosis de LPS por ratón (ng)	Número de animales	Número de supervivientes a las 24 h
1	Solución salina	10	8	0/8
2	10 mg/kg ENBREL® (entarecept; Immunex Corporation)	10	8	8/8

(continuación)

Grupo de tratamiento	de Agente y dosis	Dosis de LPS por ratón (ng)	Número de animales	de	Número de supervivientes a las 24 h
3	5,4 mg/kg de TAR2m-21-23 3U TAR7m-16		10	8	4/8
4	1 mg/kg de TAR2m-21-23 3U TAR7m-16		10	8	2/8
5	5,4 mg/kg de TAR2m-21-23 3U TAR7m-16		0	2	2/2

TAR2m-21-23 3U TAR7m-16 es un ligando de especificidad doble que contiene un dAb que se une al TNFR1 de ratón que está unido a través de un ligador peptídico a un dAb que se une a la seroalbúmina de ratón. Una secuencia de nucleótidos que codifica TAR2m-21-23 3U TAR7m-16 y la secuencia de aminoácidos del ligando con especificidad doble se presentan más adelante como la SEC ID N° 375 y la SEC ID N° 376, respectivamente.

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGTTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCG
TCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAATAGGTATAGTATGGGGTGGCTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGTCTAGAGTGGGTCTCACGGATTGATTCTTATGGTCGT
GGTACATACTACGAAGACCCCGTGAAGGGCCGGTTCAGCATCTCCGCGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCCGTAT
ATTACTGTGCGAAAATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTGACTACTGGGGTCAG
GGAACCCAGGTCACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGG
CGGTGGCGGGTCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCAT
CTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTATTAAGCAT
TTAAAGTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGC
ATCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG
ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGT
CAACAGGGGGCTCGGTGGCCTCAGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAA
ACGGGCGGCCGCGAGAACAACAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT (SEQ ID
NO: 375)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNRYSMGWLRQAPGKGLEWVSRIDSYGR
GTYIEDPVKGRFSISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKISQFGSNAFDYWGQ
GTQVTVSSGGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSIIKH
LKWYQQKPGKAPKLLIYGASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC

QQGARWPQTFGQGTKVEIKRAAAEQKLISEEDLN (SEQ ID NO: 376)

La presencia de supervivientes en los grupos de tratamiento de TAR2m-21-23 3U TAR7m-16 demuestra que el dAb anti-TNFR1 era eficaz en la inhibición de la actividad del receptor *in vivo*, y los resultados demuestran que el efecto dependía de la dosis. Además, la eficacia del tratamiento con TAR2m-21-23 3U TAR7m-16 se comparó favorablemente con la eficacia de ENBREL® (entarecept; Immunex Corporation). La supervivencia de los animales tratados con TAR2m-21-23 3U TAR7m-16 solo (Grupo 5, sin exposición a LPS) también demuestra que TAR2m-21-23 3U TAR7m-16 no era tóxico y no era agonista del receptor *in vivo* mediante reticulación con el receptor.

Otros estudios confirmaron que los dAb anti-TNFR1 no son agonistas de TNFR1 (actúan como agonistas de TNFR1) en ausencia de TNFα. Las células L929 se cultivaron en medio que contenía un intervalo de concentraciones del monómero TAR2m-21-23, el monómero TAR2m 21-23 reticulado mediante un anticuerpo anti-myc disponible comercialmente (9E10), TAR2m-21-23 3U TAR7m-16 o TAR2m-21-23 40K PEG. En el caso del monómero TAR2m-21-23 reticulado por el anticuerpo anti-myc, el dAb y el anticuerpo se mezclaron en una proporción de 2:1 y se pre-incubaron durante una hora a temperatura ambiente para simular los efectos de la reticulación inmunitaria *in vivo* antes del cultivo. TAR2m-21-23 monomer was incubated with the L929 cells at a concentration of 3000 nM. TAR2m-

21-23 monomer and anti-Myc antibody were incubated at a dAb concentration of 3000 nM. TAR2m-21-23 3U TAR7m-16 was incubated with the cells at 25 nM, 83.3 nM, 250 nM, 833 nM and 2500 nM concentrations. TAR2m-21-23 40K PEG was incubated with the cells at 158.25 nM, 527.5 nM, 1582.5 nM, 5275 nM and 15825 nM concentrations. After incubation overnight, cell viability was assessed as described for the L929 cell cytotoxicity assay. The results revealed that incubation with various amounts of dAb did not result in an increase in the number of non-viable cells in the cultures. The incubation of L929 cells with 10 nM, 1 nM and 0.1 nM of a commercially-available anti-TNFR1 IgG antibody resulted in a dose-dependent increase in non-viable cells thereby demonstrating the sensitivity of these cells to TNFR1-mediated agonism. (Figure 26).

Ejemplo 15. Modelos de enfermedades inflamatorias crónicas

A. Modelo de artritis inducida por colágeno en ratones

Se inyectó en ratones DBA / 1 una vez una emulsión de adyuvante Arthrogen-CIA y colágeno Arthrogen-CIA (MD-Biosciences). El día 21, se retiró del estudio a los animales con puntuaciones artríticas altas y el resto de los animales se dividieron en grupos de 10 con un número igual de animales machos y hembras. El día 21 comenzaron los tratamientos con inyecciones intraperitoneales de o bien solución salina, ENBREL® (entarecept; Immunex Corporation) o TAR2m-21-23 40K PEG y continuaron durante 28 días. Se midieron las puntuaciones artríticas clínicas en una escala de 0 a 4 para cada una de las 4 extremidades de los animales, se le asignó una puntuación de 0 para una extremidad normal y una puntuación de 4 se asignó para una extremidad con inflamación máxima y afectación de múltiples articulaciones.

Una reducción de la suma de las puntuaciones artríticas de los cuatro miembros con respecto a la máxima de 16 a (a) 14-15, (b) 12-15, (c) 10-15, (d) 9-15, (e) 7-15, (f) 5-15, (g), 3-15, o (h) 1-15 es un efecto beneficioso en este modelo. Un efecto beneficioso puede resultar es una suma de las puntuaciones artríticas de los cuatro miembros de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. Un retraso en la aparición de la artritis, en comparación con el grupo control no tratado, es también un efecto beneficioso en este modelo.

Las puntuaciones clínicas claramente han demostrado que el tratamiento con TAR2m-21-23 40K PEG tenía un impacto muy favorable de inhibición del desarrollo de la artritis en comparación con el control de solución salina, y por otra parte, el impacto del tratamiento con TAR2m-21-23 40k PEG se comparó favorablemente con ENBREL® (entarecept; Immunex Corporation). Esta es la primera demostración de la inhibición del TNFR1 eficaz en el tratamiento de un modelo de enfermedad inflamatoria crónica.

B. Modelo Δ ARE de EII y artritis en ratón

Los ratones que llevan una delección dirigida en los elementos 3' ricos en AU (ARE) del ARNm de TNF (que se denominan ratones $TNF^{\Delta ARE}$) sobreproducen TNF y desarrollan una enfermedad intestinal inflamatoria que es histopatológicamente similar a la enfermedad de Crohn (Kontoyiannis et al., J. Exp. Med. 196:1563-74 (2002)). En estos ratones, la enfermedad de tipo Crohn se desarrolla entre 4 y 8 semanas de edad, y los animales también desarrollan signos clínicos de artritis reumatoide.

En los dAb que se unen al TNFR-1 de ratón se evaluó la eficacia en la inhibición de la patología de tipo Crohn y la artritis en ratones $Tnf^{\Delta ARE}$. ENBREL® (entarecept; Immunex Corporation) se utilizó como control positivo. Los agentes se administraron mediante inyecciones intraperitoneales de acuerdo con la administración y régimen de dosificación presentado en la Tabla 13.

Los dAb estudiados incluyen:

1) TAR2m-21-23 PEGilado con un resto de PEG de 40 kD;

2) TAR2m-21-23 3U TAR7m-16 de doble especificidad que se une al TNFR-1 de ratón y seralbúmina de ratón.

Tabla 13.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Número de dosis	Número de animales
6	ENBREL® (entarecept; Immunex Corporation) (administrada 3 veces / semana)	10 mg / kg	8	10
5	TAR2m21-23 40 kD PEG (administrada dos veces / semana)	1 mg / kg	8	10

(continuación)

Tratamiento	Dosis	Número de dosis	Número de animales	Tratamiento
4	TAR2m21-23 40 kD PEG (administrada dos veces / semana)	10 mg / kg	8	10
3	TAR2m-21-23 3U TAR7m-16 (administrada dos veces / semana)	1 mg / kg	8	10
2	TAR2m-21-23 3U TAR7m-16 (administrada dos veces / semana)	10 mg / kg	8	10
1	Solución salina	NA	8	10

A la conclusión del periodo de dosificación, se sacrificó a los ratones se extirparon y los íleon terminales y los colon proximales para el análisis.

- 5 Para el análisis histológico, las muestras de tejido se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina, y la inflamación aguda y crónica se puntuará usando un sistema semicuantitativo de puntuación. Las puntuaciones se asignarán del siguiente modo: puntuación de la inflamación 0 = 0-1 células polimorfonucleares (PMN) por campo de alta potencia (PMN / HPF); 1 = 2-10 PMN / HPF dentro de la mucosa; 2 = 11-20 PMN / HPF dentro de la mucosa; 3 = 21-30 PMN / HPF en mucosa o 11-20 PMN / HPF con extensión por debajo de la capa muscular de la mucosa; 4 = > 30 PMN / HPF en mucosa o > 20 PMN / HPF con extensión debajo muscular de la mucosa; inflamación crónica y marcó el 0 = 0-10 leucocitos mononucleares (ML) por HPF (ML / HPF) dentro de la mucosa; 1 = 11-20 ml / HPF dentro de la mucosa; 2 = 21-30 ml / HPF en mucosa o 11-20 ML / HPF con extensión debajo muscular de la mucosa; 3 = 31-40 ml / HPF en mucosa o hiperplasia folicular; y 4 = >40 ML / HPF en mucosa o > 30 ML / HPF con extensión debajo muscular de la mucosa o hiperplasia folicular.
- 10
- 15 Los signos macrofenotípicos de la artritis se puntuaron semanalmente de acuerdo con el siguiente sistema: 0 = sin artritis (aspecto y flexión normales); 1 = artritis leve (distorsión de la articulación); 2 = moderado artritis (hinchazón, deformación de las articulaciones); 3 = artritis intensa (movimiento gravemente alterado).

- 20 El dAb de TAR2m-21-23 demostró buena eficacia *in vivo* en el modelo delta ARE de artritis en ratón, como un monómero 40 kD pegilado (TAR2m21-23 40 kD PEG) como un formato anti-TNFR1/anti-SA de doble especificidad (TAR2m-21-23-3U TAR7m 16). La semana 9, las puntuaciones medias artríticas de ambos grupos tratados TAR2m-21-23 y el TAR2m-21-23-3U TAR7m 16 fueron menores de 0,4. Por el contrario, el grupo control con solución salina tenía artritis de moderada a grave, con una puntuación media de artritis que fue > 1,0. El grupo tratado con ENBREL® (entarecept; Immunex Corporation), que se administró 3 veces por semana en comparación con TAR2m-21-23 y la TAR2m-21-23 3U TAR7m-16 que se administraron dos veces por semana, tuvo una puntuación media de 0,5-1,0.
- 25 Estos resultados indican que la terapia con los formatos de dAb que se unen TNFR1 es una terapia antiartritis altamente eficaz, y que los formatos de dAb tanto pegilado decoro de especificidad doble estudiados son fármacos altamente eficaces para la enfermedad inflamatoria crónica. Además, estos resultados demuestran además que los dAb que se unen a TNFR1 solo se enganchan al receptor de una manera antagónica.

C. Modelo DSS de EII de ratón

- 30 Se indujo EII en ratones mediante la administración de sulfato de dextrano sódico (DSS) en el agua de bebida. (Véase, por ejemplo, Okayasu I. et al., Gastroenterology 98:694-702 (1990); Podolsky K., J Gastroenterol. 38 suppl XV :63-66 (2003).) Ratones adultos BDF1 que carecen de *H. pylori* se estabularán durante 2 semanas para estabilizar sus ritmos circadianos. Todos los ratones se mantendrán en jaulas ventiladas individualmente en una unidad de barrera específica sin patógenos (SPF) con un ciclo de luz:oscuridad de 12 horas. Se permitirá a los
- 35 animales comer y beber *ad libitum*.

- El estudio tendrá una duración de 7 días. El agua de bebida contendrá DSS al 5% durante todo el estudio. Todos los animales serán tratados en los días 1 a 7 por la mañana (09:00-10:00) y por la noche (16:00/17:00). (Véase el tabla 2 14.) El día 1 es equivalente a una única dosis profiláctica. Todos los animales se pesarán diariamente y se anotará cualquier incidencia de diarrea. Todos los animales serán sacrificados 24 horas después del último tratamiento y se les administrará un pulso de bromodesoxiuridina 40 minutos antes de su sacrificio. Se extirpará de los animales las partes distales de los intestinos gruesos. Una muestra pequeña de la porción distal del intestino grueso se colocará en el "RNAlater", y el resto se fijará en fijador de Carnoy, se incluirá en parafina, se seccionará (secciones no en serie por portaobjetos) y se tefirá con hematoxilina y eosina. Las secciones se evaluarán visualmente para
- 40

determinar la gravedad de la EII y se les asignará una puntuación de gravedad. El análisis histométricos se llevará a cabo y se determinará la media del área de la lesión (área de la úlcera), la media del área epitelial, y la media del área inflamatoria intramural.

5 Se usarán secciones transversales teñidas con H y E del intestino grueso para registrar una serie de dimensiones de tejido utilizando un microscopio Zeiss Axiohome, que permite la cuantificación exacta de las zonas. Para cada sección transversal, se midió el área de epitelio más lámina propia y el área de tejido conectivo. A continuación, se mide el área epitelial por separado, con la diferencia de la zona de la lámina propia. En el tejido normal de la contribución relativa de este tejido a la superficie es de 10%, pero aumenta a medida que aumenta la inflamación. La proporción relativa de epitelio: lámina propia, por lo tanto cambia.

10 Con el aumento de la gravedad de la profundidad de esta área se estrecha (lo que contribuye a la ulceración) y la longitud del colon se acorta. En conjunto, estos fenómenos hacen que el área de sección transversal del lumen aumente. Este parámetro puede ser, por tanto, también una medida útil de la gravedad de la enfermedad.

15 Las muestras de tejido se observarán microscópicamente y se les asignará una puntuación de gravedad, donde 0 = sin inflamación; 1 = leve inflamación alrededor de la base de la cripta; 2 = infiltración inflamatoria masiva y alteración de la arquitectura de la mucosa; 3 = la infiltración inflamatoria masiva y la arquitectura de la mucosa alterada más ulceración.

20 La eficacia se indica en este modelo cuando el tratamiento produce una reducción de la puntuación de la gravedad, con respecto a la puntuación de la gravedad del grupo control de solución salina. Por ejemplo, la puntuación de gravedad del grupo de tratamiento se puede reducir en 0,1 hasta aproximadamente 1, de 1 a aproximadamente 2, o de 2 a aproximadamente 3. La eficacia se indicaría por una puntuación de alrededor de 2 o menos, 1 a aproximadamente 2, o 1 o menos.

9 grupos de 6 animales se tratarán de la siguiente manera:

Tabla 14.

Grupo	
1	DSS en el agua de bebida
2	DSS en el agua de bebida + ip PEG TAR2m-21-23, 10 mg / kg 1x / d
3	DSS en el agua de bebida + ip PEG TAR2m-21-23, 1 mg / kg 1x / d
4	DSS en el de bebida + ip solución salina
5	DSS en el agua de bebida + sonda oral PEG TAR2m-21-23, 0,25 mg / animal 2x / d
6	DSS en el de bebida + solución salina con sonda oral
7	DSS en el agua de bebida + ip dosificación + ve control, por ejemplo esteroides
8	DSS en el de bebida + sonda oral + ve control por ejemplo, ácido 5 -aminosalicílico o similar
9	Animales sin tratar
Las sondas orales se administrarán con ZANTAC ® (clorhidrato de ranitidina, GlaxoSmithKline).	

D. Modelo en ratón de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

25 Se evaluará la eficacia de los dAb anti-TNFR1 en la progresión de la enfermedad en un modelo subcrónico con humo de tabaco (TS) en ratones (Véase, por ejemplo, Wright JL y Churg A., Chest 122: 3065-3095 (2002). Se administran dAb anti-TNFR1 de ratón mediante inyecciones intraperitoneales cada 48 horas (a partir de 24 horas antes de la primera exposición al TS) y serán administraán en el formato de la semivida en suero prolongada (*por ejemplo*, ligando PEGilado, de doble especificidad comprende dAb anti-SA).

30 Alternativamente, el dAb anti-TNFR1 se administrará por vía intranasal cada 24 horas (a partir de 4 horas antes de la primera exposición al TS) y se administrará en forma de monómero de dAb. ENBREL ® (entarecept; Immunex

Corporation) se utilizará como control positivo. La exposición a TS será diaria y el estudio tendrá una duración de 1 a 2 semanas. (Véase, *por ejemplo*, Vitalis et al., Eur. Respir. J., 11:664-669 (1998).) Tras la última exposición al TS, el lavado broncoalveolar se analizará para realizar los recuentos celulares totales y diferenciales para incluir las subpoblaciones de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y linfocitos T. Los lóbulos pulmonares se fijarán en formalina tamponada al 10% y las secciones de tejido se analizarán para ver el aumento de tamaño de los alveolos y los conductos alveolares, el engrosamiento de las paredes de las vías respiratorias pequeñas y los recuentos celulares para incluir las subpoblaciones de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y linfocitos T. La eficacia será evidente mediante una reducción del número de subpoblaciones de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y linfocitos T que estaban elevadas por la exposición a TS y una reducción en el agrandamiento inducido por TS de los alveolos y los conductos alveolares y el engrosamiento de las paredes de las vías respiratorias pequeñas.

Ejemplo 18. Los dímeros TAR2m21-23 son antagonistas de TNFR1 de alta avidéz

Los dímeros TAR2m21-23 se prepararon mediante la producción de una forma de TAR2m21-23 que contenía un residuo de Cys en el extremo carboxi usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 8. La proteína (TAR2m21-23CYS) se expresó en *Pichia* y se purificó usando Streamline Proteína A. El análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras mostró que ~ 40-50% de la proteína estaba presente en la solución como un dímero. El dímero se purificó adicionalmente mediante cromatografía de filtración en gel.

2 mg de proteína se concentraron hasta aproximadamente 250 μ l y se aplicó a una columna de filtración en gel Superdex 75 HR (Amersham Bioscience) que previamente se había equilibrado con PBS. La columna se hizo funcionar a una velocidad de flujo de 0,5 ml / min y se recogieron fracciones de 0,5 ml. La elución de la proteína de la columna se monitorizó a 280 nm y las fracciones que contenían el dímero se identificaron mediante SDS-PAGE no reductora. Las fracciones que contenían dímeros pero no las formas monoméricas TAR2m-21-23CYS se combinaron. Las fracciones combinadas se concentraron y la potencia del dAb dimérico se determinaron en el ensayo de citotoxicidad de las células L929 de TNF (Ejemplo 6).

La potencia biológica del dímero TAR2m21-23 se comparó con la forma monomérica TAR2m-21-23 en el ensayo de citotoxicidad de L929. En este ensayo, se evaluó la inhibición de la citotoxicidad inducida por TNF de las células L929 de ratón por el monómero TAR2m21-23 y el dímero TAR2m21-23, y los resultados se expresaron como la concentración de monómero dAb o el dímero que inhibía la citotoxicidad en un 50% en el ensayo (dosis de neutralización al 50, DN50).

El dAb monomérico tenía una DN50 de aproximadamente 600 pM en el ensayo. La DN50 de del dAb dimérico (dímero TAR2m21-23) era aproximadamente 10 veces inferior (DN50 alrededor de 60-70 pM) en el ensayo. Estos resultados muestran que Dímero TAR2m21-23 tenía una afinidad significativamente mejorada para la superficie celular de TNFR1 en comparación con el monómero dAb. Los resultados indican que el dímero TAR2m21-23 se une a dos moléculas separadas de TNFR1 en la superficie celular al mismo tiempo, y el efecto de avidéz resultante sobre la multimerización tiene como resultado una mejora de la inhibición del TNFR1.

A continuación, el formato dimérico (dímero TAR2m21-23) se analizó para ver si aparecía algún signo de agonismo del TNFR1, es decir, la capacidad de causar la reticulación del TNFR1 e iniciar señalización intracelular y la muerte celular. Esto se logró usando un ensayo de citotoxicidad de células L929 modificado en la que no se añadió TNF- α , pero los anticuerpos anti-TNFR1 o los formatos de dAb se analizaron para ver si eran agonistas del TNFR1 e inducían la muerte celular. El anticuerpo anti-TNFR1 AF-425-PB (R & D Systems), que es un agonista conocido del TNFR1, y el anticuerpo anti-TNFR1 MAB430 (R & D Systems), un antagonista notificado de TNFR1, TAR2m-21-23 y el dímero TAR2m21-23 se analizaron en el ensayo.

El anticuerpo AF-425-PB activó el TNFR1 e indujo citotoxicidad en el ensayo con una DN50 de aproximadamente 100 pM. Incluso el anticuerpo antagonista MAB430 produjo reticulación del receptor y la muerte celular en el ensayo con una DN50 de aproximadamente 10 nM. En contraste, el dímero TAR2m-21-23 no causó ninguna muerte celular en el ensayo, incluso cuando está presente a concentraciones muy altas (> 1 μ M). Estos resultados muestran que el dímero TAR2m21-23 no es agonista del TNFR1.

Los resultados indican que los dímeros, trímeros u otros multímeros de dAb que se unen TNFR1 tienen alta avidéz por TNFR1 expresado en la superficie de las células y son antagonistas eficaces del TNFR1. Por otra parte, los resultados de este estudio muestran que los multímeros de los dAb que se unen al dominio 1 del TNFR1, tales como el dímero TAR2m21-23 , pueden unirse a dos moléculas de TNFR1 (al igual que los anticuerpos que actuaban como agonistas en el ensayo) y que la unión del dominio u epítipo diana en el TNFR1 (dominio 1) impidió la estrecha asociación estrecha de las cadenas del receptor que se requiere para la iniciación de la señalización del TNFR1. Esta propiedad es única para una molécula bivalente en que es capaz de reticular el TNFR1 en la superficie celular y, sin embargo, no causar señalización del TNFR1 y la muerte celular.

Ejemplo 20. Aislamiento de los dAb que se unen al TNFR1 humano y al TNFR1 de ratón

Los dAb de secuencia conocida se expresaron en *E. coli* y se purificaron con la resina de Proteína A Streamline. Después de la elución en Tris-Glicina, los dAb se hicieron fluir sobre un chip de SPR en el que se había inmovilizado

TNFR1 humano biotinilado (celda de flujo 2) y TNFR1 murino biotinilado (celda de flujo 4). (El chip de SPR se revistió con TNFR1 humano y TNFR1 murino a densidades similares.). Las células de flujo 1 y 3 se dejaron en blanco y actuaron como superficies de referencia no antigénicas para la detección y la sustracción de la unión no específica.

- 5 Los dAb se hicieron fluir sobre las celdas de flujo 4 en serie (es decir, la celda de flujo 1, a continuación, 2, 3 y finalmente 4) con las diferencias de respuesta entre las células de flujo 2 y 1 medidas y también se midieron las diferencias de respuesta entre las células de flujo 4 y 3. La primera es una medida de la unión al TNFR1 humano y la posterior unión al TNFR1 murino. Se observaron las curvas de unión específica para determinar la unión tanto al TNFR1 humano como al TNFR1 murino, la naturaleza de las curvas siendo tal que se observó una tasa de inicio más rápida para el TNFR1 humano que para el TNFR1 murino. Las tasas off fueron muy similares. Una evaluación de la reactividad cruzada viene dada por el número de unidades de respuesta (UR) logradas como máximo mediante cada acontecimiento de unión. En este ejemplom la superficie de TNFR1 humano biotinilado comprendió aproximadamente 900 UR de TNFR1 en la celda de flujo 2, mientras que la celda de flujo 4 comprendía aproximadamente 1400 UR de TNFR1 murino. Como control, TAR2h-154-7, un dAb específico humano a una concentración de 2 micromolar se unió a la superficie humana con una respuesta máxima de 385 UR, dando una respuesta en la superficie del ratón de sólo 4,5 UR. La concentración 2 micromolar de TAR2h-205 dio una respuesta en la superficie humana de 435 UR y una respuesta en la superficie del ratón de 266 UR.
- 10
- 15

Anexo 1; Polipéptidos que potencian la semivida *in vivo*.

Alfa-1 glucoproteína (orosomucoide) (AAG)

Alfa-1 Antiquimotripsina (ACT)

- 20 Alfa-1-antitripsina (AAT)

Alfa-1 microglobulina (proteína HC) (AIM)

Alfa-2 macroglobulina (A2M)

Antitrombina III (AT III)

Apolipoproteína A-1 (Apo A-1)

- 25 Apolipoproteína B (Apo B)

Beta-2-microglobulina (B2M)

Ceruloplasmina (Cp)

Complemento de componentes (C3)

Complemento de componentes (C4)

- 30 Inhibidor de la C1 esterasa (C1 INH)

Proteína C reactiva (CRP)

Cistatina C (Cys C)

Ferritina (FER)

Fibrinógeno (FIB)

- 35 Fibronectina (FN)

Haptoglobina (Hp)

Hemopexina (HPX)

Inmunoglobulina A (IgA)

Inmunoglobulina D (IgD)

Inmunoglobulina E (IgE)

Inmunoglobulina G (IgG)

5 Inmunoglobulina M (IgM)

Cadenas Ligeras de Inmunoglobulina (κ / λ)

Lipoproteína (a) [Lp (a)]

Proteína de unión a manosa (MBP)

Mioglobina (Myo)

10 Plasminógeno (PSM)

Prealbúmina (Transtiretina) (PAL)

Proteína de unión a retinol (RBP)

Factor reumatoide (RF)

Amiloide sérico A (SAA)

15 Receptor de la transferrina soluble (sTfR)

Transferrina (Tf)

Anexo 2

Resumen de datos

OBJETIVO	dAb	Constante de disociación en el equilibrio ($K_d = K_{off} / K_{on}$)	K_{off}	CI50 para el ensayo de ligando	DN50 para el ensayo de neutralización basado en células
TAR1	Monómeros TAR1	300 nM a 5 pM (es decir, 3×10^{-7} a 5×10^{-12}), 50 nM, preferiblemente a 20 pM	5×10^{-1} a 1×10^{-7}	500 nM a 100 pM	500 nM a 50 pM
	Dímeros TAR1	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1

(continuación)

OBJETIVO	dAb	Constante de disociación en el equilibrio ($K_d = K_{off} / K_{on}$)	K_{off}	CI50 para el ensayo de ligando	DN50 para el ensayo de neutralización basado en células
	Trímeros TAR1	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1
	TAR1-5				
	TAR1-27				
	Monómero TAR1-5-19	30 nM			
	Homodímero TAR1-5-19			Con (Gly ₄ Ser) ₃ ligador = 20nm Con (Gly ₄ Ser) ₅ ligador = 2 nm Con (Gly ₄ Ser) ₇ ligador = 10 nm En el formato Fab = 1 nM	= 30 nM = 3 nM = 15 nM
	Heterodímeros TAR1-5-19			Con (Gly ₄ Ser) _n ligador TAR1-5-19d2 = 2 nM TAR1-5-19d3 = 8 nM	= 12 nM = 10 nM
				TAR1-5-19 d4 = 2-5 nM TAR1-5-19 d5 = 8 nM En el formato Fab TAR1-5-19CH D1ck = 6 nM TAR1-5-19CK D1CH = 6 nM TAR1-5-19CH d2CK = 8 nM TAR1-5-19CH d3CK = 3 nM	= 12 nM
	Heterodímeros TAR1-5			Con (Gly ₄ Ser) _n ligador TAR1-5D1 = 30 nM TAR1-5d2 = 50 nM TAR1-5D3 = 300 nM	

(continuación)

OBJETIVO	dAb	Constante de disociación en el equilibrio ($K_d = K_{off} / K_{on}$)	K_{off}	CI50 para el ensayo de ligando	DN50 para el ensayo de neutralización basado en células
				TAR1-5d4 = 3 nM TAR1-5d5 = 200 nM TAR1-5d6 = 100 nM En el formato Fab TAR1-5CH d2CK = 30 nM TAR1-5CK d3 CH = 100 nM	= 60 nM
	Homotrímero TAR1-5-19			0,3 nM	3-10 nM (por ejemplo, 3 nM)
TAR2	Monómeros TAR2	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1	500 nM a 100 pM	500 nM a 50 pM
	TAR2-10				
	TAR2-5				
Albúmina de Suero	Monómeros Anti-SA	1 nM a 500 μ M, preferentemente 100 nM a 10 μ M En el formato de doble especificidad, la afinidad de destino es de 1 a 100.000 x afinidad de afinidad SA dAb, por ejemplo, 100 pM (objetivo) y 10 μ M afinidad SA.		1 nM a 500 μ M, preferentemente 100 nM a 10 μ M En el formato de doble especificidad, la afinidad de destino es de 1 a 100.000 x afinidad de afinidad SA dAb, por ejemplo, 100 pM (objetivo) y 10 μ M afinidad SA.	
	MSA-16	200 nM			
	MSA-26	70nm			

REVINDICACIONES

1. Un antagonista del factor de necrosis tumoral (TNFR1) que se une al TNFR1 e inhibe la transducción de señal a través de TNFR1; (i) en el que dicho antagonista no inhibe la unión de TNF α to TNFR1; (ii) en el que dicho antagonista es un anticuepro de dominio (dAb); y (iii) en el que dicho dAb comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos de TAR2h-205 (SEC ID N ° 627 en la Figura 271).
2. El antagonista de la reivindicación 1, en el que dicho antagonista inhibe la muerte celular inducida por TNF- α en un ensayo de citotoxicidad L929 estándar de la secreción inducida por TNF α de IL-8 en un ensayo estándar HeLa IL-8.
3. Un ligando que comprende un anticuerpo de dominio (dAb) definido en la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
4. El ligando de la reivindicación 3, en el que dicho ligando comprende dichos dAb de unión a TNFR1 y un resto de prolongación de la semivida.
5. El ligando de la reivindicación 4, en el que el resto de prolongación de la semivida es un resto polietilenglicol, seroalbúmina o un fragmento de la misma, receptor de transferrina o una porción del mismo de unión a transferrina, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un siito de unión para un polipéptido que potencia la semivida *in vivo*.
6. El ligando de la reivindicación 5, en el que resto de prolongación de la semivida es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un siito de unión para seroalbúmina o receptor Fc neonatal.
7. Un ácido nucleico aislado que codifica un dAb o ligando como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Un vector que comprende un ácido nucleico recombinante que codifica un dAb o ligando como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Una célula huésped que comprende un vector de la reivindicación 8 o un ácido nucleico de la reivindicación 7.
10. Un procedimiento de producción de un polipéptido que comprende mantener una célula huésped de la reivindicación 9 en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico recombinante o vector, por medio de lo cual se produce un polipéptido.
11. Una composición farmacéutica, que comprende un dAb de la reivindicación 1 o 2, o ligando de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Uso de un ligando de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para la fabricación de un medicamento para tratar, suprimir o prevenir la enfermedad crónica inflamatoria, un trastorno autoinmune, enfermedad inflamatoria, la artritis, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía o shock séptico.

[illegible]

FIG. 2

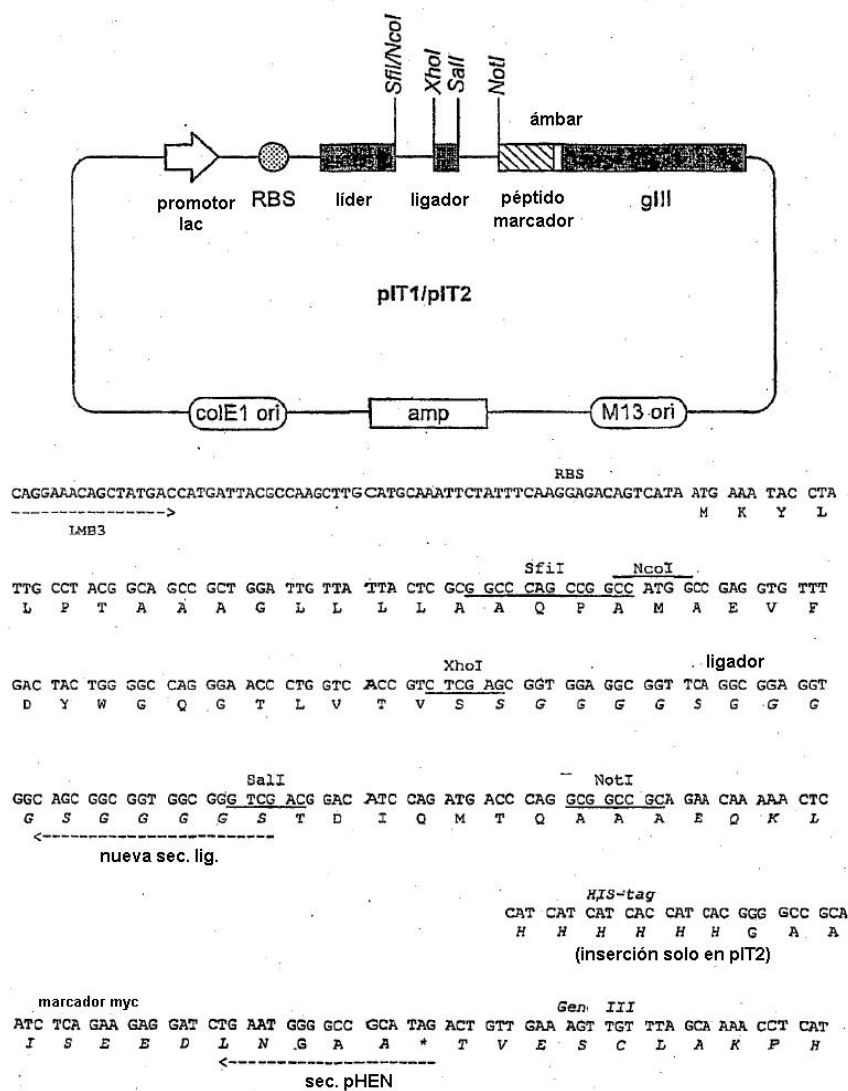


FIG. 3

cadenas VH

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
123456789012345678901234567890	12345	67890123456789	012a3456789012345	67890123456789012abc345678901234	567801	234567890123				

VH simulada

K8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTES	SYAMS	WVROAPGRGLEHWS	AISGSGGSTYYADSVKVG	RFTISRDNKNTLYLQNWISLR	AEDEVYCAK	SYGAFDY	HGQGLTVTVSS
VH2	-----	-----	-----	H-SFY-AN-R	-----	-----	GLRA	-----
VH4	-----	-----	-----	D-GAT-SK-G	-P	-----	KVLF	-----
VHCl1	-----	-----	-----	R-NCP-A-G	-----	I	HGAP	-----
VHAl0sd	-----	N	-----	S-PAS-LH-R	-----	-----	FGLG	-----
VHAl1sd	-----	-----	-----	D-ERT-Y-R	-----	-----	KVLV	-----
VHAl5sd	-----	-----	-----	E-SAN-SK-Q	-----	L	KVLQ	-----
VHC5sd	-----	-----	-----	T-PAN-V-R	-----	-----	SLLQ	-----
VHC11sd	-----	-----	-----	D-ANT-SA-S	-----	-----	KILK	-----
	-----	S	-----	T-SSV-QS-R	-----	-----	NLNS	-----

cadenas V_k

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	0123456	78901234567890123456789012345678	901234567	89012345678			

V_k simulada

K8	DIQNTQSPSSLSASVGDRTITC	RASQSISSYLN	WYQKPKAPKLLIY	AASLSQS	GVPSAFSSGSGTDFTLTIS	SLOPEDEATYYC	QQSYSTPNT	FGQGTKEIKR
E5sd	-----	-----	-----	R-H	-----	-----	--PMRS-G	-----
C3	-----	V	-----	L-R	-----	-----	--NHVL-P	-----
	-----	-----	-----	I	-----	-----	--RUYD-L	-----

FIG. 4

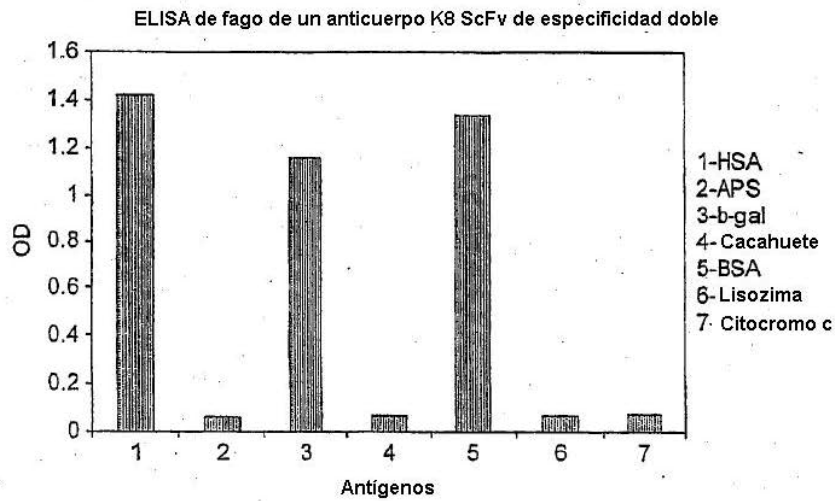


FIG. 5

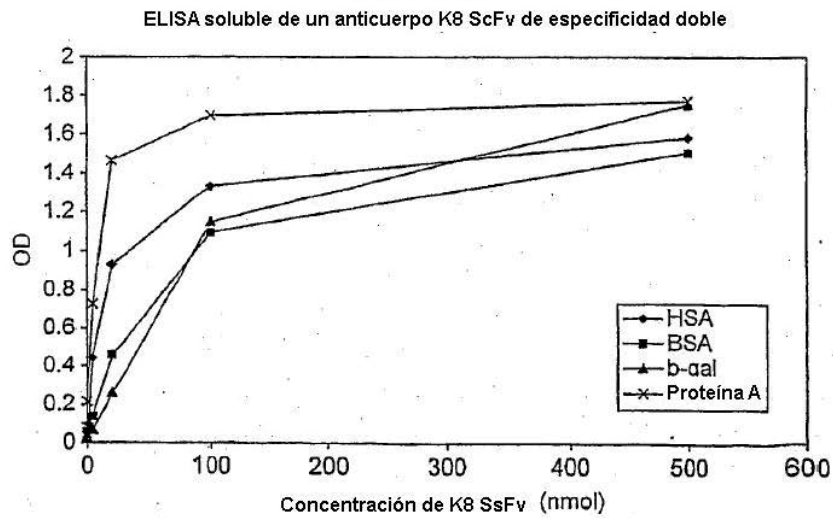


FIG. 6

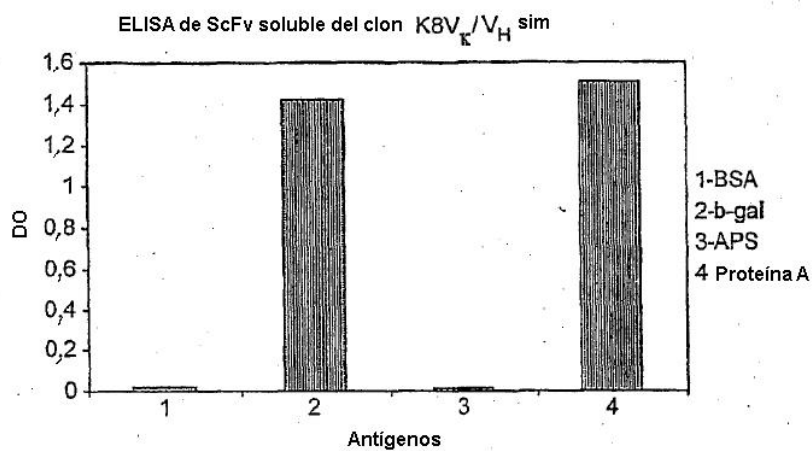


FIG. 7

RBS
 CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGCTTGCATGCAAAATTCTATTTCAGGAGACAGTCATA ATG AAA TAC CTA
 -----> M K Y L
 LMB3

SfiI NcoI
 TTG CCT ACG GCA GCC GGT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG TTT
 L P T A A A Q L L L L A A Q P A M A E V F

XhoI linker
 GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT
 D Y W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G

Sali NotI
 GGC AGC GGC GGT GGC GGS TCG ACG GAC ATC CAG ATG ACC CAG GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC
 G S G G G S T D I Q M T Q A A A E Q K L
 <----->
 nueva sec. lig

HIS-tag
 CAT CAT CAT CAC CAT CAC GGG GCC GCA
 H H H H H H G A A
 (inserción solo en el vector 2 del dominio V)

marcador myc Gen: III
 ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA TAG ACT GTT GAA AGT TGT TTA GCA AAA CCT CAT
 I S E E D L N G A A * T V E S C L A K P H
 <----->
 sec PHEN

FIG. 8

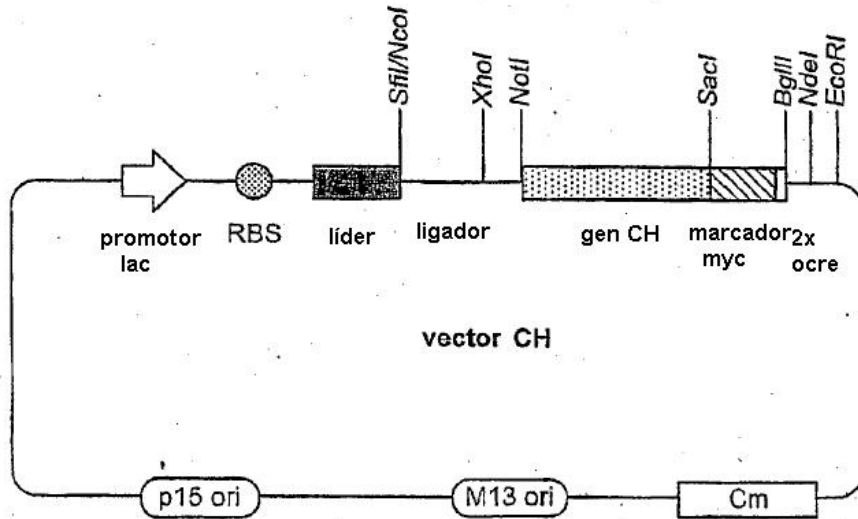


FIG. 9

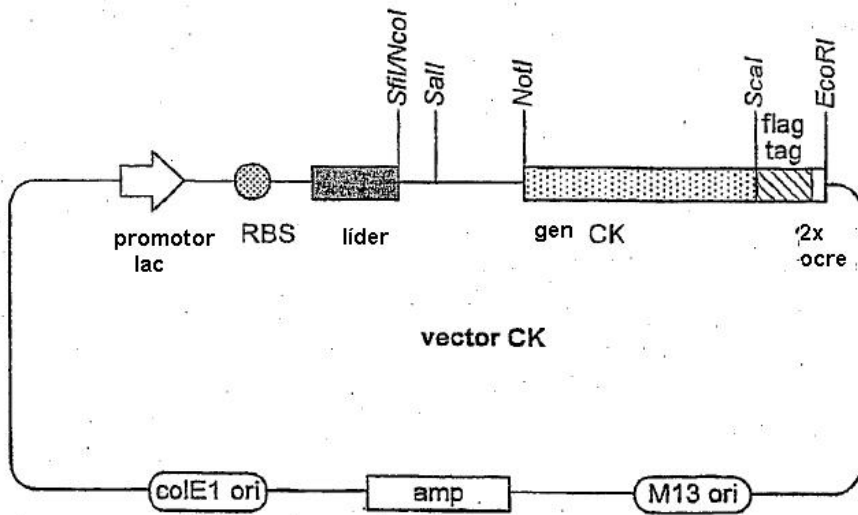


FIG. 10

Ensayo del receptor de TNF

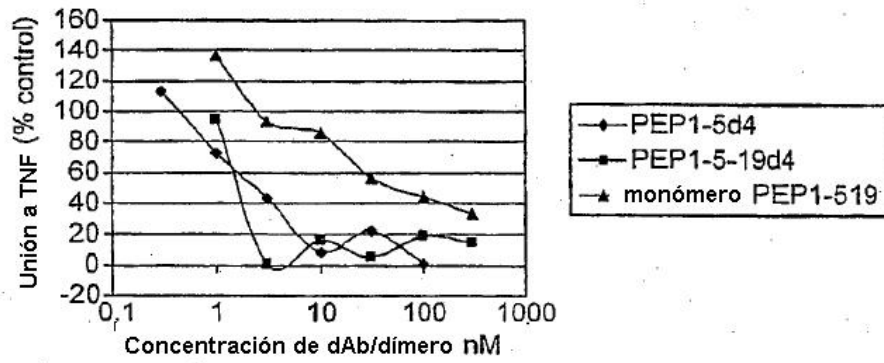


FIG. 11

Ensayo del receptor de TNF

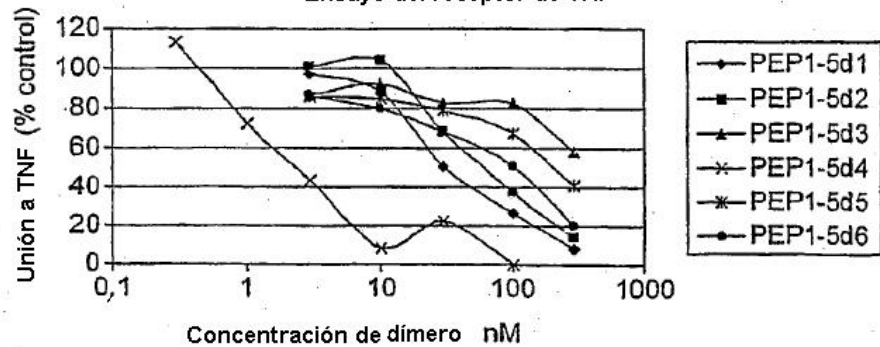


FIG. 12

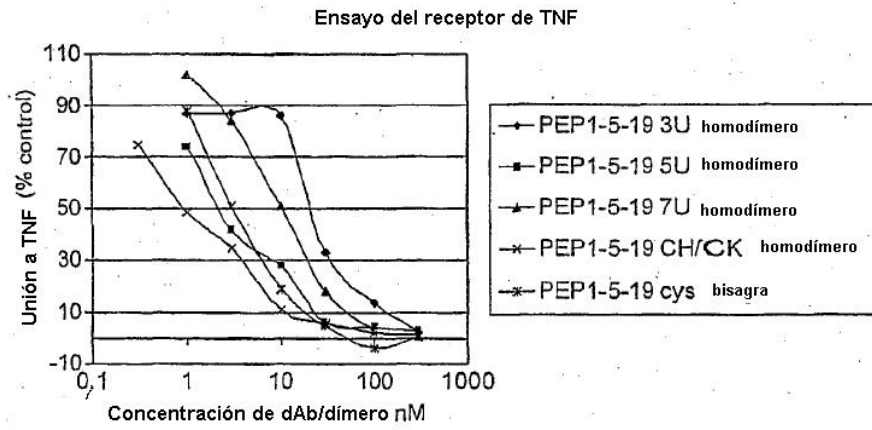


FIG. 13

Secuencia VH simulada para la biblioteca 1

```

1   E V Q L L E S G G G L V Q P G G
    GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG
    CTC CAC GTC GAC AAC CTC AGA CCC CCT CCG AAC CAT GTC GGA CCC CCC

49  S L R L S C A A S G F T F S S Y
    TCC CTG CGT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
    AGG GAC GCA GAG AGG ACA CGT CGG AGG CCT AAG TGG AAA TCG TCG ATA

97  A M S W V R Q A P G K G L E W V
    GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGT CTA GAG TGG GTC
    CGG TAC TCG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCA GAT CTC ACC CAG

145 S A I S G S G G S T Y Y A D S V
    TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG
    AGT CGA TAA TCA CCA TCA CCA CCA TCG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC

193 K G R F T I S R D N S K N T L Y
    AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC CGT GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
    TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG GCA CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC ATA

241 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
    CTG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCC GAG GAC ACC GCG GTA TAT TAC TGT
    GAC GTT TAC TTG TCG GAC GCA CGG CTC CTG TGG CGC CAT ATA ATG ACA

289 A K S Y G A F D Y W G Q G T L V
    GCG AAA AGT TAT GGT GCT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC
    CGC TTT TCA ATA CCA CGA AAA CTG ATG ACC CCG GTC CCT TGG GAC CAG

337 T V S S
    ACC GTC TCG AGC
    TGG CAG AGC TCG

```

FIG. 14

Secuencia VH simulada para la biblioteca 2

```

1   E   V   Q   L   L   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G
    GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG
    CTC CAC GTC GAC AAC CTC AGA CCC CCT CCG AAC CAT GTC GGA CCC CCC

49  S   L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y
    TCC CTG CGT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
    AGG GAC GCA GAG AGG ACA CGT CGG AGG CCT AAG TGG AAA TCG TCG ATA

97  A   M   S   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V
    GGC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGT CTA GAG TGG GTC
    CGG TAC TCG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCA GAT CTC ACC CAG

145 S   A   I   S   G   S   G   G   S   T   Y   Y   A   D   S   V
    TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG
    AGT CGA TAA TCA CCA TCA CCA CCA TCG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC

193 K   G   R   F   T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y
    AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC CGT GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
    TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG GCA CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC ATA

241 L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C
    CTG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCC GAG GAC ACC GCG GTA TAT TAC TGT
    GAC GTT TAC TTG TCG GAC GCA CGG CTC CTG TGG CGC CAT ATA ATG ACA

289 A   K   S   Y   G   A   X   X   X   X   F   D   Y   W   G   Q
    GCG AAA AGT TAT GGT GCT NNK NNK NNK NNK TTT GAC TAC TGG GGC CAG
    CGC TTT TCA ATA CCA CGA NNK NNK NNK NNK AAA CTG ATG ACC CCG GTC

337 G   T   L   V   T   V   S   S
    GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC
    CCT TGG GAC CAG TGG CAG AGC TCG

```

FIG. 15

Secuencia V_K simulada para la biblioteca 3

1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G
	GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	GCA	TCT	GTA	GGA
	CTG	TAG	GTC	TAC	TGG	GTC	AGA	GGT	AGG	AGG	GAC	AGA	CGT	AGA	CAT	CCT
49	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y
	GAC	CGT	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	CGG	GCA	AGT	CAG	AGC	ATT	<u>AGC</u>	<u>AGC</u>	<u>TAT</u>
	CTG	GCA	CAG	TGG	TAG	TGA	ACG	GCC	CGT	TCA	GTC	TCG	TAA	<u>TCG</u>	<u>TCG</u>	<u>ATA</u>
97	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I
	TTA	<u>AAT</u>	TGG	TAC	CAG	CAG	AAA	CCA	GGG	AAA	GCC	CCT	AAG	CTC	CTG	ATC
	AAT	<u>TTA</u>	ACC	ATG	GTC	GTC	TTT	GGT	CCC	TTT	CGG	GGA	TTC	GAG	GAC	TAG
145	Y	<u>A</u>	A	S	<u>S</u>	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G
	TAT	<u>GCT</u>	GCA	TCC	<u>AGT</u>	TTG	CAA	AGT	GGG	GTC	CCA	TCA	CGT	TTC	AGT	GGC
	ATA	<u>CGA</u>	CGT	AGG	<u>TCA</u>	AAC	GTT	TCA	CCC	CAG	GGT	AGT	GCA	AAG	TCA	CCG
193	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
	AGT	GGA	TCT	GGG	ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	AGC	AGT	CTG	CAA	CCT
	TCA	CCT	AGA	CCC	TGT	CTA	AAG	TGA	GAG	TGG	TAG	TCG	TCA	GAC	GTT	GGA
241	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	P	<u>N</u>
	GAA	GAT	TTT	GCT	ACG	TAC	TAC	TGT	CAA	CAG	<u>AGT</u>	<u>TAC</u>	<u>AGT</u>	<u>ACC</u>	CCT	<u>AAT</u>
	CTT	CTA	AAA	CGA	TGC	ATG	ATG	ACA	GTT	GTC	<u>TCA</u>	<u>ATG</u>	<u>TCA</u>	<u>TGG</u>	GGA	<u>TTA</u>
289	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R				
	ACG	TTC	GGC	CAA	GGG	ACC	AAG	GTG	GAA	ATC	AAA	CGG				
	TGC	AAG	CCG	GTT	CCC	TGG	TTC	CAC	CTT	TAG	TTT	GCC				

FIG. 16

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de dAb anti MSA MSA 16 y MSA 26

A: MSA 16

```

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
D I Q M T Q S P S S L S A S
GTA GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC
V G D R V T I T C R A S Q S
ATT ATT AAG CAT TTA AAG TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA
I I K H L K W ... Y Q Q K P G K
GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT GGT GCA TCC CGG TTG CAA AGT
A P K L L I Y G A S R L Q S
GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
G V P S R F S G S G S G T D
TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT
F T L T I S S L Q P E D F A
ACG TAC TAC TGT CAA CAG GGG GCT CGG TGG CCT CAG ACG TTC
T Y Y C Q Q G A R W P Q T F
GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
G Q G T K V E I K R

```

B: MSA 26

```

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
D I Q M T Q S P S S L S A S
GTA GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC
V G D R V T I T C R A S Q S
ATT TAT TAT CAT TTA AAG TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA
I Y Y H L K W Y Q Q K P G K
GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAG GCA TCC ACG TTG CAA AGT
A P K L L I Y K A S T L Q S
GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
G V P S R F S G S G S G T D
TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT
F T L T I S S L Q P E D F A
ACG TAC TAC TGT CAA CAG GTT CGG AAG GTG CCT CGG ACG TTC
T Y Y C Q Q V R K V P R T F

```

FIG. 17

Biacore de inhibición de MSA16

(a)

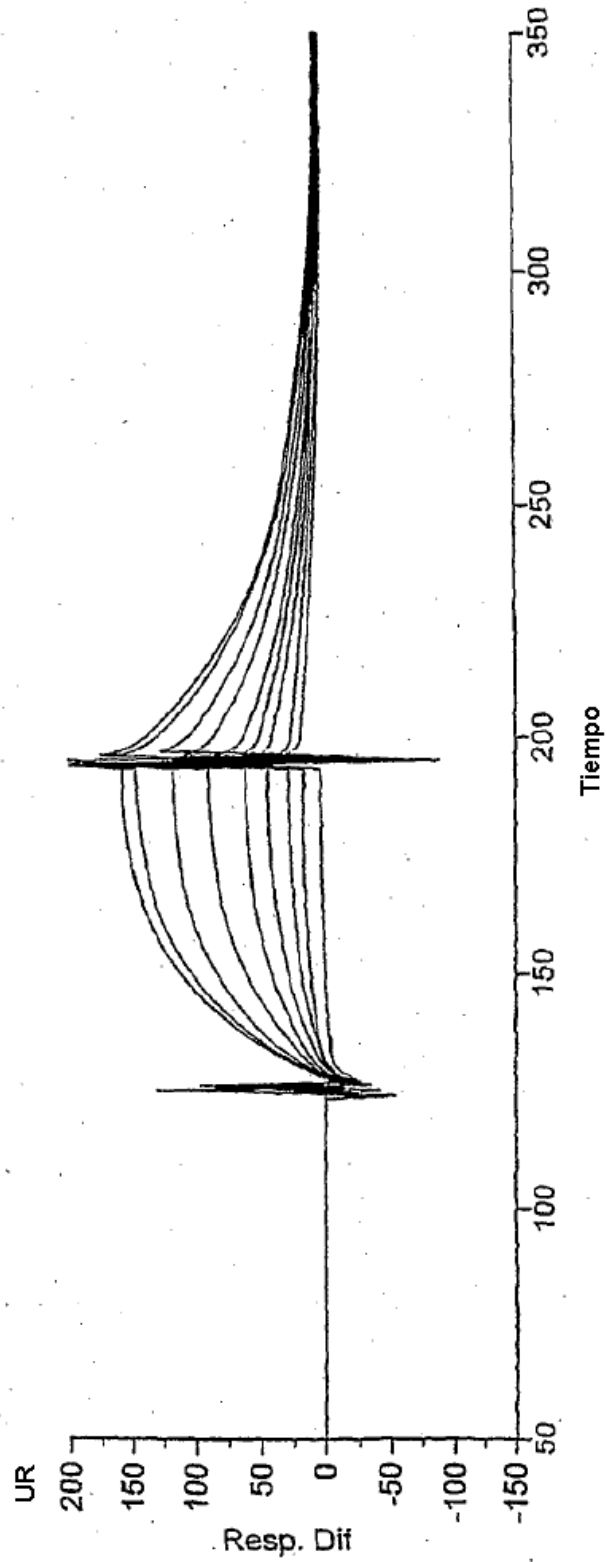
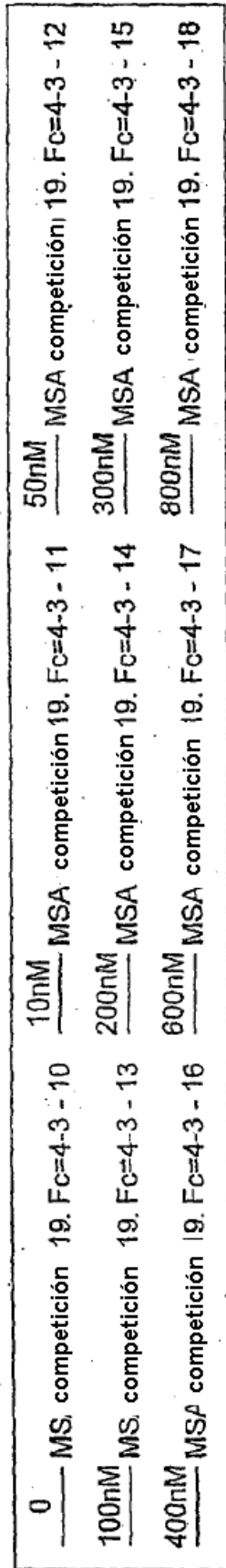


FIG. 17 CONT

Biacore de inhibición de MSA26

(b)

7.1.03 clon	26 inhi Fc=4-3 - 1	7.1.03 clon	26 inhi Fc=4-3 - 2	7.1.03 clon	26 inhi Fc=4-3 - 3
7.1.03 clon	26 inhi Fc=4-3 - 4	7.1.03 clon	26 inhi Fc=4-3 - 5	7.1.03 clon	26 inhi Fc=4-3 - 6
7.1.03 clon	26 inhi Fc=4-3 - 7	7.1.03 clon	26 inhi Fc=4-3 - 8	7.1.03 clon	26 inhi Fc=4-3 - 9
7.1.03 clon	26 inhi Fc=4-3 - 10	7.1.03 clon	26 inhi Fc=4-3 - 11	7.1.03 clon	26 inhi Fc=4-3 - 12

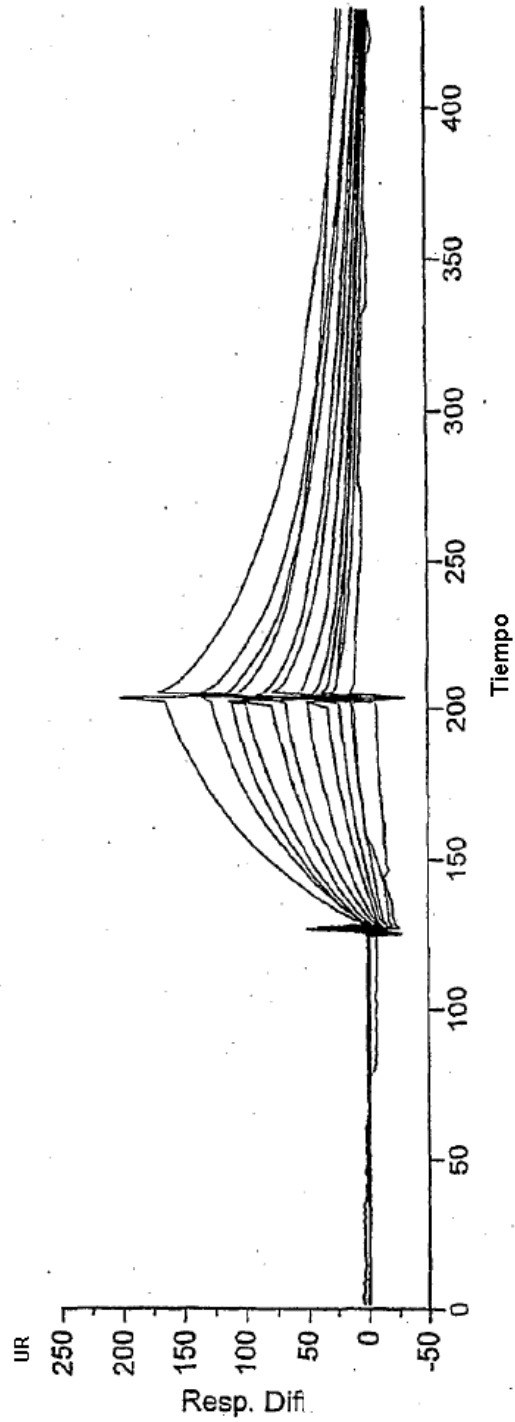


FIG. 18

Niveles séricos de MSA16 tras la inyección

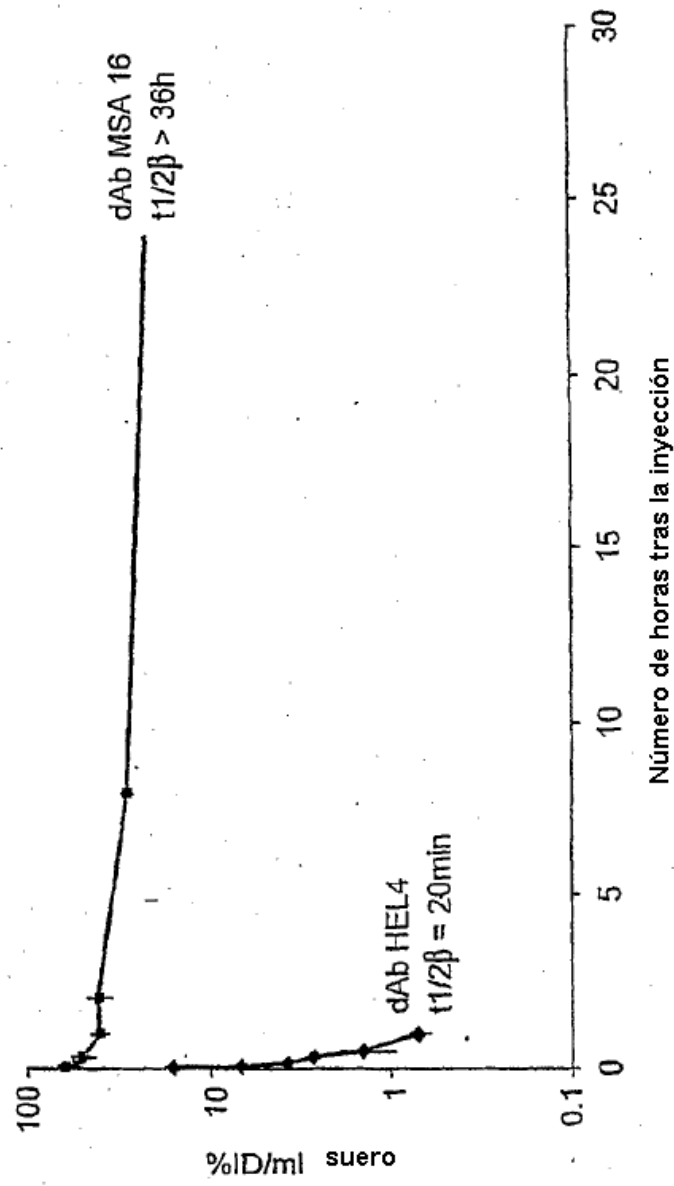


FIG. 19

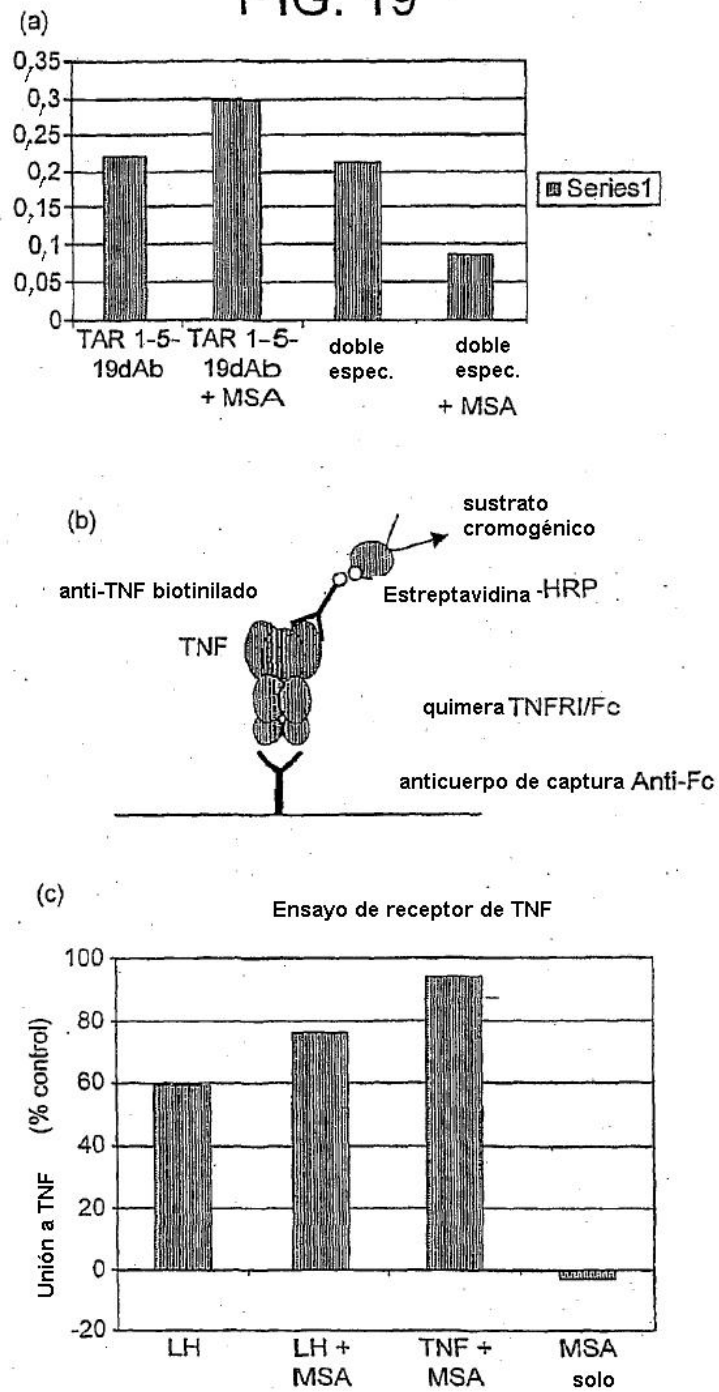
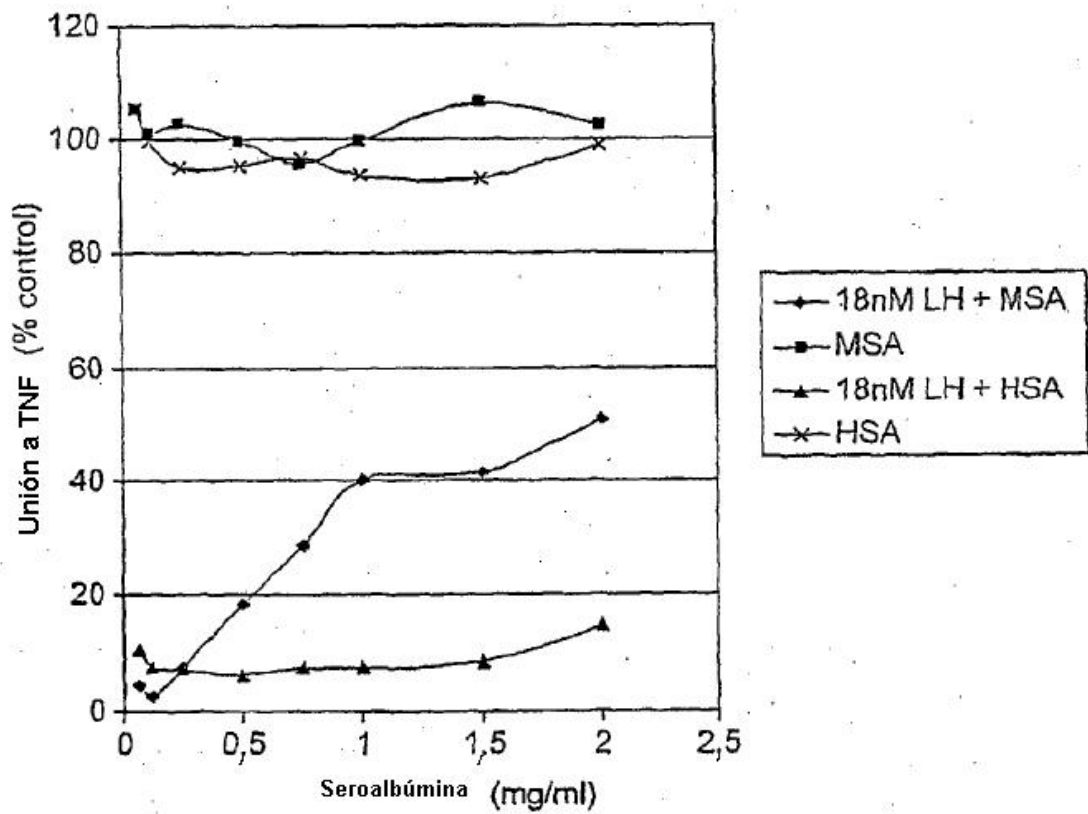


FIG. 20

Ensayo de receptor de TNF



```

>TAR2h-10 (SEQ ID NO:31)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGGSGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAK---VKLGSGPNFDY---WGQGTLLVTVSS

>TAR2h-12 (SEQ ID NO:32)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFV-AYNMG-WVRQAPGKGLEWVS--FIDMYGAKTYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAK---LCIMDCSGDIFDY---WGQGTLLVTVSS

>TAR2h-13 (SEQ ID NO:33)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFP-ADEMY-WVRQAPGKGLEWVS--SIGWPGGATYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAK---YGRNFDY---WGQGTLLVTVSS

>TAR2h-14 (SEQ ID NO:34)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD-QYDMS-WVRQAPGKGLEWVS--LIDPSGGHTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAK---PVFSDWPAVEFDY---WGQGTLLVTVSS

>TAR2h-16 (SEQ ID NO:35)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG-NYDMQ-WVRQAPGKGLEWVS--SIDGTGGTTYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAQ---ETNAFDY---WGQGTLLVTVSS

>TAR2h-17 (SEQ ID NO:36)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG-GYQMG-WVRQAPGKGLEWVS--FIDFTGAHTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAK---LSDDLTLPERFPDY---WGQGTLLVTVSS

>TAR2h-18 (SEQ ID NO:37)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA-DYNMT-WVRQAPGKGLEWVS--WIDQEGVFTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAK---DFSAAVMLRTSFDY---WGQGTLLVTVSS

>TAR2h-19 (SEQ ID NO:38)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFH-DYGMV-WVRQAPGKGLEWVS--QISIDGRTTYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAK---RIFEFDY---WGQGTLLVTVSS

```

FIGURA 21A

```

>TAR2h-20 (SEQ ID NO:39)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS--AYNMS--WVRQAPGKGLEWVS--AISPSGNETYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK---GAGEAFDY---WGQGTLVTVSS

>TAR2h-21 (SEQ ID NO:40)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT-EYNMG--WVRQAPGKGLEWVS--FIGHSGQHTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAE---LNNLMFDY---WGQGTLVTVSS

>TAR2h-22 (SEQ ID NO:41)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG-EYNMA--WVRQAPGKQEWVS--FISTGGHVYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK---FSVRFSSIFDY---WGQGTLVTVSS

>TAR2h-23 (SEQ ID NO:42)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT-EYTMG--WVRQAPGKGLEWVS--WIAVDGIHTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK---LDWTATDFSIFDY---WGQGTLVTVSS

>TAR2h-24 (SEQ ID NO:43)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA-NYTM L--WVRQAPGKGLEWVS--VISAEGRTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK---LNMKATNFKDFDY---WGQGTLVTVSS

>TAR2h-25 (SEQ ID NO:44)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS-EYAML--WVRQAPGKGLEWVS--LIDRTGVITYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK---RDYQYHLYQDFDY---WGQGTLVTVSS

>TAR2h-26 (SEQ ID NO:45)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA-TYSMG--WVRQAPGKGLEWVS--MIDPEGYHTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAE---TNRPLTYKPFWDY---WGQGTLVTVSS

```

FIGURA 21B

```

>TAR2h-27 (SEQ ID NO:46)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT-DYNMA-WVRQAPGKGLEWVS--FISQEGHHTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNLSLRAED
TAVYYCAK---FSTIATISLFDY---WGQGTLVTVSS

>TAR2h-29 (SEQ ID NO:47)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA-TYNMG-WVRQAPGKGLEWVS--SIAWLGSETYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNLSLRAED
TAVYYCAK---HCKAECTGLFDY---WGQGTLVTVSS

>TAR2h-30 (SEQ ID NO:48)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG-IYSMG-WVRQAPGKGLEWVS--SISGVGMETYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNLSLRAED
TAVYYCAK---HSYPTRGRHLFDY---WGQGTLVTVSS

>TAR2h-32 (SEQ ID NO:49)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGTTYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNLSLRAED
TAVYYCAK---VKLG GGNFDY---RGQGTLVTVSS

>TAR2h-33 (SEQ ID NO:50)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFH-RYSMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISSSGGITYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNLSLRAED
TAVYYCAK---STQAQGLELDY---WGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-1 (SEQ ID NO:51)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGTTYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNLSLRAED
TAVYYCAK---VKLG GGNFDY---RGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-2 (SEQ ID NO:52)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGTTYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNLSLRAED
TAVYYCAK---VKLG GGNFDY---RGQGTLVTVSS

```

FIGURA 21C

```

>TAR2h-10-3      (SEQ ID NO:53)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~VKLG GGNFDY~~~WGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-4      (SEQ ID NO:54)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~VKLG GGNFDY~~~WGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-5      (SEQ ID NO:55)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~VKLG GGNFDY~~~RGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-6      (SEQ ID NO:56)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGP EWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~VKLG GGNFDY~~~RGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-7      (SEQ ID NO:57)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~VKLG GGNFDY~~~RGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-8      (SEQ ID NO:58)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~VKLG GGNFDY~~~RGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-9      (SEQ ID NO:59)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~VKLG GGNFDY~~~WGQGTLVTVSS

```

FIGURA 21D

```

>TAR2h-10-10 (SEQ ID NO:60)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK----VKLG GGNFDY~~~RGQGT LVTVSS

>TAR2h-10-11 (SEQ ID NO:61)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK----VKLG GGNFDY~~~RGQGT LVTVSS

>TAR2h-10-12 (SEQ ID NO:62)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK----VKLG GGNFDY~~~WGQGT LVTVSS

>TAR2h-10-13 (SEQ ID NO:63)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGSTYYADSVRG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK----VKLG GGNFDY~~~RGQGT LVTVSS

>TAR2h-10-14 (SEQ ID NO:64)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRXSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGP EWVS--AISGSGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK----VKLG GGNFDY~~~WGQGT LVTVSS

>TAR2h-10-15 (SEQ ID NO:65)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK----VKLG GGNFDY~~~RGRGT LVTVSS

>TAR2h-10-16 (SEQ ID NO:66)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK----VKLG GGNFDY~~~RGQGT LVTVSS

>TAR2h-10-17 (SEQ ID NO:67)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGSTYYADSVRG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK----VKLG GGNFDY~~~RGQGT LVTVSS

```

FIGURA 21E

```

>TAR2h-10-18 (SEQ ID NO:68)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG-WYWMG-WVRQAPGKGLEWAS--AISGSGGNTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK---VKLGGGPNFDY---WGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-19 (SEQ ID NO:69)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGNTYYADSVRG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAKD
TAVYYCAK---VKLGGGPNFDY---RGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-20 (SEQ ID NO:70)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG-WYWMG-WVRQAPGKGLEWAS--AISGSGGNTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAKD
TAVYYCAK---VKLGGGPNFDY---WGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-21 (SEQ ID NO:71)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGNTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAKD
TAVYYCAK---VKLGGGPNFDY---RGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-22 (SEQ ID NO:72)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGNTYYADSVRG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK---VKLGGGPNFDY---RGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-27 (SEQ ID NO:73)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGNTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK---VKLGGGPNFGY---RGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-29 (SEQ ID NO:74)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDPE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGNTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK---VKLGGGPNFGY---RGQGTLVTVSS

>TAR2h-10-31 (SEQ ID NO:75)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGNTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK---VKLGGGPNFGY---RGQGTLVTVSS

```

FIGURA 21F

```

>TAR2h-10-35 (SEQ ID NO:76)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGGGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLHAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTILVTVSS

>TAR2h-10-36 (SEQ ID NO:77)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGGGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTILVTVSS

>TAR2h-10-37 (SEQ ID NO:78)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGGGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTILVTVSS

>TAR2h-10-38 (SEQ ID NO:79)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGGGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAKD
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTILVTVSS

>TAR2h-10-45 (SEQ ID NO:80)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-PYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGGGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTILVTVSS

>TAR2h-10-47 (SEQ ID NO:81)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGGGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTILVTVSS

>TAR2h-10-48 (SEQ ID NO:82)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLPCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGGGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTILVTVSS

>TAR2h-10-57 (SEQ ID NO:83)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGGGGSTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTILVTVSS

```

FIGURA 21G

```

>TAR2h-10-56 (SEQ ID NO:84)
EVQLLESGGGLVQPFGSLRLSCAASGLTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AVSGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGT LVTVSS

>TAR2h-10-58 (SEQ ID NO:85)
EVQLLESGGGLVQPFGSLRLSCAASGLTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGDSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGT LVTVSS

>TAR2h-10-66 (SEQ ID NO:86)
EVQLLESGGGLVQPFGSLRLSCAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AMSGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGN~~~RGLGTLVTVSS

>TAR2h-10-64 (SEQ ID NO:87)
EVQLLESGGGLVQPFGSLRLSCAASGFTFD~WYWMG~WVRQAPGKGLEWAS~~AISGSGGSTYYADSVKD~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGT LVTVSS

>TAR2h-10-65 (SEQ ID NO:88)
EVQLLESGGGLVQPFGSLRLSCAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
GAVYYCAK~~~VKLGGELNFGY~~~RGQGT LVTVSS

>TAR2h-10-68 (SEQ ID NO:89)
EVQLLESGGGLVQPFGSLRLSCAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGN~~~RGQGT LVTVSS

>TAR2h-10-69 (SEQ ID NO:90)
EVQLLESGGGLVQPFGSLRLSCAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGP~~~RGQGT LVTVSS

>TAR2h-10-67 (SEQ ID NO:91)
EVQLLESGGGLVQPFGSLRLSCAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGN~~~RGQGT LVTVSS

```

FIGURA 21H

```

>TAR2h-10-61 (SEQ ID NO:92)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTLLVTVSS

>TAR2h-10-62 (SEQ ID NO:93)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTFYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTLLVTVSS

>TAR2h-10-63 (SEQ ID NO:94)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVT~~AISGSGGSTFYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTLLVTVSS

>TAR2h-10-60 (SEQ ID NO:95)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGDSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTLLVTVSS

>TAR2h-10-55 (SEQ ID NO:96)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGDSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYQ QMN SLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTLLVTVSS

>TAR2h-10-59 (SEQ ID NO:97)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNFGY~~~RGQGTLLVTVSS

>TAR2h-10-70 (SEQ ID NO:98)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE~WYWMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
AAVYYCAK~~~VKLGGGPNYGY~~~RGQGTLLVTVSS

```

FIGURA 21I

```

>TAR2h-34 (SEQ ID NO:373)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFP~EYGMF~WVRQAPGKGLEWVS~~TISHGGEHTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAQ~~~HPVSHPKFDY~~~WGQGTLVTVSS

>TAR2h-35 (SEQ ID NO:374)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD~AYNMF~WVRQAPGKGLEWVS~~AISP SGRETYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAK~~~RYPDFDY~~~WGQGTLVTVSS

>TAR2h-36 (SEQ ID NO:375)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS~DYTMG~WVRQAPGKGLEWVS~~LIDRPGNHTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAK~~~WGLNVEFDY~~~WGQGTLVTVSS

>TAR2h-37 (SEQ ID NO:376)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFI~EYDMG~WVRQAPGKGLEWVS~~MISSDGR LTYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAK~~~TWDGLNRNFDY~~~WGQGTLVTVSS

>TAR2h-38 (SEQ ID NO:377)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFI~GYNMY~WVRQAPGKGLEWVS~~FISP SGRETYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAK~~~TLSADGRFDY~~~WGQGTLVTVSS

>TAR2h-39 (SEQ ID NO:378)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG~SYDMG~WVRQAPGKGLEWVS~~FIDVSGTLTYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAK~~~TVELDGLDFDY~~~WGQGTLVTVSS

>TAR2h-40 (SEQ ID NO:379)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA~DYDMG~WVRQAPGKGLEWVS~~FIDSSGSR TYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
TAVYYCAK~~~TAEIVNSRFDY~~~WGQGTLVTVSS

```

FIGURA 21J

```

>TAR2h-41 (SEQ ID NO:380)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD-KYQMG-WVRQAPGKGLEWVS--FIDSNHGHTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAE~~~LDNLSITPFDY~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-42 (SEQ ID NO:381)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA-KYNMY-WVRQAPGKGLEWVS--AISPKGQHTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAE~~~~GMSDAITFDY~~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-43 (SEQ ID NO:382)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS-DYTMG-WARQAPGKGLEWVS--FIDSDGLHTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAQ~~~NPOYAYESSRFDY~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-44 (SEQ ID NO:383)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFL-QYPMV-WVRQAPGKGLEWVS--SILAPGGTTYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~HPHTPHPNFDY~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-45 (SEQ ID NO:384)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG-GYRMA-WVRQAPGKGLEWVS--FIDSEGLVTTYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~LCSSNCNMRNFDY~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-47 (SEQ ID NO:385)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFP-VYNMA-WVRQAPGKGLEWVS--FIAGNGQTTYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~FASKVSPMSLTDFDY~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-48 (SEQ ID NO:386)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFH-KYGMA-WVRQAPGKGLEWVS--FIDLAGLHTYYADSVRG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~FATYSSGNEEQPFDY~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-50 (SEQ ID NO:387)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS-AYNMA-WVRQAPGKGLEWVS--FIAQSGGHTYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~FSDPDEEGTQMFDY~~~WGQGTILVTVSS

```

FIGURA 21K

>TAR2h-51 (SEQ ID NO:388)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA-TYNMS-WVRQAPGKGLEWVS--AIDAGGMHTYYADSVKG~-RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
 TAVYYCAK~~~GTEPFDY~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-66 (SEQ ID NO:389)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD-EYXMG-WVRQAPGKGLEWVS--LISPRGSKTYADSVKG~-RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
 TAVYYCAK~~~YKPPFDY~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-67 (SEQ ID NO:390)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-DYPMA-WVRQAPGKGLEWVS--FIGLKGHTYYADSVKG~-RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
 TAVYYCAK~~~DLNPFDY~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-68 (SEQ ID NO:391)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG-NGNMV-WVRQAPGKGLEWVS--HIDEYGTNTYYADSVKG~-RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
 TAVYYCAK~~~PRNDRPGFDY~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-70 (SEQ ID NO:392)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFP-TEHMY-WVRQAPGKGLEWVS--GIDTGGSHYYADSVKG~-RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
 TAVYYCAK~~~GLHWSSDSGPVHFDY~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-71 (SEQ ID NO:393)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG-NVDMH-WVRQAPGKGLEWVS--AISSAGGETYYADSVKG~-RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
 TAVYYCAK~~~RWLANSPLAFDY~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-72 (SEQ ID NO:394)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG-YEPMA-WVRQAPGKGLEWVS--TISHTGRDYYADSVKG~-RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
 TAVYYCAK~~~RWSSFDY~~~WGQGTILVTVSS

>TAR2h-73 (SEQ ID NO:395)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFP-SEKMA-WVRQAPGKGLEWVS--SIDERGIMTYADSVKG~-RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED
 TAVYYCAK~~~RWTFTNTAFDY~~~WGQGTILVTVSS

FIGURA 21L

```

>TAR2h-74 (SEQ ID NO:396)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS--RENMH~WVRQAPGKGLEWVS~~GIGPRGMPTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~GMNSHDGFDY~~~WGQGTLVTVSS

>TAR2h-75 (SEQ ID NO:397)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN~AYTMI~WVRQAPGKGLEWVS~~YIDPHGTITYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~LPRAAPRFDY~~~WGQGTLVTVSS

>TAR2h-76 (SEQ ID NO:398)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD~ASEMD~WVRQAPGKGLEWVS~~AISP SG SATYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~WTPGRTTFDY~~~WGQGTLVTVSS

>TAR2h-77 (SEQ ID NO:399)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFP~TEHMY~WVRQAPGKGLEWVS~~GIDTGGSH TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~GLHWSSDSGPVHFDY~~~WGQGTLVTVSS

>TAR2h-78 (SEQ ID NO:400)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFK~LYNMA~WVRQAPGKGLEWVS~~FIAAAGP E TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~LGDISSIPQHPFDY~~~WGQGTLVTVSS

>TAR2h-79 (SEQ ID NO:401)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG~NVD MH~WVRQAPGKGLEWVS~~AISSAGGETYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~SADITKGF DY~~~WGQGTLVTVSS

TAR2h-15 (SEQ ID NO:431)
EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF~GKYTMT~WVRQAPGKGLEWVS~~HISDDGNSTYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAK~~~VPILAPRNLEFDY~~~WGQGTLVTVSS

```

FIGURA 21M

>TAR2h-10 (SEQ ID NO:99)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG-TGGTATTGGATGGGT-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATTCTCCCGGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---GTTAAGTTGGGGGGGGGCCCTAATTTTGACTAC---TGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR2h-12 (SEQ ID NO:100)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGTT-GCTTATAATATGGGG-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--TTTATTGATATGTATGGTGTCTAAG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATTCTCCCGGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---CTTTGTTTGATGGATTGTTCTGGGGATATTTTGTACTAC---TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR21h-13 (SEQ ID NO:101)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTCCCT-GCTGATGAGATGTAT-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--AGTATTGGTTGGCCGGGTGGTGCCT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATTCTCCCGGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---TATGGTCGTAATTTTGACTAC---TGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA
GC

> TAR2h-14 (SEQ ID NO:102)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAT-CAGTATGATATGTCG-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--CTGATTGATCCGAGCGGTGGTCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATTCTCCCGCAACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---CCGGTTTTTTCTGATTGGCCTGCGGTGGAGTTTGACTAC---TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR2h-16 (SEQ ID NO:103)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGG-AATTATGATATGCAG-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--TCTATTGATGGGACTGGTGGTACT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATTCTCCCGGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGCAA---GAGACTAATGCGTTTGACTAC---TGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA
GC

FIGURA 22A

> TAR2h-17 (SEQ ID NO:104)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGT~GGTTATCAGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTTGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGATTTTACTGGTGCGCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TTGAGTGATGATCTTACTTTGCCTGAGCGGTTTCCGTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCTTGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR2h-18 (SEQ ID NO:105)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCT~GATTATAATATGACT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TGGATTGATCAGGAGGGTGTTTTT
ACATACTACGCAGATTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GATTTTTTCGGCGGCTGTTATGCTTAGGACTAGTTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCTTGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR2h-19 (SEQ ID NO:106)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGTCTCCGGATTACCTTTTCAT~GATTATGGGATGGTT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CAGATTAGTATTGATGGTTCGTACT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~AGGATTTTTGAGTTTGACTAC~~~TGGGGTCAGGGAACCTTGGTCACCGTCTCGA
GC

> TAR2h-20 (SEQ ID NO:107)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAGT~GCGTATAATATGTCT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATTTGCGCGTCTGGTAAATGAG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GGGGCTGGGGAGGCTTTTGACTAC~~~TGGGGTCAGGGAACCTTGGTCACCGTCT
CGAGC

> TAR2h-21 (SEQ ID NO:108)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACT~GAGTATAATATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGGGCATTCTGGTCAGCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGGAA~~~CTGAATAATTGATGTTTGACTAC~~~TGGGGTCAGGGAACCTTGGTCACCGTCT
CGAGC

FIGURA 22B

> TAR2h-22 (SEQ ID NO:109)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGT~GAGTATAATATGGCG~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCAAGAGTGGTCTCA~~TTTATTTCTACGGGTGGTTCATGTT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TTTTCGGTGCGTTTTAGGTGAGTATTTTTTACTAC~~~TGGGGTCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR2h-23 (SEQ ID NO:110)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATACACCTTTACT~GAGTATACGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGTCTCA~~TGGATTGCTGTTGATGGTATTCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TTGGATTGGACGGCTACTGATTTTTCTATTTTTTACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCAACGTCTCGAGC

> TAR2h-24 (SEQ ID NO:111)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCG~AATTATACTATGCTG~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGTCTCA~~GTTATTAGTGCTGAGGGTCCGACT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~CTTAATATGAAGGCTACTAATTTTAAGGATTTTACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCAACGTCTCGAGC

> TAR2h-25 (SEQ ID NO:112)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGCGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCG~GAGTATGCGATGCTT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGTCTCA~~CTTATTGATCGGACGGGTGTTATT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~CGGGATTATCAGTATCATCTGTATCAGGATTTTACTAC~~~CGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCAACGTCTCGAGC

> TAR2h-26 (SEQ ID NO:113)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCG~ACGTATAGTATGGGG~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGTCTCA~~ATGATTGATCCGGAGGGTTATCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGGAA~~~ACGAATCGGCCTTTGACGTATAAGCCTTGGTTTACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCAACGTCTCGAGC

FIGURA 22C

> TAR2h-27 (SEQ ID NO:114)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACT~GATTATAATATGGCT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTAGTCAGGAGGGTCATCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TTTAGTACTATTGCTACGTTGTCTCTGTTTGACTAC~~~TGGGGTCAGGGAA.CCC
TGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR2h-29 (SEQ ID NO:115)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCT~ACGTATAATATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TCTATTGCGTGGCTTGGTTCTGAG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~CATCTAAGGCGGAGTGTACTGGGGATCTTTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR2h-30 (SEQ ID NO:116)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGGCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGT~ATTTATTGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TCTATTTGCGGTGTTGGTATGGAG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCGAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~CATCTTATCCTACTCGGGGTGTCATCTTTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR2h-32 (SEQ ID NO:117)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGCAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGACTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR2h-33 (SEQ ID NO:118)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTAT~CGGTATTCTATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATTAGTTCTTCTGGTGGTATC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TCGACGCAGGCGCAGGGGCTGGAGTTAGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA22 D

```

> TAR2h-10-1 (SEQ ID NO:119)
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAACCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTAAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGA CTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR2h-10-2 (SEQ ID NO:120)
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGA~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGCAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTAAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGA CTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR2h-10-3 (SEQ ID NO:121)
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
ACCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACA ACTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTAAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGA CTAC~~~TGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR2h-10-4 (SEQ ID NO:122)
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGATCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCG~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTAAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGA CTAC~~~TGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

> TAR2h-10-5 (SEQ ID NO:123)
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTAAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGA CTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

```

FIGURA 22E

> TAR2h-10-6 (SEQ ID NO:124)
 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
 GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGCCCTAATTTGACTAC~~~CGGGGC
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGc

> TAR2h-10-7 (SEQ ID NO:125)
 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
 GCGAAA~~~GTGAAGTTGGGGGGGGGCCCTAATTTGACTAC~~~AGGGGC
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-8 (SEQ ID NO:126)
 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGGGGACACCGCGGTATATTACTGT
 GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGCGGGGGGCCCTAATTTGACTAC~~~AGGGGC
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCgAgC

>TAR2h-10-9 (SEQ ID NO:127)
 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTCGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGA
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
 GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGCCCTAATTTGACTAC~~~TGGGGC
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-10 (SEQ ID NO:128)
 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
 GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGCGGGGGGCCCTAATTTGACGAC~~~CGGGGC
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 22F

>TAR2h-10-11 (SEQ ID NO:129)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
AAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTACTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-12 (SEQ ID NO:130)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGCCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAAC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTACTAC~~~TGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-13 (SEQ ID NO:131)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGGGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTACTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-14 (SEQ ID NO:132)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTN
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGCAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTACTAC~~~TGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-15 (SEQ ID NO:133)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGCAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTACTAC~~~CGGGGC
CGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 22G

>TAR2h-10-16 (SEQ ID NO:134)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTC'TGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATT'CACTTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGATCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCAAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTGAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGA CTAC~~~AGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGT'CTCGAGc

>TAR2h-10-17 (SEQ ID NO:135)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTC'TGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATT'CACTTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGATCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGGGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAGGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTGAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGA CTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGT'CTCGAGC

>TAR2h-10-18 (SEQ ID NO:136)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTC'TGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATT'CACTTTTGGG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGCCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAAC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTGAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGA CTAC~~~TGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGT'CTCGAGc

>TAR2h-10-19 (SEQ ID NO:137)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTC'TGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATT'CACTTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGGGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAGGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCAAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTGAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGA CTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGT'CTCGAGc

>TAR2h-10-20 (SEQ ID NO:138)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTC'TGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATT'CACTTTTGGG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGCCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAAC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCAAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTGAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGA CTAC~~~TGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGT'CTCGAGc

FIGURA 22H

>TAR2h-10-21 (SEQ ID NO:139)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCAATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCAAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTGAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGACTAC~~~AGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGc

>TAR2h-10-22 (SEQ ID NO:140)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGGGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAGGGC~~CGGTTACCAATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTGAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGACTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGc

>TAR2h-10-27 (SEQ ID NO:141)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCAATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTGAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGACTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGc

>TAR2h-10-29 (SEQ ID NO:142)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTGACTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCAATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTGAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGACTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGc

>TAR2h-10-31 (SEQ ID NO:143)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCAATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AGCACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTGAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGACTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGc

FIGURA 221

>TAR2h-10-35 (SEQ ID NO:144)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCTGACTTTGAG-TGGTATTGGATGGGT-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---GTAAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGGCTAC---CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-36 (SEQ ID NO:145)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGTCTCCGGACTGACCTTTGAG-TGGTATTGGATGGGT-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---GTAAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGGCTAC---CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-37 (SEQ ID NO:146)

GAGGTGCAGCTGTTGGGGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCG-TGGTATTGGATGGGT-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---GTAAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGGCTAC---CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-38 (SEQ ID NO:147)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG-TGGTATTGGATGGGT-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCAAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---GTAAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGGCTAC---CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-45 (SEQ ID NO:148)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG-CCGTATTGGATGGGT-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---GTAAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGGCTAC---CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 22J

>TAR2h-10-47 (SEQ ID NO:149)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTTGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGAGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCTCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGGCCCAATTTTGGCTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-48 (SEQ ID NO:150)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
CCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGACC~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGGCTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-57 (SEQ ID NO:151)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGACTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGGCTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-56 (SEQ ID NO:152)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGACTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTGTACAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGGCTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-58 (SEQ ID NO:153)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGACTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCG~~GCTATTAGTGGTAGTGGTGATAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGGCCTAATTTTGGCTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 22K

>TAR2h-10-66 (SEQ ID NO:154)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATGAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGgCCTAATTTTGGCAAC~~~CGGGGC
CTGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-64 (SEQ ID NO:155)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGCCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGAC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGgCCTGATTTTGGCTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-65 (SEQ ID NO:156)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTATATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGgCTTAATTTTGGCTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-68 (SEQ ID NO:157)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGgCCTAATTTTGGCAAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCCGGTACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-69 (SEQ ID NO:158)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTCCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGgCCTAATTTTGGCCCC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 22L

>TAR2h-10-67 (SEQ ID NO:159)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAA-TGGTATTGGATGGGT-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---GTTAAGTTGGGGGGGGGgCCTAATTTTGGCAAC---CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-61 (SEQ ID NO:160)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCATTTGAG-TGGTATTGGATGGGT-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGTGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---GTTAAGTTGGGGGGGGGgCCTAATTTTGGCTAC---CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-62 (SEQ ID NO:161)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGGGGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCC'TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG-TGGTATTGGATGGGT-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACA'TTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---GTTAAGTTGGGGGGGGGgCCTAATTTTGGCTAC---CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-63 (SEQ ID NO:162)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCC'TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG-TGGTATTGGATGGGT-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC
ACT'TTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---GTTAAGTTGGGGGGGGGgCCTAATTTTGGCTAC---CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-60 (SEQ ID NO:163)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCT'GTGCAGCCTCCGGATTACGCTTTGAG-TGGTATTGGATGGGT-TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCTATCAGTGGTAGTGGTGATAGC
ACAT'ACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA---GTTAAGTTGGGGGGGGGgCCTAATTTTGGCTAT---CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 22M

>TAR2h-10-55 (SEQ ID NO:164)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCCCTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGATAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCAGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGgCCTAATTTTGGCTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-59 (SEQ ID NO:165)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGATAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGgCCTAATTTTGGCTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-10-70 (SEQ ID NO:166)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACTTTGAG~TGGTATTGGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATCAGTGGTAGTGGTGATAGC
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GTTAAGTTGGGGGGGGGgCCTAATTATGGCTAC~~~CGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-34 (SEQ ID NO:402)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACTTTTCT~GAGTATGGGATGGCG~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~ACGATTTCTCATGGGGGTGAGCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGCAA~~~CATCCGGTTAGTCATCCGAAGTTTGA CTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-35 (SEQ ID NO:403)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACTTTGAT~GCTTATAATATGTTT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA~~GCTATTAGTCCGTCCGGTCCGGAG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~AGGTATCCTGATT TTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 22N

>TAR2h-36 (SEQ ID NO:404)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAGT~GATTATACTATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTGATTGATCGTCCTGGTAATCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TGGGGGCTTAATGTGGAGGATTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-37 (SEQ ID NO:405)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTATT~GAGTATGATATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~ATGATTAGTTCCGGATGGTAGGCTT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~ACGTGGGATGGTTTGAATCGTAATTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-38 (SEQ ID NO:406)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTATT~GGGTATAATATGTAT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTTCTCCTTCG~GGTCGGGAG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~ACTTTGTTCGGCGGATGGTAGGTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-39 (SEQ ID NO:407)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGT~AGTTATGATATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGATGTGTCCGGTACTTTG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~ACTGTTGAGCTGGATGGTCTGGATTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-40 (SEQ ID NO:408)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCT~GATTATGATATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGATAGTTCTGGTTCTCGT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~ACGGCGGAGATTGTTAATAGTCGTTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 220

>TAR2h-41 (SEQ ID NO:409)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAT~AAGTATCAGATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGATTCTGAATGGTCATCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGGAA~~~CTTGATAATCTTAGTATTACGCCGTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-42 (SEQ ID NO:410)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCT~AAGTATAATATGTAT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCGATTAGTCTTAAGGGTCAGCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGGAA~~~GGGATGGGGTCCGATGCTATTACTTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-43 (SEQ ID NO:411)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAGT~GATTATACTATGGGT~TGGGCCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGATTCTGATGGTTTGAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGCAA~~~AATCCGCAGTATGCGTATGAGAGTTGAGGTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-44 (SEQ ID NO:412)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGG~CAGTATCCGATGGTT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA~~TCGATTTTGGCGCCGGGTGGGCCG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACTCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~CATCCTACTCATACTCCTCATCCGAATTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-45 (SEQ ID NO:413)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGG~GGTTATCGTATGGCT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGATAGTGAGGGTGTGTTG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TTGTGTTCTTCTAATTGTAATATGCGGAATTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 22P

>TAR2h-47 (SEQ ID NO:414)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCT~GTTTATAATATGGCG~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGCGGGTAATGGTCAGCAG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TTTGCGTCGAAGGTGTGCGCGATGTCGTTGACTGATTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-48 (SEQ ID NO:415)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCT~AAGTATGGGATGGCT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGATCTTGCGGGGTACAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAGGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TTTGCTACTTATTCGTGCGGTAATGAGGAGCAGCCTTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-50 (SEQ ID NO:416)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCT~GCGTATAATATGGCT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGCTCAGTCGGGTGGTCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TTTAGTCATCCTGATGAGGAGGGTACGCAGATGTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-51 (SEQ ID NO:417)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCG~ACTTATAATATGAGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCGATTGATGCGGGGGGTATGCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GGTACGGAGCCTTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-66 (SEQ ID NO:418)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAT~GAGTATAANATGGGT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA~~CTGATTAGTCCTCGGGGTCTAAG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TATAAGCCGCCTTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 22Q

>TAR2h-67 (SEQ ID NO:419)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~GATTATCCTATGGCG~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGGTCTGAAGGGTATTTCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GATCTGAATAATTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-68 (SEQ ID NO:420)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGT~AATGGTAATATGGTT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CATATTGATGAGTATGGTACGAAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~CCTCGTAATGATCGGCCTGGGTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-70 (SEQ ID NO:421)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTCTT~ACTGAGCATATGTAT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA~~GGTATTGATACGGGGGGTTCTCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GGTCTGCATTGGAGTAGTGATTCTGGGCCTGTTTCATTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-71 (SEQ ID NO:422)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGT~AATGTGGATATGCAT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATTAGTAGTGCGGGTGGTGAG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~CGTATGCTTGCGAATTCTCCTTTGGCTTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-72 (SEQ ID NO:423)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGCGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGG~TATGAGCCTATGGCT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~ACGATTTCTCATACGGGTCTGTAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~CGTTGGTCTTCGTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 22R

>TAR2h-73 (SEQ ID NO:424)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCCT~AGTGAGAAGATGGCG~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TCGATTGATGAGAGGGGTATTATG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTCCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~AGGTGGACTTTTAATACTGCGTTTGA CTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-74 (SEQ ID NO:425)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCG~CGGGAGAATATGCAT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA~~GGTATTGGGCCGAGGGGTATGCCG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTCCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GGTATGAATTCGCATGATGGGTTTGA CTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-75 (SEQ ID NO:426)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAT~GCGTATACTATGATT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TATATTGATCCTCATGGTACGATT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTCCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TTGCCGCGTGCGGCGCCGCGGTTTGA CTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-76 (SEQ ID NO:427)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAT~GCGTCTGAGATGGAT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCGATTTGCGCTAGTGTTCTGCT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTCCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TGGACTCCGGGTCGTACTACTTTTGA CTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-77 (SEQ ID NO:428)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCCT~ACTGAGCATATGTAT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA~~GGTATTGATACGGGGGGTTCTCAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTCCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~GGTCTGCATTGGAGTAGTGATTCTGGGCCTGTTTCATTTTGA CTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 22S

>TAR2h-78 (SEQ ID NO:429)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAG~TTGTATAATATGGCG~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGCTGCTGCTGGTCCTGAG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TTGGGGGATATTAGTAGTATTCCTCAGCATCCGTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>TAR2h-79 (SEQ ID NO:430)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGT~AATGTGGATATGCAT~TGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATTAGTAGTGCGGGTGGTGAG
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT
GCGAAA~~~TCTGCGGATATTACTAAGGGTTTTGACTAC~~~TGGGGT
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-15 (SEQ ID NO:432)

GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCCCTGCGTCTCTCCT
GTGCAGCCTCCGGATTACCTTT~GGTAAGTACACTATGACG~TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CATATTTCGGATGATGGTAATTCTACATACTACGCAGACTC
CGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA
ACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA~~~GTTCCGATTTTGGCTCC
TCGTAATCTTTTTGACTAC~~~TGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 22T

TAR2m-15 (SEQ ID NO:168)
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC-RASQYIHTSLQ-WYQOKPGKAPKLLIY--GSSRLQS--GVPSRFSGSGGTDFLTITSSLOPEDPATYYC---QQNHHSPT---FG
 EIKR

TAR2m-19 (SEQ ID NO:169)
 EVQLLESGGGLVQPFGGSLRLSCAASGFTFRKYDMHWVRQAPGKGLEWVSTISPSGRRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAENLDQVLSFDYWGQ
 VSS

TAR2m-20 (SEQ ID NO:170)
 EVQLLESGGGLVQPFGGSLRLSCAASGFTFGSYSMWVRQAPGKGLEWVSGIDNGGHSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKRSSGCLPPFPDYWG
 TVSS

TAR2m-21 (SEQ ID NO:171)
 EVQLLESGGGLVQPFGGSLRLSCAASGFTTRYSMGWVRQAPGKGLEWVSRIDSYGRGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKISQFGSNAFDYWG
 TVSS

TAR2m-24 (SEQ ID NO:172)
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQYIHTSLQWYQOKPGKAPKLLIYSSSLHSGVPPRFSGSGGTDFLTITSSLOPEDPATYYCQNHFRPHTFGQGTKVEIKR

TAR2m-21-23 (SEQ ID NO:173)
 EVQLLESGGGLVQPFGGSLRLSCAASGFTFN-RYSMG-WLRQAPGKGLEWVS--RIDSYGRGTYYEDPVKG--RPSISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAK---ISQF
 DY---WGQGTQVTVSS

TAR2m-21-07 (SEQ ID NO:174)
 EVQLLESGGGLVQPFGGSLRLSCAASGFTFSCSMGWLRQAPGKGLEWVSRIDSYGRGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKISKFGSNAFDYWG
 TVSS

FIGURA 23A

TAR2m-21-43 (SEQ ID NO:175)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTRYSMGWLRLQAPGKGLEWVSRLDSYGRGTYDADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKISQFGSNAFDYWGQGTLLV
 TVSS

TAR2m-21-48 (SEQ ID NO:176)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTRYSMGWLRLQAPGKGLEWVSRLDSYGRGTYDADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKISQFGSNAFDYWGQGTLLV
 TVSS

TAR2m-21-10 (SEQ ID NO:177)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTRYSMGWLRLQAPGKGLEWVSRLDSYGRGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKISQFGSNAFDYWGQGTLLV
 TVSS

TAR2m-21-06 (SEQ ID NO:178)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTRYSMGWLRLQAPGKGLEWVSRLDSYGRGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKISQFGSNAFDYWGQGTLLV
 TVSS

TAR2m-21-17 (SEQ ID NO:179)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTRYSMGWLRLQAPGKGLEWVSRLDSYGRGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKISQFGSNAFDYWGQGTLLV
 TVSS

FIGURA 23B

TAR2m-14 (SEQ ID NO:180)
GATATTTCAGatgAACCCAGAGCCCGAGCAGCTGAGCGGAGCGTGGGCGATCGGTGACATTACTTCCGTGCGAGCCAGCCGATTGGCGTGGCGCTGAACCTGGTATCAGCAGAA
ACCGGCAAAAGCGCCGAAACTGCTGATTATGGCGGAGCTATCTGAGAGCGCGTGCAGAGCCGTTATAGCGGAGCGCGAGCGCAGCGCACCGGATTTTACCCCTGACCATTTAGCAGCC
TGCAGCGGGCGGATTTTGGACCTATTATTGCCAGCAGGATTGGCGTTATCCGGGCACCTTTGGCCAGGCGCACCAAGTGGAAATTTAAACGT

TAR2m-15 (SEQ ID NO:181)
GATATTTCAGatgAACCCAGAGCCCGAGCAGCTGAGCGGAGCGTGGGCGATCGGTGACATTACTTCCGTGCGAGCCAGCTATATTATACAGCCCTGCAGTGGTATCAGCAGAA
ACCGGCAAAAGCGCCGAAACTGCTGATTATGGCAGCAGCCGCTGCGAGCGCGTGCAGAGCGCGTGCAGAGCCGTTTATAGCGGAGCGCGAGCGCACCGGATTTTACCCCTGACCATTTAGCAGCC
TGCAGCGGAGATTTTGGACCTATTATTGCCAGCAGAACCATCATAGCCCCGTTTACCTTTGGCCAGGCGCACCAAGTGGAAATTTAAACGT

TAR2m-19 (SEQ ID NO:182)
GAAGTCAGCTGCTGGAAAGCGCGCGCCCTGGTGTGACCCCGCGGAGCCCTGCTGAGCTGCGCGGAGCGGCTTTACCTTTTCGTAATATGATatgCATTTGGGTGCGTCA
GGCGCGGCAAAAGCCCTGGATGGTGAGCACCATTAGCCCGAGCGCGCTGCTATATGCGGATAGCGTGAAGCGCGTTTACCATTTAGCCGTGATAAACAGCAAAACA
CCCTGTATCTGCAGatgAACAGCCTGCGTGGGAAGATACCGCGGTGATTATTGCGCGGAAACCTGGATCAGGTGCTGAGCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACC
GTAGCAGC

TAR2m-20 (SEQ ID NO:183)
GAAGTCAGCTGCTGGAAAGCGCGCGCCCTGGTGTGACCCCGCGGAGCCCTGCTGAGCTGCGCGGAGCGGCTTTACCTTTGGACCTATAGCatgAGCTGGGTGCGTCA
GGCGCGGCAAAAGCCCTGGATGGTGAGCGGCATTTGATTAACGGCGGCGCATAGCACCTATTATGGGATAGCGTGAAGCGCGTTTACCATTTAGCCGTGATAAACAGCAAAACA
CCCTGTATCTGCAGatgAACAGCCTGCGTGGGAAGATACCGCGGTGATTATTGCGGAAACGTTAGCAGCGCGCTGCCGTTTCCGTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG
ACCGTGAGCAGC

TAR2m-21 (SEQ ID NO:184)
GAAGTCAGCTGCTGGAAAGCGCGCGCCCTGGTGTGACCCCGCGGAGCCCTGCTGAGCTGCGCGGAGCGGCTTTACCTTTACCCGTTATAGCatgGGGTGGGTGCGTCA
GGCGCGGCAAAAGCCCTGGATGGGTGAGCCGTTTATAGTAGCTATGGCGGTGCGCACCTATTATGCGGATAGCGTGAAGCGCGTTTACCATTTAGCCGTGATAAACAGCAAAACA
CCCTGTATCTGCAGatgAACAGCCTGCGTGGGAAGATACCGCGGTGATTATTGCGGAAACGTTAGCAGCGCGCTGCCGTTTCCGTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG
ACCGTGAGCAGC

TAR2m-24 (SEQ ID NO:185)
GATATTTCAGatgAACCCAGAGCCCGAGCAGCTGAGCGGAGCGTGGGCGATCGGTGACCATTAACCTCCGTGCGAGCCAGTATATTATATAGCAGCCCTGCAGTGGTATCAGCAGAA
ACCGGCAAAAGCGCCGAAACTGCTGATTATAGCAGCAGCCGCTGCTGATAGCGCGTGCAGCGCGTTTACCGGAGCGGCGCACCGGATTTTACCCCTGACCATTTAGCAGCC
TGCAGCGGAGATTTTGGACCTATTATTGCCAGCAGAACCATTTTCCGCGATACCTTTGGCCAGGCGCACCAAGTGGAAATTTAAACGT

FIGURA 24A

TAR2m-21-23 (SEQ ID NO:186)
 GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGCGGCGCTGGTGCAGCCGGGGGCGAGCGCTTTACCTTTAACCGTTATAGCAtgGGCTGGCTGCGGTCA
 GGCGCGGGCAAAAGCCTGGAAATGGGTAGCCGTAATTGATAGCTATGGCGGTGACCTATATGAGATCCGGTGAAGCGCGTTTACCATTTAGCCGTGATAACAGCAAAACA
 CCCTGTATCTGCAGatgAACAGCCTGCGTGCAGAGATACCGCGGTGTATTATTCGCGGAAATTAGCCAGTTTGGCAGCAACGCGTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCAGGTG
 ACCGTGAGCAGC

TAR2m-21-07 (SEQ ID NO:187)
 GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGCGGCGCTGGTGCAGCCGGGGGCGAGCGCTTACCTTTAGCCGTTGCAGCAtgGGCTGGCTGCGGTCA
 GGCGCGGGCAAAAGCCTGGAAATGGGTAGCCGTAATTGATAGCTATGGCGGTGACCTATATGAGATAGCGCGTTTACCATTTAGCCGTGATAACAGCAAAACA
 CCCTGTATCTGCAGatgAACAGCCTGCGTGCAGAGATACCGCGGTGTATTATTCGCGGAAATTAGCCAGTTTGGCAGCAACGCGTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG
 ACCGTGAGCAGC

TAR2m-21-43 (SEQ ID NO:188)
 GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGCGGCGCTGGTGCAGCCGGGGGCGAGCGCTTACCTTTACCGTTATAGCAtgGGCTGGCTGCGGTCA
 GGCGCGGGCAAAAGCCTGGAAATGGGTAGCCGTAATTGATAGCTATGGCGGTGACCTATATGAGATAGCGCGTTTACCATTTAGCCGTGATAACAGCAAAACA
 CCCTGTATCTGCAGatgAACAGCCTGCGTGCAGAGATACCGCGGTGTATTATTCGCGGAAATTAGCCAGTTTGGCAGCAACGCGTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG
 ACCGTGAGCAGC

TAR2m-21-48 (SEQ ID NO:189)
 GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGCGGCGCTGATTGAGCCGGGGCGAGCGCTGCGTCTGAGCTGCGGCGAGCGCGCTTTACCTTTACCGTTATAGCAtgGGCTGGCTGCGGTCA
 GGCGCGGGCAAAAGCCTGGAAATGGGTAGCCGTAATTGATAGCTATGGCGGTGACCTATGATACCGATAGCGTGAAGCGCGTTTACCATTTAGCCGTGATAACAGCCGTAACA
 CCCTGTATCTGCAGatgAACAGCCTGCGTGCAGAGATACCGCGGTGTATTATTCGCGGAAATTAGCCAGTTTGGCAGCAACGCGTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG
 ACCGTGAGCAGC

TAR2m-21-10 (SEQ ID NO:190)
 GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGCGGCGCTGGTGCAGCCGGGGGCGAGCGCTGCGTCTGAGCTGCGGCGAGCGCGCTTTACCTTTACCGTTATAGCAtgGGCTGGCTGCGGTCA
 GGCGCGGGCAAAAGCCTGGAAATGGGTAGCCGTAATTGATAGCTATGGCGGTGACCTATTTATGCGGATAGCGTGAAGCGCGTTTACCATTTAGCCGTGATAACAGCAAAACA
 CCCTGTATCTGCAGatgAACAGCCTGCGTGCAGAGATACCGCGGTGTATTATTCGCGGAAATTAGCCAGTTTGGCAGCAACGCGTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG
 ACCGTGAGCAGC

FIGURA 24B

TAR2m-21-06 (SEQ ID NO:191)
 GAAAGTGCAGCTGCTGGAAGCGCGCGGCTGGTGCAGCGCGGCGGAGCGCTTTACCTTTACCCGTTATAGCaTgGGCTGGATTGCTCA
 GGCGCCGGGCAAGGCTTGAATGGGTGAGCCGTATTGATAGCTATGGCCGTGGCACCTATTATGCGGATAGCGTGAAGGCCGTTTTACCATTAGCCGTGATACAGCAAAACA
 CCTGTATCTGCAGatGAAACAGCCTGGGTGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGAAATTAGCCAGTTTGGCAGCAACGCCGTTTGATTATTGGGGCCAGGCAACCCCTGGTG
 ACCGTGAGCAGC

TAR2m-21-17 (SEQ ID NO:192)
 GAAAGTGCAGCTGCTGGAAGCGCGGCGGCTGGTGCAGCGCGGCGGAGCGCTGGTCTGAGCTGCGCGGCGGAGCGGCTTTACCTTTACCCGTTATAGCaTgGGCTGGGTGGCTCA
 GGCGCCGGGCAAGGCTTGAATGGGTGAGCCGTATTGATAGCTATGGCCGTGGCACCTATTATGCGGATAGCGTGAAGGCCGTTTTACCATTAGCCGTGATACAGCAAAACA
 CCTGTATCTGCAGatGAAACAGCCTGGGTGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGAAATTAGCCAGTTTGGCAGCAACGCCGTTTGATTATTGGGGCCAGGCAACCCGTGGTG
 ACCGTGAGCAGC

TAR2m-21-23a (SEQ ID NO:626)
 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGGGTCTCTCTGTCAGCTCCGSAATTCACCTTTAAT-AGGTATAGTATGGG--TGGCTCCGC
 CAGGCTCCAGGGAAGGTTCTAGTGGGTCTCA--CGATTGATTCTTATGGTCTGGTGTACATCTACGAGACCCCGTGRAGGC--CGTTTCAGCATCTCCCGGACAAATTC
 A9AACAGCTGTATCTGCAATGAAACAGCCTGCGTCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA---ATTCTCAGTTTGGGTCAAAATGCCGTTTACTAC---TGGGGTCAG
 GGAACCCAGGTACCCGTCCTCGAGC

FIGURA 24C

HEL4
 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F R I S D E D M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGTC CTGGGTCTC TCTGTGTCAG CCTCGGATT TAGGATTAGC GATGAGGATA
 G W V R Q A P G K G L E W V S S I Y C P S G S T Y Y A D S V K G R
 TGGGCTGGGT CGCCAGGCT CCAGGAGG GTCAGAGTG GGTATCAAGC ATTATGACC CTAGCGTAG CACATACCTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A S A L
 GTTCACCATC TCCCTGACCA ATTCACAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCCTGG TCCGAGGAC ACCGGGTAT ATTATGCGC GAGTCTTTG
 E P L S E P L G F W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:193)
 GAGCGCTTT CGAGCCCTT GGGCTTTTG GGTACGGAA CCTGGTCAC COTCTCAGC (SEQ ID NO:194)

TAR2-5
 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F D L Y N M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGTC CTGGGTCTC TCTGTGTCAG CCTCGGATT CACCTTGAT CTTATATA
 F W V R Q A P G K G L E W V S F I S Q T G R L T W Y A D S V K G R
 TGTTTTGGT CGCCAGGCT CCAGGAGG GTCAGAGTG GGTCTCAIT ATTAGTCAGA CTGGTAGGCT TACATGGTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K T L
 GTTCACCATC TCCCGGACCA ATTCACAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCCTGG TCCGAGGAC ACCGGGTAT ATTACTGTGC GAAACGGCTG
 E D F D Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:195)
 GAGGATTTG ACTACTGGG CCAGGAGACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO:196)

TAR1-5-19
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V K E F L W
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC ATCCTTGCC GGCACACTCA GAGGTTAAG GAGTTTAT
 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y M A S N L Q S G V P S R F S G S G S
 GGTGTACCA GCAGAACCA GGAAGGCC CTAGCTCTCT GATCTATG GATCCCAIT TGCMAAGTG GGTCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q K F K L P R T F G Q
 TGGACAGAT TTACTCTCA CCATCAGCAG TGTGACCT GAAGATTTG CTACGTACTA CTGTACACAG AGTTTAAGC TGCCTCGTAC GTTCGGCCAA
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:197)
 GGGACCAAGG TGGATCNA ACGG (SEQ ID NO:198)

FIGURA 25A

TAR-1 dAb Secuencia de ADN y de aminoácidos

dAb 1, 2 y 3 son las secuencias pareja de los dímeros TAR1-5 1-6. dAb1 es el dAb pareja de los dímeros 1, 5 y 6 los segundos dAb son los mismos pero las longitudes del ligador son diferentes, asimismo, dAb2 es el dAb pareja de los dímeros 2 y 3, dAb3 es el dAb pareja del dímero 4. *indica la presencia de un codón de terminación ámbar. Homología de secuencia entre TAR1-5, TAR1-5-19 y los segundos dAb únicos es 88%

TAR1-5-19

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I D S Y L H
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCATCTCTCT CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACCC ATCATTGACC GGGCAAGTCA GACATTTCAT AGTTATTATAC
CTGTAGGTCT ACTGGGTCCAG AGTAGGAGA GACAGACGTA GACATCCCTCT GGCACAGTGG TAGTGACGG CCGCTTCAGT CTGTACTA TCAATAATG
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S E L Q S G V P S R F S G S G S
ATTGGTACCA GCAGAACCA GGGAAAGCCC CTAACTCTCT GAATCTATAGT GCATCCAGT TGCAGAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCGTTTGGG GATTGAGGA CTAGATATCA CATTAGTACC CAGGGGTAGT GCAAGTGCAC CGTCACCTAG
G T D F T L T I S L Q P E D F A T Y Y C Q Q V V W R P F T F G Q
TGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTG CTACGTACTA CTGTACACAG GTTGTGTGGC GTCTTTTAC GTTGGGCCA
ACCTCTCTA AGTGTAGAGT GGTAGTGTGTC AGAGTTGGA CTCTAAAC GATGATGAT GACAGTTGTC CAACACACCG CAGGAAATG CAAGCCGGTT
G T K V E I K R (SEQ ID NO:200)
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGC (SEQ ID NO:201)
CCCTGGTTC ACCTTAGTT TGCG* (SEQ ID NO:202)

TAR1-5

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I F M N L L
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCATCTCTCT CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACCC ATCATTGACC GGGCAAGTCA GACATTTCAT AGTTATTAT
CTGTAGGTCT ACTGGGTCCAG AGTAGGAGA GACAGACGTA GACATCCCTCT GGCACAGTGG TAGTGACGG CCGCTTCAGT CTGTAAATA TACTTAATA
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y N A S V L Q S G V P S R F S G S
TGTGTACCA GCAGAACCA GGGAAAGCCC CTAACTCTCT GATCTATAT GATCCGTGT TGCAGAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
ACACCATGGT CGTCTTTGGT CCGTTTGGG GATTGAGGA CTAGATATTA CATTAGTACC CAGGGGTAGT GCAAGTGCAC CGTCACCTAG
G T D F T L T I S L Q P E D F A T Y Y C Q Q V V W R P F T F G Q
TGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTG CTACGTACTA CTGTACACAG GTTGTGTGGC GTCTTTTAC GTTGGGCCA
ACCTCTCTA AGTGTAGAGT GGTAGTGTGTC AGAGTTGGA CTCTAAAC GATGATGAT GACAGTTGTC CAACACACCG CAGGAAATG CAAGCCGGTT
G T K V E I K R (SEQ ID NO:203)
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGC (SEQ ID NO:204)
CCCTGGTTC ACCTTAGTT TGCC (SEQ ID NO:205)

Monómero - dAb1 Pareja dAb en TAR1-5d1 (3U ligador) d5 (5U ligador) d6 (70 ligador)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I Y D A L B
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCATCTCTCT CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACCC ATCATTGACC GGGCAAGTCA GACATTTCAT GATGCGTTAG
CTGTAGGTCT ACTGGGTCCAG AGTAGGAGA GACAGACGTA GACATCCCTCT GGCACAGTGG TAGTGACGG CCGCTTCAGT CTGTAAATA TCAACGCAATC
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y T A S R L Q S G V P S R F S G S G S
ATTGGTACCA GCAGAACCA GGGAAAGCCC CTAACTCTCT GATCTATAT GATCCGTGT TGCAGAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCGTTTGGG GATTGAGGA CTAGATATGA CATTAGTACC CAGGGGTAGT GCAAGTGCAC CGTCACCTAG

FIGURA 25B

Monómero - dAb pareia en TAP1-5d2 (3U ligador), d3 (5U ligador)

Monómero - dAb3: dAb pareia en TAR1-5d4 (SU ligador)

TAR1-27 y secuencias de AUN y aminoácidos del dAb pareja relacionadas (indica la presencia de un codón de terminación ámbart)
La homología de secuencia entre TAR1-27 y los segundos dAb únicos es 90.4%.

TAR1-27

D I Q M T Q S P S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I W T K L H
GAGATCCGGA TGACCCAGTC TCCTCTCTCC CTGTCTGAT CTGTAGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTGG ACGAAGTTAC
CTGTAGCTCT ACTGGCTCAG AGTATGAGG GACAGACTA GACATCTCT GGCACATGG TAGTAAGCS CCGGTTACGT CTGTGTAACC TGCTTCAMTG

FIGURA 25C

W Y Q Q K P G K A P K L L I Y M A S S L Q S G V P S R F S G S G S
 ATTGTACCA GCAGAACCA GGGAAAGCC CTAAGTCTT GATCTATATG GATCCAGT TGCAAGTAG GGTCCCAACA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
 TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCGTTTGGG GATTCAGGA CTAGATATAC GATAGGTCAA ACCTTTTACC CCAGGGTAGT GCAAGTCAC CGTCACCTAG
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q W F S N P S T F G Q
 TGGACAGAT TTCACCTCA CCATCAGCAG TCTGCACCT GAAGNTTGG CTAGCTACTA CTGTCAACAG TGGTTTAGTA ATCCTAGTAC GTTCGGCCAA
 ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTGTG ACACGTGGA CTCTAAAC GATCATGAT GACAGTTGTC ACCAAATCAT TAGGATCATG CAAGCCGGTT
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:215)
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGC (SEQ ID NO:216)
 CCTGGTTCC ACCTTTAGT TGG (SEQ ID NO:217)

Monómero del dAb pareja en TAR1-27d1 (3U ligador)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I * P I L C
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCATCTCTC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTAG CCGATTTTAT
 CTGTAGGTCT ACTGGGTGAG AGGTAGGAGG GACAGAGTA GACATCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCGTTCAGT CTGTAAATC GGCTAAATA
 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S
 GTTGTACCA GCAGAACCA GGGAAAGCC CTAAGTCTT GATCTATGCT GATCCAGT TGCAAGTAG GGTCCCAACA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
 CAACATGGT CGTCTTTGGT CCGTTTGGG GATTCAGGA CTAGTAGGA CGTAGTCAAC ACCTTTTACC CCAGGGTAGT GCAAGTCAC CGTCACCTAG
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q I Q H I P V T F G Q
 TGGACAGAT TTCACCTCA CCATCAGCAG TCTGCACCT GAAGNTTGG CTAGCTACTA CTGTCAACAG ATTCAAGATA TTCTGTGAC GTTCGGCCAA
 ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTGTG AGACGTGGA CTCTAAAC GATCATGAT GACAGTTGTC TAAGTGTAT AAGGACACTG CAAGCCGGTT
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:218)
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGC (SEQ ID NO:219)
 CCTGGTTCC ACCTTTAGT TGG (SEQ ID NO:220)

Monómero del dAb pareja en TAR1-27d2 (3U ligador)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I G * D L H
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCATCTCTC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTAG TAGGATTTAC
 CTGTAGGTCT ACTGGGTGAG AGGTAGGAGG GACAGAGTA GACATCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCGTTCAGT CTGTAAATC ATCCTAAATG
 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y T A S L L Q S G V P S R F S G S G S
 ATTGTACCA GCAGAACCA GGGAAAGCC CTAAGTCTT GATCTATGCT GATCCAGT TGCAAGTAG GGTCCCAACA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
 TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCGTTTGGG GATTCAGGA CTAGTAGTGC GTTAGGAGA ACCTTTTACC CCAGGGTAGT GCAAGTCAC CGTCACCTAG
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S A F P N T L G Q
 TGGACAGAT TTCACCTCA CCATCAGCAG TCTGCACCT GAAGNTTGG CTAGCTACTA CTGTCAACAG CAGAGTGT TTCTTAATAC GTTCGGCCAA
 ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTGTG AGACGTGGA CTCTAAAC GATCATGAT GACAGTTGTC GTCTCAGAA AAGGATTTAG CGAGCCGGTT
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:221)
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGC (SEQ ID NO:222)
 CCTGGTTCC ACCTTTAGT TGG (SEQ ID NO:223)

Monómero del dAb pareja en TAR1-27d7 (3U ligador)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I T K N L L
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCATCTCTC CTGTCTGCAT CCGTAGGAGA CCGTGTACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTAG AAGATTTAC
 CTGTAGGTCT ACTGGGTGAG AGGTAGGAGG GACAGAGTA GGCATCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCGTTCAGT CTGTAAATG TTCTTAATG

FIGURA 25D

H Y Q Q K P G K A P K L L I Y * A S S L Q S G V P S R F S G S G S
 TTTGTACCA GCAGAACCA GGAAGGCC CTAAGCTCTT GATCTATTAG GCATCTCTT TGCAGGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGCATC
 AAACCATGGT CTTCTTTGGT CCGTTTGGG GATTCAGGAA CTAGATAATC CTAGAGGAA ACCTTTTACC CCAAGGTAGT GCAAGTGCAC COTCACCTAG
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C O Q L R H K P P T F G Q
 TGGACAGAT TTCACCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACT GAAGNTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CTTGTCTATA AGCTCCGAC GTTGGGCCAA
 ACCCTGTCTA AAGTCAGAGT GGTAGTCTGC AGAGCTTGGG CTCTTAACAC GATGCATGAT GACAGTTGTC GAAGCAGTAT TCGAGGCTG CAGCCCGT
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:224)
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO:225)
 CCTGTGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO:226)

Monómero del dAb pareja en TAR1-27d8 (3U ligador)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I * K S L R
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTAG AAGTCTTTAA
 CTGTAGGTCT ACTGGGTGAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCTCTT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCGTTCAGT CTGTAAATC TTCAGAAAT
 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y H A S D L Q S G V P S R F S G S G S
 GGTGTACCA GCAGAACCA GGAAGCCC CTAAGCTCTT GATCTATCAT GATCCGAT TGCAGGTGG GGTCCCATCA CCGTTTCAGTG GCAGTGCATC
 CCACCATGGT CGTCTTTGGT CCGTTTGGG GATTCAGGGA CTAGATAGTA GGTAGGCTAA ACCTTTTACC CCAAGGTAGT GCAAGTGCAC COTCACCTAG
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q M V N S P V T F G Q
 TGGACAGAT TTCACCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACT GAAGNTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ATGCTTAATA GTCTGTATAC GTTGGGCCAA
 ACCCTGTCTA AAGTCAGAGT GGTAGTCTGC AGAGCTTGGG CTCTTAACAC GATGCATGAT GACAGTTGTC TACCAATTTAT CAGGACAAATG CAGCCCGT
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:227)
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO:228)
 CCTGTGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO:229)

Monómero del dAb pareja en TAR1-27d12 (3U ligador)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I * T A L H
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTAG ACGGCTTAC
 CTGTAGGTCT ACTGGGTGAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCTCTT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCGTTCAGT CTGTAAATC TCCGCAATG
 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S S L Q S G V P S R F S G S G S
 ATTGTACCA GCAGAACCA GGAAGCCC CTAAGCTCTT GATCTATCAT GATCCGAT TGCAGGTGG GGTCCCATCA CCGTTTCAGTG GCAGTGCATC
 TAACCATGGT CCGTCTTTGGT CCGTTTGGG GATTCAGGGA CTAGATAGTA GGTAGGCTAA ACCTTTTACC CCAAGGTAGT GCAAGTGCAC COTCACCTAG
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S S F L P F T F G Q
 TGGACAGAT TTCACCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACT GAAGNTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TCGAGTTTIT TGCCTTTTAC GTTGGGCCAA
 ACCCTGTCTA AAGTCAGAGT GGTAGTCTGC AGAGCTTGGG CTCTTAACAC GATGCATGAT GACAGTTGTC ACCTCAAAA ACGGAAATG CAGCCCGT
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:230)
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO:231)
 CCTGTGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO:232)

Monómero del dAb pareja en TAR1-27d16 (3U ligador)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I G P N L E
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTAG CCGAATTTAG
 CTGTAGGTCT ACTGGGTGAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCTCTT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCGTTCAGT CTGTAAATC GGCCTTAATC

FIGURA 25E

W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S
 AGTGGTACCA GCAGAACCA GGGAAAGCCC CTAGTCTCT GATCATGCT TSCAAGTGG GGTCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGNATC
 TCACCATGCT CGTCTTTGGT CCGTTTCGGG GATTCCAGGA CTAGATACGA CTTAGGTCAAC AGTTTCACCC CCAGGTAGT GCAAGTGCAC CGTCACCTAG
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Q M G R P R T F G Q
 TGGACAGAT TTCACCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT TCTGCACTTCT CTAGTACTA CTGTACACAG CAGATGGGGC GTCTCGGAC GTTCGGGCA
 ACCCTGTCTA AGTGTAGAT GGTAGTGTG AGACGTGGA CTTCTAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC GTCTACCCCG CAGGAGCCTG CAAGCCGCTT
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:233)
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO:234)
 CCGTGGTTC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO:235)

Monómero del dAb pareja en TAR1-27d23 (5U ligador)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I K H * L A
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTGTCACC ATCACTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAAG CATTAGTTAG
 CTGTAGTCT ACTGGGTGAG AGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCGTTTCAGT CTGTATATC GTATCATC
 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y K A S V L Q S G V P S R F S G S G S
 CTGGTACCA GCAGAACCA GGGAAAGCCC CTAGTCTCT GATCATGCT TSCAAGTGG GGTCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGNATC
 GACCATGCT CGTCTTTGGT CCGTTTCGGG GATTCCAGGA CTAGATATC CTTAGGTCAAC AGTTTCACCC CCAGGTAGT GCAAGTGCAC CGTCACCTAG
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q L R R P T T F G Q
 TGGACAGAT TTCACCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GATCATGCT CTAGTACTA CTGTACACAG CTTAGGCGTC GTCTACTATC GTTCGGGCA
 ACCCTGTCTA AGTGTAGAT GGTAGTGTG AGACGTGGA CTTCTAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC GAATCCGCGAG CAGGATGATG CAAGCCGCTT
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:236)
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO:237)
 CCGTGGTTC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO:238)

Monómero del dAb pareja en TAR1-27d30 (7U ligador)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V K A * L T
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTGTCACC ATCACTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAAG CATTAGTTAA
 CTGTAGTCT ACTGGGTGAG AGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCGTTTCAGT CTGTATATC GTATCATC
 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y K A S T L Q S G V P S R F S G S G S
 CTGGTACCA GCAGAACCA GGGAAAGCCC CTAGTCTCT GATCATGCT TSCAAGTGG GGTCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGNATC
 GACCATGCT CGTCTTTGGT CCGTTTCGGG GATTCCAGGA CTAGATATC CTTAGGTCAAC AGTTTCACCC CCAGGTAGT GCAAGTGCAC CGTCACCTAG
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H S S R P Y T F G Q
 TGGACAGAT TTCACCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GATCATGCT CTAGTACTA CTGTACACAG CATTAGTTCTA GGCCTTATAC GTTCGGGCA
 ACCCTGTCTA AGTGTAGAT GGTAGTGTG AGACGTGGA CTTCTAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC GAGCATTAAG CCGGATGATG CAAGCCGCTT
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:239)
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO:240)
 CCGTGGTTC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO:241)

Monómero del dAb pareja en TAR1-27d31 (7U ligador)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I E N R L G
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTGTCACC ATCACTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAAG CATTAGTTAG
 CTGTAGTCT ACTGGGTGAG AGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCGTTTCAGT CTGTATATC GTATCATC

FIGURA 25P

W Y Q Q K P G K A P K L L I Y * A S L L Q S G V P S R F S G S G S
 GTGGTACCA GCAGAACCA GGGAGGCC CTAAGCTCT CATCTATAG CGGCTTGT TGCNAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCGTGGATC
 CAACCATGGT CGTCTTGGT CCCTTTCGGG GATTCAGGA CTAGTAATC AGTTTCAAC CAGGGTAGT GCAAGTCAAC CGTCACCTAG
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q D S Y F P R T F G Q
 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGAG TCTGCACTT GAAGATTGG CTAGTACTA CTGTCAACAG GATTCGTATT TTCTCGTAC GTTCGGCCAA
 ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTGTG ACAGGTGGA CTCTAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC CTAAGCATAA AAGGAGCATG CAAGCCGGTT
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:242)
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO:243)
 CCCTGGTTC ACCTTAGTT TGCC (SEQ ID NO:244)

Monómero del dAb pareja en TAR1-27d36 (7U ligador)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I M D K L K
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCATCTCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC ATCACTTACC GGGCAAGTCA GACATTATG GATAAGTAA
 CTGTAGGTCT ACTGGGTGAG AGGTAGGAGG GACAGAGTA GACATCTCT GGCACAGTGG TAGTCAACGG CCGTTCAGT CTGTAATAC CTATCAATT
 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y * A S I L Q S G V P S R F S G S G S
 AGTGGTACCA GCAGAACCA GGGAGGCC CTAAGCTCT CATCTATAG GATCCATT TGCNAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCGTGGATC
 TCACCATGGT CGTCTTGGT CCCTTTCGGG GATTCAGGA CTAGTAATC CGTAGTAA ACCTTTCACC CAGGGTAGT GCAAGTCAAC CGTCACCTAG
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q D S G G P N T F G Q
 TGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGAG TCTGCACTT GAAGATTGG CTAGTACTA CTGTCAACAG GATAGTGGG GTCTAATAC GTTCGGCCAA
 ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTGTG ACAGGTGGA CTCTAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC CTAACCCC CAGGATTATG CAAGCCGGTT
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:245)
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO:246)
 CCCTGGTTC ACCTTAGTT TGCC (SEQ ID NO:247)

Monómero del dAb pareja en TAR1-27d37 (7U ligador)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I G R N L E
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCATCTCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC ATCACTTACC GGGCAAGTCA GACATTATG AGGATTATG
 CTGTAGGTCT ACTGGGTGAG AGGTAGGAGG GACAGAGTA GACATCTCT GGCACAGTGG TAGTCAACGG CCGTTCAGT CTGTAAACCC TCCTTAATC
 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S H L Q S G V P S R F S G S G S
 AGTGGTACCA GCAGAACCA GGGAGGCC CTAAGCTCT CATCTATAG GATCCCAT TGCNAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCGTGGATC
 TCACCATGGT CGTCTTGGT CCCTTTCGGG GATTCAGGA CTAGTACTA CPTAGGTTAA ACCTTTCACC CAGGGTAGT GCAAGTCAAC CGTCACCTAG
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S R W L P R T F G Q
 TGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGAG TCTGCACTT GAAGATTGG CTAGTACTA CTGTCAACAG TCGGTGGG TTCTCGTAC GTTCGGCCAA
 ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTGTG ACAGGTGGA CTCTAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC ACGGCAACCG AAGGAGCATG CAAGCCGGTT
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:248)
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO:249)
 CCCTGGTTC ACCTTAGTT TGCC (SEQ ID NO:250)

Monómero del dAb pareja en TAR1-27d39 (7U ligador)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I R K M L V
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCATCTCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC ATCACTTACC GGGCAAGTCA GACATTATG AAGATTATG
 CTGTAGGTCT ACTGGGTGAG AGGTAGGAGG GACAGAGTA GACATCTCT GGCACAGTGG TAGTCAACGG CCGTTCAGT CTGTAATAC TTCTAATC

FIGURA 25G

W Y Q Q K P G K A P K L L I Y R A S Y L Q S G V P S R F S G S G S
 TTGGTACCA GCAGAACCA GGGAGCCCT GATCTATCGG GATCTCTATT TGCAGATGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCGTGCATC
 AAACCATGGT CGTCTTGGT CCCTTTCGGG GATTCAGCA CTAGATACCC CCGTAGGATAA AGTTTCACCC CCAGGTAGT GCAAGTACAC CGTCACCTAG
 G T D F T L T I S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A F R R P R T F G Q
 TGGACAGAT TTCACCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTG CTAGTACTA CTGCTACAG GCCTTTCCGC GGCCTAGGAC GTTCGGCCAA
 ACCCTGCTA AAGTGAGGT GGTAGTCGTC AGAGTTGGA CTCTAAAC GATGCATGAT GACATGTC CCGAAGCCG CCGATCTCTG CAAGCCCGTT
 G T K V E I K R (SEQ ID NO:251)
 GGGACCAAGG TGAATCAAC ACGG (SEQ ID NO:252)
 CCTGGTTC ACCTTAGTT TGCC (SEQ ID NO:253)

TAR2 dAb Secuencia de aminoácidos y ADN (*indica la presencia de un codón de terminación ámbar) la homología de secuencia entre TAR2h-5 y los segundos dAb únicos es de 83,5%

TAR2h-5

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F D L Y N M
 GAGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGTC CTCTGCTCTC TCCTGTGCG CCGCGGAT CACTTTGAT CTTTATATA
 CTCCAGTGG ACACCTCAG ACCCTCTCG AACCATGTGG GACCCCTCG GAGCGAGAG AGGACAGTC GAGGCTTAA GTGGAACTA GAAATATAT
 F W V R Q A P G K G L E W V S F I S Q T G R L T W Y A D S V K G R
 TGTTTGGGT CGCCAGGCT CCAGGAGG GTCTAGAGTG GGTCTATT ATTAGTCAGA CTGGTAGGCT TACATGGTAC GCGACTCCG TGAAGGCGG
 ACRAAACCA GCGGTCCGA GGTCTCTCC CAGATCTCAC CCGAGTAA TANTCATCT GACCATCGA ATGATCCATG CCGTCTGAGC ACTTCCCGC
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K T L
 GTTCCATC TCCCGGACA ATTCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTGGG TGGCGAGGAC ACOCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGCGCTG
 CAGTGTAG AGGGGCTGT TAAGTCTCT GTGGACATA GAGCTTACT TGTCGAGC AGGCTCTCG TGGCGGCTA TANTGACAG CTTTGGGAC
 E D F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:254)
 GAGGATTTG ACTACTGGG CCGAGGAC CTGGTACCG TCTCG (SEQ ID NO:255)
 CTCTAAAC TGATGACCC GGTCCCTTGG GACCGTGGC AGAGC (SEQ ID NO:256)

Monómero del dAb pareja TAR2h-5d1 (3U ligador)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F P V Y M M
 GAGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGTC CTCTGCTCTC TCCTGTGCG CCGCGGAT CACTTTCCG GTTATATGA
 CTCCAGTGG ACACCTCAG ACCCTCTCG AACCATGTGG GACCCCTCG GAGCGAGAG AGGACAGTC GAGGCTTAA GTGGAAAGC CAAATATACT
 G W V R Q A P G K G L E W V S S I D A L G G R T G Y A D S V K G R
 TGGTGGGT CGCCAGGCT CCAGGAGG GTCTAGAGTG GGTCTATCG ATTGATGCTC TTGGTGGG GACAGGTTAC GCGACTCCG TGAAGGCGG
 ACCCAACCA GCGGTCCGA GGTCTCTCC CAGATCTCAC CAGATGAGC TAACATCAG AACCACTCC CTGTCCAATG CCGTCTGAGC ACTTCCCGC
 P T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K T M
 GTTCAACATC TCCCGGACA ATTCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTGGG TGGCGAGGAC ACCCGGAT ATTACTGTGC GAAACTATG
 CAGTGTAG AGGGGCTGT TAAGTCTCT GTGGACATA GAGCTTACT TGTCGAGC AGGCTCTCG TGGCGGCTA TANTGACAG CTTTGGATAC
 S N K T H T F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:257)
 TGAATAGA CCGATAGCT TGAAGTCTG GCGGAGGA CCGTCTCAG CGTCTCG (SEQ ID NO:258)
 AGCTTATCT GGTATGCAA ACTGATGACC CCGTCTCTT GCGACAGTG GCAGAGC (SEQ ID NO:259)

FIGURA 25H

Monómero del dAb pareja en TAR2b-5d2 (3U ligador)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F V A Y N M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGTC TCCTGTGCG CTTCCGGATT CACCTTTAG GGTATATGA
 CTCACGTCG ACACCTCAG ACCCCCTCG AACCATGCG GACCCCCAG GAGGCGCTAA GTGGAACAC CGATATATAT
 T W V R Q A P G K G L E W V S S I N T F G N * T R Y A D S V K G R
 TGACTTGGT CCGCCAGCT CCAGGAGG GTCTAGAGT GTCTCAAGT ATTATCTT TTGTTATTA GACAAGTAC GCAGACTCG TGAAGGGCG
 ACTGAACCA GCGGTCCGA GTTCCCTCC CAGATCTAC CAGATCTCA TAATATGA AACCATTA CTGTTCATG CGTCTGAGC ACITCCCGG
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G S
 GTTACCATC TCCCGGACA ATTCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTCG TGCGGAGC AGGCTCTG TGGGCCATA TAATGACAG CTTTCCATCA
 CAGTGGTAG AGGCGCTGT TAAGTTCT GTGCGACATA GAGCTTACT TGTCGAGC AGGCTCTG TGGGCCATA TAATGACAG CTTTCCATCA
 R P F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:260)
 AGGCTTTG ACTACTGGG CCAGGGAAC CTGGTACCG TCTCG (SEQ ID NO:261)
 TCCGAAAC TGATGACCC GTTCCCTGG GACCATGGC AGAGC (SEQ ID NO:262)

Monómero del dAb pareja en TAR2b-5d3 (3U ligador)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F * G Y R M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGTC CTGGGCTC TCCTGTGCG CTTCCGGATT CACCTTTAG GGTATATGA
 CTCACGTCG ACACCTCAG ACCCCCTCG AACCATGCG GACCCCCAG GAGGCGCTAA GTGGAACAC CCGATATAT
 G W V R Q A P G K G L E W V S S I T R T G G T T Q Y A D S V K G R
 TGGTGGT CCGCCAGCT CCAGGAGG GTCTAGAGT GTCTCAAGT ATTACGCTA CTGGGGGAC GACAATAC GCAGACTCG TGAAGGGCG
 ACCCAACCA GCGGTCCGA GTTCCCTCC CAGATCTAC CAGATCTAC TAATGGCT GACCACTG CTGTGTATG CGTCTGAGC ACITCCCGG
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K P A
 GTTACCATC TCCCGGACA ATTCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTCG TGCGGAGC ACCGCGTAT ATTACGTG GAAAGTAGT
 CAGTGGTAG AGGCGCTGT TAAGTTCT GTGCGACATA GAGCTTACT TGTCGAGC AGGCTCTG TGGGCCATA TAATGACAG CTTTCCCGG
 K L V G V G F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:263)
 AGCTTGTG GGTGGGT TGAATGAG CCGCAGGA CCTGTGAC CGTCTG (SEQ ID NO:264)
 TTGAAACAC CCAACCCAA ACTGATGAC CCGTCCCTT GGGACCATG GCAGAGC (SEQ ID NO:265)

Monómero del dAb pareja en TAR2b-5d4 (3U ligador)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F R K Y * M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGTC CTGGGCTC TCCTGTGCG CTTCCGGATT CACCTTTAG GGTATATGA
 CTCACGTCG ACACCTCAG ACCCCCTCG AACCATGCG GACCCCCAG GAGGCGCTAA GTGGAACAC CCGATATATCT
 G W V R Q A P G K G L E W V S S I G A K G Q S T D Y A D S V K G R
 TGGTGGT CCGCCAGCT CCAGGAGG GTCTAGAGT GTCTCAAGT ATTACGCTA CTGGGGGAC GACAATAC GCAGACTCG TGAAGGGCG
 ACCCAACCA GCGGTCCGA GTTCCCTCC CAGATCTAC CAGATCTAC TAATGGCT TACCACTG TCCAGTAC ATGTCTATG CGTCTGAGC ACITCCCGG
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K K K
 GTTACCATC TCCCGGACA ATTCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTCG TGCGGAGC ACCGCGTAT ATTACGTG GAAAGTAG
 CAGTGGTAG AGGCGCTGT TAAGTTCT GTGCGACATA GAGCTTACT TGTCGAGC AGGCTCTG TGGGCCATA TAATGACAG CTTTCTCTC
 R G E N Y F F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:266)
 AGGGGGAGA ATTATTTTT TGAATGAG GGCAGGGA CCTGTGAC CGTCTG (SEQ ID NO:267)
 TCCCCCTCT TAATAAARA ACTGATGAC CCGTCCCTT GGGACCATG GCAGAGC (SEQ ID NO:268)

FIGURA 251

Monómero del dAb pareja en TAR2h-5d5 (3U ligador)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F R R Y S M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGTC CTGGGTC TCCTGTGTC CCTCGGNTT CACCTTTCG GGTATAGTA
 CTCAGCTG ACACCTCAG ACCCTTCG AACCATGTG GACCCCCAG GAGCCCTTA AGACACCTC GAGGCTTA TGGAAAGC GCCATATCAT
 S W V R Q A P G K G L E W V S D I S R S G R Y T H Y A D S V K G R
 TGTGTGGT CGCCAGGT CAGGAGG GTCTAGAGT GGTCTAGAT ATTCTGTT CTGGTCGTA TACATATC GCAGCTCCG TGAAGGCCG
 ACACACCA GGGGTCCA GTCCCTTC CAGATCTAC CAGATCTA TAAAGCAA GACGCCAT ATGTGTATG CGTCTAGC ACTTCCCGC
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R I
 GTTACCATC TCCCGGACA ATTCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTGCG TCCGAGGAC ACCGGTAT ATTACTGTC GAACGTATT
 CAAGTGTAG AGGCGCTGT TAGGTTCTT GTGCGACT GACGTTACT TGTGCGCC ACAGCTCTCTG TGGCGCCATA TAATGACAG CTTTGCATAA
 D S S Q N G F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:269)
 GATCTCTC AGATGGGT TGACTACTG GGCAGGAA CCTGTCTAC CGTCTG (SEQ ID NO:270)
 CTNAGAGAG TCTTACCCA ACTGATGACC CGGTCCCTT GGGACCATG GCAGAGC (SEQ ID NO:271)

Monómero del dAb pareja en TAR2h-5d6 (3U ligador)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F * G Y K M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGTC CCTGTGTC CCTCGGNTT CACCTTTCG GGTATAGTA
 CTCAGCTG ACACCTCAG ACCCTTCG AACCATGTG GACCCCCAG GAGCCCTTA AGACACCTC GAGGCTTA TGGAAAGC CCCATATCT
 F W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S T Y Y A D S V K G R
 TGTGTGGT CGCCAGGT CAGGAGG GTCTAGAGT GGTCTAGAT ATTCTGTT CTGGTCGTA TACATATC GCAGCTCCG TGAAGGCCG
 ACACACCA GGGGTCCA GTCCCTTC CAGATCTAC CAGATCTA TAAAGCAA GACGCCAT ATGTGTATG CGTCTAGC ACTTCCCGC
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K Q K
 GTTACCATC TCCCGGACA ATTCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTGCG TCCGAGGAC ACCGGTAT ATTACTGTC GAACAGAG
 CAAGTGTAG AGGCGCTGT TAGGTTCTT GTGCGACT GACGTTACT TGTGCGCC ACAGCTCTCTG TGGCGCCATA TAATGACAG CTTTGTCTTC
 E N F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:272)
 GAGTCTTG ACTACTGGG CCAGGAGC CTGTCTACG TCTCG (SEQ ID NO:273)
 CTCITAAAC TGATGACCC GGTCCCTTG GACCATGTC AGAGC (SEQ ID NO:274)

Monómero del dAb pareja en TAR2h-5d7 (3U ligador)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F G D Y A M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGTC CCTGTGTC CCTCGGNTT CACCTTTCG GGTATAGTA
 CTCAGCTG ACACCTCAG ACCCTTCG AACCATGTG GACCCCCAG GAGCCCTTA AGACACCTC GAGGCTTA TGGAAAGC CTAATAGAT
 W W V R Q A P G K G L E W V S V I S S N G S T F Y A D S V K G R
 TGTGTGGT CGCCAGGT CAGGAGG GTCTAGAGT GGTCTAGAT ATTCTGTT CTGGTCGTA TACATATC GCAGCTCCG TGAAGGCCG
 ACACACCA GGGGTCCA GTCCCTTC CAGATCTAC CAGATCTA TAAAGCAA GACGCCAT ATGTGTATG CGTCTAGC ACTTCCCGC
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R V
 GTTACCATC TCCCGGACA ATTCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTGCG TCCGAGGAC ACCGGTAT ATTACTGTC GAACGTATT
 CAAGTGTAG AGGCGCTGT TAGGTTCTT GTGCGACT GACGTTACT TGTGCGCC ACAGCTCTCTG TGGCGCCATA TAATGACAG CTTTGCATAA
 R K R T P E F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:275)
 GATCTCTC AGATGGGT TGACTACTG GGCAGGAA CCTGTCTAC CGTCTG (SEQ ID NO:276)
 CTCITCTCT GAGGACTCA ACTGATGACC CGGTCCCTT GGGACCATG GCAGAGC (SEQ ID NO:277)

FIGURA 25J

Monómero del dAb pareja en TAR2h-5d8 (3U ligador)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F R R Y K M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGTACAGC CTGGGGGTC CCTGGTCTC TCCTGTGCG AGGTATTAAGA
 CTCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCG AACCATGTCG GACCCCCAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAATCC TCCATATCT
 G W V R Q A P G K G L E W V S A I G R N G T K T N Y A D S V K G R
 TGGTGGGT CCGCAGGCT CCAGGAGG GTCTAGAGT GGTCTAGC AGTGGAGGA ATGGTACGAA GACAAATAC GCAGACTCG TGAAGGCCG
 ACCCAACCA GGGGTCCGA GTTCCCTTC CAGATCTCAG CCAGATGCG TAACCTCTT TACCATGCTT CTGTTAAG CGTCTAGGC ACTTCCGGC
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K I Y
 GTTCACATC TCCCGGACA ATTCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTCG TGCCGAGGAC ACCGGGTAT ATTACTGTG GAAATTTAT
 CAAGTGTAG AGGGCTGT TAGGTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTGCGAGC ACGCTCTCG TGCGGCCATA TAATGACAG CTTTAAATA
 T G K P A A F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:278)
 ACGGGNAGC CTGCTGCTT TGACTACTG GGCAGGAA CCTGTCTAC CGTCTCG (SEQ ID NO:279)
 TGCCCTTTC GACGACGCA ACTGATGACC CCGTCCCTT GGCACAGT GCGAGC (SEQ ID NO:280)

Monómero del dAb pareja en TAR2h-5d9 (3U ligador)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K K Y * M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGTACAGC CTGGGGGTC CCTGGTCTC TCCTGTGCG AGGTATTAAGA
 CTCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCG AACCATGTCG GACCCCCAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAATCC TCCATATCT
 S W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G R
 TGTCTGGGT CCGCAGGCT CCAGGAGG GTCTAGAGT GGTCTCAGT ATTAGTGA GTGGTGTAG CACATCTAC GCAGACTCG TGAAGGCCG
 ACCCAACCA GGGGTCCGA GTTCCCTTC CAGATCTCAG CCAGATGCG TAATCACCAT CACCACTC GTGTATGATG CGTCTAGGC ACTTCCGGC
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K M L
 GTTCACATC TCCCGGACA ATTCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTCG TGCCGAGGAC ACCGGGTAT ATTACTGTG GAAATTTAT
 CAAGTGTAG AGGGCTGT TAGGTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTGCGAGC ACGCTCTCG TGCGGCCATA TAATGACAG CTTTAAATA
 R T K N K V F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:281)
 AGGACTAGA ATAGTGT TGACTACTG GGCAGGAA CCTGTCTAC CGTCTCG (SEQ ID NO:282)
 TCCTATCT TATCCACAA ACTGATGACC CCGTCCCTT GGCACAGT GCGAGC (SEQ ID NO:283)

Monómero del dAb pareja en TAR2h-5d10 (5U ligador)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F R R Y K M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGTACAGC CTGGGGGTC CCTGGTCTC TCCTGTGCG AGGTATTAAGA
 CTCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCG AACCATGTCG GACCCCCAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAATCC TCCATATCT
 G W V R Q A P G K G L E W V S A I G R N G T K T N Y A D S V K G R
 TGGTGGGT CCGCAGGCT CCAGGAGG GTCTAGAGT GGTCTCAGC AGTGGAGGA ATGGTACGAA GACAAATAC GCAGACTCG TGAAGGCCG
 ACCCAACCA GGGGTCCGA GTTCCCTTC CAGATCTCAG CCAGATGCG TAACCTCTT TACCATGCTT CTGTTAAG CGTCTAGGC ACTTCCGGC
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K I Y
 GTTCACATC TCCCGGACA ATTCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTCG TGCCGAGGAC ACCGGGTAT ATTACTGTG GAAATTTAT
 CAAGTGTAG AGGGCTGT TAGGTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTGCGAGC ACGCTCTCG TGCGGCCATA TAATGACAG CTTTAAATA
 T G K P A A F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:284)
 ACGGGNAGC CTGCTGCTT TGACTACTG GGCAGGAA CCTGTCTAC CGTCTCG (SEQ ID NO:285)
 TGCCCTTTC GACGACGCA ACTGATGACC CCGTCCCTT GGCACAGT GCGAGC (SEQ ID NO:286)

FIGURA 25K

Monómero del dAb pareja en TAR2h-5d8 (5U ligador)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F * S Y R M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGTC CTGGGGGTC CCTCGGANTT CACCTTTTAC AGTTATGGGA
 CTCACGTCG ACACCTCAG ACCCTCTCG AACCATGTG GACCCCTCG GACCCCTCG GAGGCTTAA GTGGAAATC TCATAGCCT
 G W V R Q A P G K G L E W V S S I S S R G R H T S Y A D S V K G R
 TGGTTGGGT CCGCAGGCT CCGGAGG GTCTAGATG GGTCTMAGT ATTTCGTGA GGGTAGCA TACATCTAC GCAGACTCG TGAAGGCGG
 ACCCAACCA GCGGTCGA GGTCCCTCC CAGATCTCAC CAGAGTTCA TAACAGCT CCCATCCT ATGTAGATG GGTCTGAGC ACTTCCGGC
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R V
 GTTCACATC TCCCGGACA ATCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTGG TGCCGAGAC ACCGGGTAT ATTACTGTG GAAGAAGTT
 CAAGTGTAG AGGGGCTGT TAGGTCTT GTGGACATA GAGTTTACT TGTGACGC ACAGCTCTG TGCGCCATA TAATGACAG CTTTCCCAA
 P G R G R S F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:287)
 CCGGTGGG GGGTCTTT TGACTACTG GCGCAGGAA CCTGTGTC CGTCTG (SEQ ID NO:288)
 GCGCCAGCC CCGCAAGAA ACTGATGAC CCGTCCCTT GCGACAGT GCGAGC (SEQ ID NO:289)

Monómero del dAb pareja en TAR2h-5d12 (5U ligador)

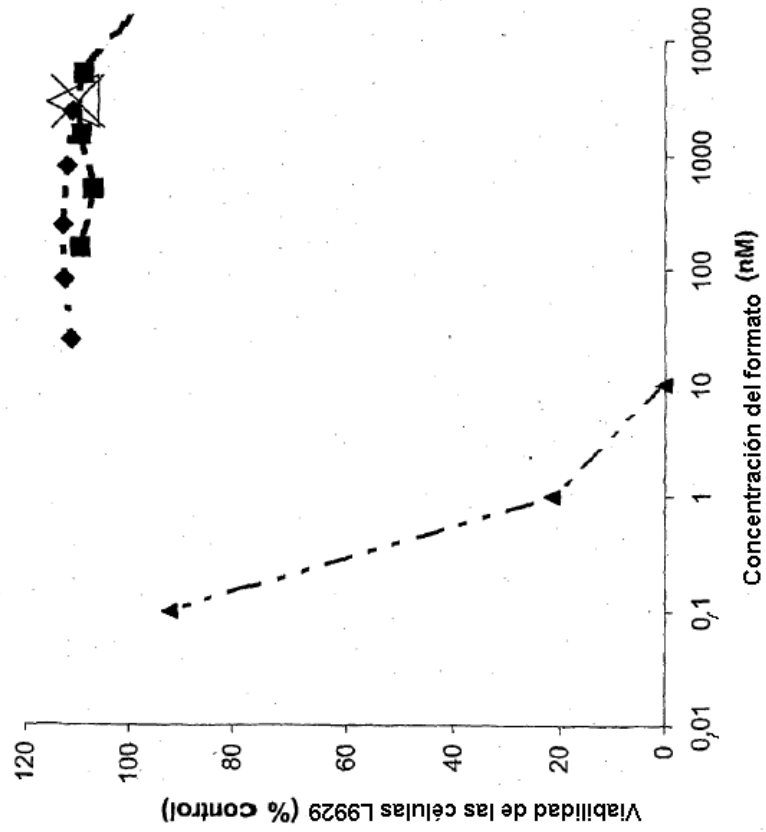
E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F P F R R Y R M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGTC CTGGGGGTC CCTCGGANTT CACCTTTTCT CCGTATGGGA
 CTCACGTCG ACACCTCAG ACCCTCTCG AACCATGTG GACCCCTCG GACCCCTCG GAGGCTTAA GTGGAAATC TCATAGCCT
 R W V R Q A P G K G L E W V S S I S S R G R H T S Y A D S V K G R
 TGGTTGGGT CCGCAGGCT CCGGAGG GTCTAGATG GGTCTMAGT ATTTCGTGA GGGTAGCA TACATCTAC GCAGACTCG TGAAGGCGG
 ACTCCACCA GCGGTCGA GGTCCCTCC CAGATCTCAC CAGAGTTCA TAACAGCT CCCATCCT ATGTAGATG GGTCTGAGC ACTTCCGGC
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G E
 GTTCACATC TCCCGGACA ATCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTGG TGCCGAGAC ACCGGGTAT ATTACTGTG GAAGAAGTT
 CAAGTGTAG AGGGGCTGT TAGGTCTT GTGGACATA GAGTTTACT TGTGACGC ACAGCTCTG TGCGCCATA TAATGACAG CTTTCCACTC
 G G A S S A F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:290)
 GCGGGGCGA GTTCTGGT TGACTACTG GCGCAGGAA CCTGTGTC CGTCTG (SEQ ID NO:291)
 CCCCCCGCT CAAGACGAA ACTGATGAC CCGTCCCTT GCGACAGT GCGAGC (SEQ ID NO:292)

Monómero del dAb pareja en TAR2h-5d13 (5U ligador)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F * R Y G M
 GAGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGTC CTGGGGGTC CCTCGGANTT CACCTTTTAC CCGTATGGGA
 CTCACGTCG ACACCTCAG ACCCTCTCG AACCATGTG GACCCCTCG GACCCCTCG GAGGCTTAA GTGGAAATC TCATAGCCT
 V W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G R
 TGGTTGGGT CCGCAGGCT CCGGAGG GTCTAGATG GGTCTMAGT ATTTCGTGA GGGTAGCA TACATCTAC GCAGACTCG TGAAGGCGG
 ACCCAACCA GCGGTCGA GGTCCCTCC CAGATCTCAC CAGAGTTCA TAACAGCT CCCATCCT ATGTAGATG GGTCTGAGC ACTTCCGGC
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R H
 GTTCACATC TCCCGGACA ATCCAGAA CAGCTGTAT CTGCAATGA ACAGCTGG TGCCGAGAC ACCGGGTAT ATTACTGTG GAAGAAGTT
 CAAGTGTAG AGGGGCTGT TAGGTCTT GTGGACATA GAGTTTACT TGTGACGC ACAGCTCTG TGCGCCATA TAATGACAG CTTTCCCAA
 S S E A R Q F D Y W G Q G T L V T V S (SEQ ID NO:293)
 ACTTCTAGG CTAGGAGTT TGACTACTG GCGCAGGAA CCTGTGTC CGTCTG (SEQ ID NO:294)
 TCAGACTCC GATCGTCAA ACTGATGAC CCGTCCCTT GCGACAGT GCGAGC (SEQ ID NO:295)

FIGURA. 25L

Figura 26



TAR2h-131-8 (SEQ ID NO:433)

EVQLLES GGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFA~HETMV~WVRQAPGKGL~EWVS~~HIDRVGQD
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~L~PKRGPWFDY~~~RG
 QGTLVTVSS

TAR2h-131-24 (SEQ ID NO:434)

EVQLLES GGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFA~HETMV~WVRQAPGKGL~EWVS~~HIDRVGQD
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR~~~L~PKRGPWFDY~~~RG
 QGTLVTVSS

TAR2h-15-8 (SEQ ID NO:435)

EVRLLES GGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFG~KSTMT~WVRQAPGKGL~EWVS~~HISDDGNS
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~V~PILAPRNLFDY~~~WG
 QGTLVTVSS

TAR2h-15-8-1 (SEQ ID NO:436)

EVRLLES GGGGLVQPGGSLRLSCVASGFNFG~KSTMT~WVRQAPGKGL~EWVS~~HISDDGNS
 TYYADSVKG~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~V~PILAPRNLFDY
 ~~~WGQGTLVTVSS

TAR2h-15-8-2 (SEQ ID NO:437)

EVRLLES GGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFG~KGTMT~WVRQAPGKGL~EWVS~~HISDDGNS  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~V~PILAPRNLFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-185-23 (SEQ ID NO:438)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA~RYNMG~WVRQAPGKGL~EWVS~~LIDPSGGH  
 TYYAXSVKG~~RSTISRNN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGK~~~P~VFSWPAVEFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-154-10-5 (SEQ ID NO:439)

EVQLLES GGGGMVQPGGSLRLSCAAPGFTFE~HEGMV~WVRQAPGKGL~EWVS~~HIGEDGQS  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS~~~I~PKAGPSFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-14-2 (SEQ ID NO:440)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD~QYDMS~WVRRAPGKGL~EWVS~~LIDPSGGH  
 TYYADSVKG~~RFTISRNN TKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~P~VFSWPAVEFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-151-8 (SEQ ID NO:441)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD~YGNMF~WVRQAPGKGL~EWIS~~AISGSGGS  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~DMTTDSPPGFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-152-7 (SEQ ID NO:442)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA~KETMS~WVRQAPGKGL~EWVS~~WISPHGAH  
 TFYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~PRFSYYPVRSFDY~~~RG  
 QGTLVTVSS

FIGURA 27A

TAR2h-35-4 (SEQ ID NO:443)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD-AYNMF-WFRQAPGKGPEWVS--AIGPSGRE  
 TYYADSVKG--RFTITRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---RYPDFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-154-7 (SEQ ID NO:444)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-HEGMV-WVRQAPGKGLEWVS--HIGEDGQS  
 TYYADSVKG--RFTISRDNRSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAN---IPKAGPSFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-80 (SEQ ID NO:445)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFK-LYNMA-WVRQAPGKGLEWVS--FIAAAGPE  
 TYYADSVKG--RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---LGDISSIPQHPFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-81 (SEQ ID NO:446)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS-RENMH-WVRQAPGKGLEWVS--GIGPRGMP  
 TYYADSVKG--RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---GMNSHDGFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-82 (SEQ ID NO:447)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD-ASEMD-WVRQAPGKGLEWVS--AISPSGSA  
 TYYADSVKG--RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---RMLANSPLAFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-83 (SEQ ID NO:448)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS-AYNMA-WVRQAPGKGLEWVS--FIAQSGGH  
 TYYADSVKG--RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---FSHPDEEGTQMFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-84 (SEQ ID NO:449)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA-DYQMA-WVRQAPGKGLEWVS--RIDRGGFH  
 TYYADSVKG--RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---PSWHADQYFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-85 (SEQ ID NO:450)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFK-DYNMM-WVRQAPGKGLEWVS--AIATSGRE  
 TYYADSVKG--RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---FTFGGNQDFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-86 (SEQ ID NO:451)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA-KYNMY-WVRQAPGKGLEWVS--AISPKGQH  
 TYYADSVKG--RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAE---GMGSDAITFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-87 (SEQ ID NO:452)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS-AYNMA-WVRQAPGKGLEWVS--FIAQSGGH  
 TYYADSVKG--RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---FSHPDEEGTQMFDY---WG  
 QGTLVTVSS

FIGURA 27B

TAR2h-88 (SEQ ID NO:453)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-RYDMF-WVRQAPGKGLEWVS--GISPRGRE  
TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---DMINYHGTPSFDY---WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-89 (SEQ ID NO:454)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFX-NYNMV-WVRQAPGKGLEWVS--WISGAGHS  
TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---DVIDMAGKLN VFDY---WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-90 (SEQ ID NO:455)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFK-QYNMY-WVRQAPGKGLEWVS--FISPSGGE  
TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---DVIDMAGKLN VFDY---WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-91 (SEQ ID NO:456)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA-DYQMA-WVRQAPGKGLEWVS--RIDRGGFH  
TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---PSWHADQYFDY---WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-92 (SEQ ID NO:457)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFD-DVNMT-WVRQAPGKGLEWVS--AIGPSGTE  
TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---HSKTGSAMFDY---WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-93 (SEQ ID NO:458)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG-NGNMV-WVRQAPGKGLEWVS--HIDEYGTN  
TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---PRNDRPGFDY---WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-94 (SEQ ID NO:459)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS-RENMH-WVRQAPGKGLEWVS--GIGPRGMP  
TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---GMNSHDGFDY---WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-95 (SEQ ID NO:460)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFK-GSNMG-WVRQAPGKGLEWVS--LIDGRGQH  
TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---PSVREFDY---RG  
QGTLVTVSS

TAR2h-96 (SEQ ID NO:461)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS-RENMH-WVRQAPGKGLEWVS--GIGPRGMP  
TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---RMLANSPLAFDY---WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-97 (SEQ ID NO:462)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFS-ESTMN-WVRQAPGKGLEWVS--VITAQGGD  
TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---PDVLFDY---WG  
QGTLVTVSS

FIGURA 27C

TAR2h-99 (SEQ ID NO:463)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-EYNML-WVRQAPGKGLEWVS--GIGPSGRE  
 TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---GSITLFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-100 (SEQ ID NO:464)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS-GYNMY-WVRQAPGKGLEWVS--AIDAYGTH  
 TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAE---GLQTS DHGERISFDY---W  
 QGTLVTVSS

TAR2h-101 (SEQ ID NO:465)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD-QYDMS-WVRQAPGKGLEWVS--LIDPSGGH  
 TYYADSVKG--RFTISRNN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---PVFSDWPAVEFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-102 (SEQ ID NO:466)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD-QYDMS-WVRQAPGKGLEWVS--LIDPSGGH  
 TYYADSVKG--RFTISRNN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---PVFSDWPAVEFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-103 (SEQ ID NO:467)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT-RYSMG-WVRQAPGKGLEWVS--MIDVPGLH  
 TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---ISQFGSNAFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-104 (SEQ ID NO:468)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE-WYWMG-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGS  
 TYYAXSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAK---VKLGXPNFGY---RG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-105 (SEQ ID NO:469)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT-RYSMG-WVRQAPGKGLEWVS--FIDPPSVH  
 TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---ISQFGSNAFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-106 (SEQ ID NO:470)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT-RYSMG-WVRQAPGKGLEWVS--MIDVGGS  
 TYYAXSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---ISQFGSNAFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-107 (SEQ ID NO:471)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT-RYSMG-WVRQAPGKGLEWVS--MIDTGGVH  
 TYYAXSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---ISQFGSNAFDY---WG  
 QGTLVTVSS

FIGURA 27D

TAR2h-108 (SEQ ID NO:472)  
 EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFT~RYSMG~WVRQAPGKGLEWVS~~MIDVPGRH  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~ISQFGSNAFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-109 (SEQ ID NO:473)  
 EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFT~RYSMG~WVRQAPGKGLEWVS~~MIAHAGPE  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~ISQFGSNAFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-110 (SEQ ID NO:474)  
 EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFT~RYSMG~WVRQAPGKGLEWVS~~MIDTRGVR  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~ISQFGSNAFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-111 (SEQ ID NO:475)  
 EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFT~RYSMG~WVRQAPGKGLEWVS~~MIDVPGNH  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~ISQFGSNAFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-112 (SEQ ID NO:476)  
 EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFT~RYSMG~WVRQAPGKGLEWVS~~MIDVGGRH  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~ISQFGPNAFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-113 (SEQ ID NO:477)  
 EVQLLES GGGSVQP GGSRLRLSCAASGFTFT~RYSMG~WVRQAPGKGLEWVS~~RIDSYGRG  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~VRSPYTFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-114 (SEQ ID NO:478)  
 EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFS~GYNMG~WVRQAPGKGLEWVS~~TISTQGYH  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~AFTSDFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-115 (SEQ ID NO:479)  
 EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFS~GYNMY~WVRQAPGKGLEWVS~~GISGPGLE  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQ~~~GMSKTSTFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-116 (SEQ ID NO:480)  
 EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFT~EYME~WVRQAPGKGLEWVS~~SIDPDGSL  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~YPREKFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-117 (SEQ ID NO:481)  
 EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFD~KYQMG~WVRQAPGKGLEWVS~~FIDSNHH  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAQ~~~LSVQGSNLFY~~~WG  
 QGTLVTVSS

FIGURA 27E

TAR2h-118 (SEQ ID NO:482)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFV~HYTMG~WVRQAPGKGLEWVS~~WIHSDGVH  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~FTWGEKKTFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-119 (SEQ ID NO:483)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFM~GYDMH~WVRQAPGKGLEWVS~~GISAKGTE  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~GSSGSDGLFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-120 (SEQ ID NO:484)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFP~VYNMA~WVRQAPGKGLEWVS~~FIAGNGQQ  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~FASKVSPMSLTDFDY~~~W  
QGTLVTVSS

TAR2h-121 (SEQ ID NO:485)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFV~QYNMH~WVRQAPGKGLEWVS~~GISSGGMR  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~GIRDSTLPRGTLFDY~~~W  
QGTLVTVSS

TAR2h-122 (SEQ ID NO:486)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE~TYSMH~WVRQAPGKGLEWVS~~SISLPGSR  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~HSKSSHRQSFY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-123 (SEQ ID NO:487)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN~QYDMH~WVRQAPGKGLEWVS~~GISFSGYE  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~GRGPAPMRS�FDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-124 (SEQ ID NO:488)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFV~DYPMV~WVRQAPGKGLEWVS~~HITSMGES  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNMLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~LPTHFPIRFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-125 (SEQ ID NO:489)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFK~QYNMY~WVRQAPGKGLEWVS~~FISPSGGE  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~SIKPFY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-126 (SEQ ID NO:490)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS~MYSMA~WVRQAPGKGLEWVS~~FIDFDGLH  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~FSTSTMALFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-127 (SEQ ID NO:491)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFP~EYNMH~WVRQAPGKGLEWVS~~AIGTAGGS  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNMLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~GYRPRTGSMLFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

FIGURA 27F

TAR2h-128 (SEQ ID NO:492)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA~KYNMY~WVRQAPGKGLEWVS~~AISPKGQQ  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAE~~~GMGSDAITFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-129 (SEQ ID NO:493)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA~DYDMA~WVRQAPGKGLEWVS~~FIDRKGHH  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~TTDIQRLNSAFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-130 (SEQ ID NO:494)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG~NGVMA~WVRQAPGKGLEWVS~~HINENGGA  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~PSIESPIFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-131 (SEQ ID NO:495)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA~HEPMV~WVRQAPGKGLEWVS~~HIDRVGQD  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~LPKRGPRFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-132 (SEQ ID NO:496)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFE~ESVMG~WVRQAPGKGLEWVS~~AISPGGSE  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~RTGPPGSTVFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-133 (SEQ ID NO:497)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG~DEPMH~WVRQAPGKGLEWVS~~GIGKEGQP  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~LGPPFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-151 (SEQ ID NO:498)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD~YGNMF~WVRQAPGKGLEWVS~~AISGSGGS  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~DMTTDSPPGFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-152 (SEQ ID NO:499)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA~KETMS~WVRQAPGKGLEWVS~~WISPHGAL  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~PRFSYYPRVSFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-153 (SEQ ID NO:500)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG~NGNMV~WVRQAPGKGLEWVS~~HIDEYGTN  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~PRNDRPGFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

TAR2h-154 (SEQ ID NO:501)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG~NGNMV~WVRQAPGKGLEWVS~~HIDXYGTN  
TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~PRNDRPGFDY~~~WG  
QGTLVTVSS

FIGURA 27G

TAR2h-159 (SEQ ID NO:502)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFA-GQDMR-WVRQAPGKGLEWVS--SIPSSGFN  
 TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---RAKDRSVSQMPYFDY---W  
 QGTLVTVSS

TAR2h-165 (SEQ ID NO:503)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFM-RPDMV-WVRQAPGKGLEWVS--TIKDWGDQ  
 TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAK---ADSRAQLDFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-166 (SEQ ID NO:504)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS-SYAMS-WVRQAPGKGLEWVS--AISGSGGS  
 TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---PYFLFRATSFYDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-168 (SEQ ID NO:505)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFH-DDDMV-WVRQAPGKGLEWVS--SIPGNGYV  
 TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---RPDPTSVFFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-171 (SEQ ID NO:506)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFG-DDWMT-WVRQAPGKGLEWVS--GIAAYGIS  
 TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAE---SGKVFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-172 (SEQ ID NO:507)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFV-ERPMD-WVRQAPGKGLEWVS--LIGADGLS  
 TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---LFRPGLLWFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-173 (SEQ ID NO:508)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFT-GQDMQ-WVRQAPGKGLEWVS--GINADGMA  
 TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---TSPTMRSFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-174 (SEQ ID NO:509)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFG-EEYMQ-WVRQAPGKGLEWVS--LIPHTGNP  
 TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---LANSLLFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-176 (SEQ ID NO:510)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFH-RCKMG-WVRQAPGKGLEWVS--FIEYDGRD  
 TYYADSVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---ECTRPYGMFDY---WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-178 (SEQ ID NO:511)

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFN-RYSMG-WLRQAPGKGLEWVS--FIDKVGHH  
 TWYEDPVKG--RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK---ISQFGPNAFDY---WG  
 QGTQVTVSS

FIGURA 27H

TAR2h-201 (SEQ ID NO:512)  
 EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFT~RYS MG~WVRQAPGKGLEWVS~~MIAHAGPE  
 RYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~ISXFGSNAFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-202 (SEQ ID NO:513)  
 EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFT~RYNMG~WVRQAPGKGLEWVS~~FIDPPSVH  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAN~~~ISQFGSNAFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-203 (SEQ ID NO:514)  
 EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFT~RYS MG~WVRQAPGKGLEWVS~~FIDPPSVH  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYXAE~~~ISQFGSNAFDY~~~WG  
 QGTLVTVSS

TAR2h-204 (SEQ ID NO:515)  
 EVQLFES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFT~RYS MG~WVRQAPGKGLEWVS~~MIAHAGPE  
 TYYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~ISQFGSNALDY~~~WG  
 RGTLVTVSS

TAR2h-185-25 (SEQ ID NO:516)  
 EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFA~RYNMG~WVRQAPGKGLEWVS~~LIDPSGGHT  
 YYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGK~~~PVFSDWPAVEFDY~~~W  
 GQGT VVT VSS

TAR2h-154-10 (SEQ ID NO:517)  
 EVQLLES GGGGMVQPGGSLRLS CAASGFTFE~HEGMV~WVRQAPGKGLEWVS~~HIGEDGQST  
 YYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAN~~~IPKAGPSFDY~~~WGQG  
 TLVTVSS

TAR2h-205 (SEQ ID NO:627)  
 EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFV~KYS MG~WVRQAPGKGLEWVS~~QISNTGGHT  
 YYADSVKG~~RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~~YTGRWEPFDY~~~WGQG  
 TLVTVSS

FIGURA 27I

TAR2h-131-8 (SEQ ID NO: 518)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGA.GGCTTGATACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCG~CATGAGACGATGGTG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CATATTGATCGTGTGGTCAGGAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTGACTAC~~~CGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-131-24 (SEQ ID NO: 519)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGA.GGCTTGATACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCG~CATGAGACGATGGTG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CATATTGATCGTGTGGTCAGGAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGT  
GCGCGC~~~CTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTGACTAC~~~CGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-15-8 (SEQ ID NO: 520)

GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGA.GGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGTAGCCTCCGGATTACCTTTGGT~AAGTCCACTATGACG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CATATTTGCGATGATGGTAATTCT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~GTTCCGATTCTGGCTCCTCGTAATCTTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-15-8-1 (SEQ ID NO: 521)

GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGA.GGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGTAGCCTCCGGATTCACTTTGGT~AAGTCCACTATGACG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CATATTTGCGATGATGGTAATTCT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~GTTCCGATTCTGGCTCCTCGTAATCTTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-15-8-2 (SEQ ID NO: 522)

GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGA.GGCTTGGTACAGCCTGGGGGATCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGTAGCCTCCGGATTACCTTTGGT~AAGGGGACTATGACG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CATATTTGCGATGATGGTAATTCT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~GTTCCGATTCTGGCTCCTCGTAATCTTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-185-23 (SEQ ID NO: 523)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGA.GGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCG~CGGTATAATATGGGT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CTGATTGATCCGAGCGGTGGTCAT  
ACATACTACGCANACTCCGTGAAGGGC~~CGGTCCACCATCTCCCGCAACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GGGAAA~~~CCGGTTTTTCTGATTGGCCTGCGGTGGAGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 28A

TAR2h-154-10-5 (SEQ ID NO:524)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCATGGTACAGCCTGGGGGGTCACTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCCCCGGATTACCTTTGAG~CATGAGGGGATGGTG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CATATTGGTGAGGATGGTCAGTCT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCGCGACAATCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGTCC~~~ATTCCGAAGGCGGGGCCTTCGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-14-2 (SEQ ID NO:525)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTGAT~CAGTATGATATGTG~TGGGTCCGC  
CGGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CTGATTGATCCGAGCGGTGGTCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCGCAACAATACCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CCGGTTTTTTCTGATTGGCCTGCGGTGGAGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-151-8 (SEQ ID NO:526)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTGAT~TATGGGAATATGTTT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGATCTCA~~GCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGC  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCGCGACAATCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~GATATGACGACGGATTGCGCTCCTGGGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-152-7 (SEQ ID NO:527)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCCTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTGCG~AAGGAGACGATGAGT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TGGATTAGTCCTCATGGTGCTCAT  
ACATTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~AGGTTACCATCTCCGCGACAATCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGC  
GCGAAA~~~CCTCGGTTTTCTGATTATCTCGGGTTTCATTTGACTAC~~~CGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACAGTCTCGAGC

TAR2h-35-4 (SEQ ID NO:528)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTGAT~GCTTATAATATGTTT~TGGTTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCCGGAGTGGGTCTCA~~GCTATTGGTCCGTCCGGTCCGGAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCACCCGCGACAATCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~AGGTATCCTGATTTTGACTAC~~~TGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC  
GAGC

TAR2h-154-7 (SEQ ID NO:529)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACCTTTGAG~CATGAGGGGATGGTG~TGGGTTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CATATTGGTGAGGATGGTCAGTCT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACTATCTCCGCGACAATCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAC~~~ATTCCGAAGGCGGGGCCTTCGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 28B

TAR2h-80 (SEQ ID NO:530)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAG~TTGTATAATATGGCG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGCTGCTGCTGGTCCCTGAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGC~CGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~TTGGGGGATATTAGTAGTATTCCCTCAGCATCCGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-81 (SEQ ID NO:531)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCG~CGGAGAATATGCAT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGAGTGGGTCTCA~~GGTATTGGGCCGAGGGGTATGCCG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGC~CGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~GGTATGAATTGCGATGATGGGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-82 (SEQ ID NO:532)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAT~GCGTCTGAGATGGAT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCGATTTGCGCTAGTGGTTCTGCT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGC~CGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CGTATGCTTGCGAATTCTCCTTTGGCTTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-83 (SEQ ID NO:533)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCT~GCGTATAATATGGCT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGCTCAGTCGGGTGGTCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGC~CGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~TTTAGTCATCCTGATGAGGAGGGTAC~GCAGATGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-84 (SEQ ID NO:534)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCG~GATTATCAGATGGCT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CGTATTGATCGTGGGGGTTTTCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGC~CGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CCGTCTTGGCATGCTGATCAGTATTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-85 (SEQ ID NO:535)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAG~GATTATAATATGATG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATTGCTACGAGTGGTAGGGAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGC~CGAGGATACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~TTTACTTTTGGGGGGAATCAGGATTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 28C

TAR2h-86 (SEQ ID NO:536)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGCT-AAGTATAATATGTAT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCGATTAGTCCTAAGGGTCAGCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGGAA---GGGATGGGGTCGGATGCTATTACTTTTGACTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-87 (SEQ ID NO:537)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCT-GCGTATAATATGGCT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--TTTATTGCTCAGTCGGGTGGTCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---TTTAGTCATCCTGATGAGGAGGGTACGCAGATGTTTGACTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-88 (SEQ ID NO:538)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG-AGGTATGATATGTTT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GGTATTTCTCCTAGGGGTAGGGAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---GATATGATTAATTATCATGGTACTCCTTCGTTTGACTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-89 (SEQ ID NO:539)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCN-AATTATAATATGGTT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA--TGGATTAGTGGGGCAGGTCATTCTG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---GATGTGGATATGGCGGGTAAGCTTAATGTTTTTGACTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-90 (SEQ ID NO:540)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAG-CAGTATAATATGTAT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--TTTATTAGTCCGTCGGGTGGTGAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---GATGTGGATATGGCGGGTAAGCTTAATGTTTTTGACTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-91 (SEQ ID NO:541)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCG-GATTATCAGATGGCT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--CGTATTGATCGTGGGGGTTTTCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---CCGTCTTGGCATGCTGATCAGTATTTTGACTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 28D

TAR2h-92 (SEQ ID NO:542)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
ACCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAT~GATGTGAATATGACT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCGATTGGTCTTTCGGGTACTGAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGTGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CATAGTAAGACTGGTAGTGCTATGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-93 (SEQ ID NO:543)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGT~AATGGTAATATGGTT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CATATTGATGAGTATGGTACGAAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CCTCGTAATGATCGGCCTGGGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-94 (SEQ ID NO:544)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCG~CGGGAGAATATGCAT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA~~GGTATTGGGCCGAGGGGTATGCCG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~GGTATGAATTTCGATGATGGGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-95 (SEQ ID NO:545)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAG~GGGAGTAATATGGGT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CTGATTGATGGGCGTGGTCAGCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CCTAGTGTGAGGGAGTTTGACTAC~~~AGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-96 (SEQ ID NO:546)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCG~CGGGAGAATATGCAT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA~~GGTATTGGGCCGAGGGGTATGCCG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CGTATGCTTGCGAATTCTCCTTTGGCTTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-97 (SEQ ID NO:547)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTACAGCCTCCGGATTACCTTTTCG~GAGAGTACTATGAAT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GTTATTACGGCGCAGGGTGGGGAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CCTGATGTTTTGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 28E

TAR2h-99 (SEQ ID NO:548)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG~GAGTATAATATGTTG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA~~GGGATTGGGCCTTCGGGTAGGGAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~GGTTCTATTACGCTGTTTGAAGTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-100 (SEQ ID NO:549)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAGT~GGTTATAATATGTAT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCGATTGATGCGTATGGTACGCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGGAA~~~GGGTTGCAGACGTCTGATCATGGTGAGAGGATTCTTTTGAAGTAC~~~TGG  
GGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-101 (SEQ ID NO:550)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAT~CAGTATGATATGTGCG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CTGATTGATCCGAGCGGTGGTCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCAACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CCGGTTTTTTCTGATTGGCCTGCGGTGGAGTTTGAAGTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-102 (SEQ ID NO:551)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAT~CAGTATGATATGTGCG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CTGATTGATCCGAGCGGTGGTCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCAACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CCGGTTTTTTCTGATTGGCCTGCGGTGGAGTTTGAAGTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-103 (SEQ ID NO:552)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACT~AGGTATAGTATGGGG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~ATGATTGATGTTCTTGGTCTGCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~ATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTGAAGTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 28F

TAR2h-104 (SEQ ID NO:553)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAG-TGGTATTGGATGGGT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCTATCAGTGGTAGTGGTGGTAGC  
ACATACTACGCANACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---GTTAAGTTGGGGGGGGGNCCTAATTTTGGCTAC---CGGGGC  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-105 (SEQ ID NO:554)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACT-AGGTATAGTATGGGG-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--TTTATTGATCCTCCGAGTGTTTCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---ATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTACTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-106 (SEQ ID NO:555)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACT-AGGTATAGTATGGGG-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--ATGATTGATGTTGGTGGTTCTCAT  
ACATACTACGCANACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---ATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTACTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCAAGC

TAR2h-107 (SEQ ID NO:556)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACT-AGGTATAGTATGGGG-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--ATGATTGATACTGGGGGTGTTTCAT  
ACATACTACGCANACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---ATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTACTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-108 (SEQ ID NO:557)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACT-AGGTATAGTATGGGG-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--ATGATTGATGTTCCCTGGTCGTCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---ATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTACTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-109 (SEQ ID NO:558)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACT-AGGTATAGTATGGGG-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--ATGATTGCGCATGCTGGTCTCTGAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---ATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTACTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 28G

## TAR2h-110 (SEQ ID NO:559)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTACT-AGGTATAGTATGGGG-TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA--ATGATTGATACTCGGGGTGTTCGT  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA---ATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTGACTAC---TGGGGT  
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-111 (SEQ ID NO:560)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTACT-AGGTATAGTATGGGG-TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA--ATGATTGATGTGCCTGGTAATCAT  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA---ATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTGACTAC---TGGGGT  
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-112 (SEQ ID NO:561)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTACT-AGGTATAGTATGGGG-TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--ATGATTGATGTTGGTGGTGGGCAT  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA---ATTTCTCAGTTTGGGCCAAATGCGTTTGACTAC---TGGGGT  
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-113 (SEQ ID NO:562)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTACT-AGGTATAGTATGGGG-TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--CGGATTGATTCTTATGGTGGTGGT  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA---GTGCGTTCTCCTTATACGTTTGACTAC---TGGGGT  
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-114 (SEQ ID NO:563)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCG-GGTTATAATATGGGT-TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--ACTATTTGACTCAGGGTTATCAT  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA---GCGTTTACTAGTGATTTTGACTAC---TGGGGT  
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-115 (SEQ ID NO:564)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCG-GGTTATAATATGTAT-TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GGGATTTCTGGTCCGGGTCTTGAG  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGCAA---GGTATGTGAAGACGTCTACGTTTGACTAC---TGGGGT  
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 28H

TAR2h-116 (SEQ ID NO:565)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACT~GAGTATTATATGGAG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~AGTATTGATCCGGATGGTTCTCTT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~TATCCGCGTGAGAAGTTTACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-117 (SEQ ID NO:566)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGAT~AAGTATCAGATGGGT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGATTCTGAATGGTCATCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGCAA~~~CTGTGCGTTTCAAGGGTCTGAATCTGTTTACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-118 (SEQ ID NO:567)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGTG~CATTATACGATGGGT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TGGATTCTTCTGATGGTGTTCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~TTTACTTGGGGTGAGAAGAAGACTTTTACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-119 (SEQ ID NO:568)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTATG~GGGTATGATATGCAT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GGTATTTCTGCTAAGGGTACTGAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~GGGAGTTCTGGTTCTGATGGGCTGTTTACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-120 (SEQ ID NO:569)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTCTT~GTTTATAATATGGCG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTTATTGCGGGTAATGGTCAGCAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~TTTGCGTGAAGGTGTGCGCCGATGTGTTGACTGATTTTACTAC~~~TGG  
GGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-121 (SEQ ID NO:570)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGTG~CAGTATAATATGCAC~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTTGAAGTGGGTCTCA~~GGGATTTCTTGGGTGGTATGCGT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~GGGATTCGGGATAGTACGCTTCCGAGGGGTACTTTGTTTACTAC~~~TGG  
GGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 28I

TAR2h-122 (SEQ ID NO:571)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGGTTACCTTTAG-ACTTATAGTATGCAT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--TCGATTCTTTGCCTGGTTCGCGG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---CATTGGAAGAGTTCTCATCGTCAGTCTTTTGA CTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-123 (SEQ ID NO:572)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAT-CAGTATGATATGCAT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GGGATTCTTTTAGTGGTTATGAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---GGTAGGGGGCCTGCGCCGATGCGTTGCTTTTGA CTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-124 (SEQ ID NO:573)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGTG-GATATATCCGATGGTG-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--CATATTACTAGTATGGGTGAGTCT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACATGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---TTGCCGACGCATTTTCCGATTAGGT'TTGA CTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-125 (SEQ ID NO:574)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAG-CAGTATAATATGTAT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--TTTATTAGTCCGTCTGGTGGTGAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---TCGATTAAAGCCTTTTGA CTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-126 (SEQ ID NO:575)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAGT-ATG-TATTGATGGCT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--TTTATTGATTTTATGATGGTCTTCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---TTTTCTACGTCTACGATGGCTCTGT'TTGA CTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-127 (SEQ ID NO:576)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTCTT-GAG-TATAATATGCAT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCA--GCGATTGGTACTGCTGGTGGTAGT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACATGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---GGGTATCGTCTCGGACTGGTAGTA TGTTGTTTGA CTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 28J

TAR2h-128 (SEQ ID NO:577)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGCCT-AAGTATAATATGTAT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GCGATTAGTCCTAAGGGTCAGCAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGGAA---GGGATGGGGTCGGATGCTATTACTTTTGA CTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCAACGTCTCGAGC

TAR2h-129 (SEQ ID NO:578)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGCCT-GATTATGATATGGCT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--TTTATTGATCGTAAGGGTCATCAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---ACGACTGATATTACAGCGTTTGAATTCTGCGTTTGA CTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCAACGTCTCGAGC

TAR2h-130 (SEQ ID NO:579)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTACGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGGG-AATGGGGTGATGGCG-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--CATATTAATGAGAATGGTGGTGCT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---CCTTCTATTGAGTCGCCTATTTTGA CTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCAACGTCTCGAGC

TAR2h-131 (SEQ ID NO:580)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGCCT-CATGAGCCGATGGTG-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--CATATTGATCGTGTTGGTCAGGAT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---CTTCCTAAGAGGGGGCCTAGGTTTGA CTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCAACGTCTCGAGC

TAR2h-132 (SEQ ID NO:581)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGA-GAGTCGGTTATGGGG-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA--GCGATTAGTCCTGGGGGTAGTGAG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---CGTACGGGGCCTCCTGGGTCTACGGTTTGA CTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCAACGTCTCGAGC

TAR2h-133 (SEQ ID NO:582)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGGT-GATGAGCCGATGCAT-TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--GGTATTGGTAAGGAGGGTCAGCCG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA---TTGGGGGGGCTTTTGA CTAC---TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCAACGTCTCGAGC

FIGURA 28K

## TAR2h-151 (SEQ ID NO:583)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGAT~TATGGGAATATGTTT~TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGC  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA~~~GATATGACGACGGATTGCGCTCCTGGGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-152 (SEQ ID NO:584)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCG~AAGGAGACGATGAGT~TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TGGATTAGTCCTCATGGTGCTCTT  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA~~~CCTCGGTTTTCTGATTATCCTCGGGTTTCGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-153 (SEQ ID NO:585)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGT~AATGGTAATATGGTT~TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CATATTGATGAGTATGGTACGAAT  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA~~~CCTCGTAATGATCGGCCTGGGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-154 (SEQ ID NO:586)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGT~AATGGTAATATGGTT~TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~CATATTGATGANTATGGTACGAAT  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGGGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA~~~CCTCGTAATGATCGGCCTGGGTTTGACTAC~~~TGGGGT  
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-159 (SEQ ID NO:587)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCG~GGTCAGGATATGCGT~TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TCGATTCCGTGCTGTTTAAAT  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA~~~CGTGCTAAGGATCGTAGTGTGTCGAGATGCCGTATTTTGACTAC~~~TGG  
 GGTGAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-165 (SEQ ID NO:588)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTATG~AGGCCTGATATGGTT~TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCA~~ACTATTAAGGATTGGGGTGATCAG  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA~~~GCTGATAGTCGTGCGCAGCTGGATTTTGACTAC~~~TGGGGT  
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-166 (SEQ ID NO:589)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAGC~AGCTATGCCATGAGC~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGC  
ACATACTACGCAGATTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CCGTATTTTCTGTTTAGGGCTACTAGTTTTGACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-168 (SEQ ID NO:590)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTAT~GATGATGATATGGTT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TCGATTCCGGGGAATGGTTATGTG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CGTCTGATCCGACTTCGGTGTTTTTTACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-171 (SEQ ID NO:591)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGT~GATGATTGGATGACT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GGTATTGCGGCTTATGGTATTTCT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACGCCGCGGTATATTACTGT  
GCGGAA~~~TCTGGGAAGGTGTTTACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-172 (SEQ ID NO:592)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGTT~GAGCGTCCTATGGAT~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTGATTGGTGCGGATGGTTTGTCT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CTTTTTCGTCTCTGGTCTTCTTTGGTTTACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-173 (SEQ ID NO:593)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTACT~GGGCAGGATATGCAG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~GGGATTAATGCTGATGGTATGGCG  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGATACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~ACGTCGCCGACTATGAGGTCGTTTACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-174 (SEQ ID NO:594)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGGG~GAGGAGTATATGCAG~TGGGTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA~~TTGATTCCGCATACTGGTAATCCT  
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC~~CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG  
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
GCGAAA~~~CTTGCGAATAGTTTGTCTGTTTACTAC~~~TGGGGT  
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 28M

## TAR2h-176 (SEQ ID NO:595)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCAAT-AGGTGTAAGATGGGG-TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--TTTATTGAGTATGATGGTAGGGAT  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA---GAGTGACGAGGCCGTATGGTATGTTTACTAC---TGGGGT  
 CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-178 (SEQ ID NO:596)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTAAAT-AGGTATAGTATGGGG-TGGCTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--TTCATTGACAAGGTCGGTCATCAC  
 ACATGGTACGAAGACCCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA---ATTCTCAGTTTGGGCCAAATGCGTTTACTAC---TGGGGT  
 CAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-201 (SEQ ID NO:597)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTACT-AGGTATAGTATGGGG-TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--ATGATTGCGCATGCTGGTCCTGAG  
 AGATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA---ATTCTCANTTTGGGTCAAATGCGTTTACTAC---TGGGGT  
 CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-202 (SEQ ID NO:598)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTACT-AGGTATAATATGGGG-TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--TTTATTGATCCTCCGAGTGTTTCAT  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAT---ATTCTCAGTTTGGGTCAAACGCGTTTACTAC---TGGGGT  
 CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-203 (SEQ ID NO:599)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTACT-AGGTATAGTATGGGG-TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--TTTATTGATCCTCCGAGTGTTTCAT  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGN  
 GCGGAA---ATTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTACTAC---TGGGGT  
 CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

## TAR2h-204 (SEQ ID NO:600)

GAGGTGCAGTTGTTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC  
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTACT-AGGTATAGTATGGGG-TGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--ATGATTGCGCATGCTGGTCCTGAG  
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAG  
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGT  
 GCGAAA---ATTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTAGACTAC---TGGGGC  
 CGGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 28N

TAR2h-185-25 (SEQ ID NO:601)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTC  
CTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCG~CGGTATAATATGGGT~TGGGTCCGCCAGGCTCC  
AGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--CTGATTGATCCGAGCGGTGGTCATACATACTACGC  
AGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCAACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT  
GCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGGGAAA---CCGGTTT  
TTTCTGATTGGCCTGCGGTGGAGTTGACTAC---TGGGGTCAGGGAACCGTGGTCACCGTC  
TCGAGC

TAR2h-154-10 (SEQ ID NO:602)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCATGGTACAGCCTGGGGGGTCACTGCGTCTCTC  
CTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGAG~CATGAGGGGATGGTG~TGGGTCCGCCAGGCTCC  
AGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--CATATTGGTGAGGATGGTCAGTCTACATACTACGC  
AGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT  
GCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAT---ATTCCGA  
AGGCGGGGCCTTCGTTTACTAC---TGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

TAR2h-205 (SEQ ID NO:628)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTC  
CTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGTT~AAGTATTGATGGGG~TGGGTCCGCCAGGCTCC  
AGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCA--CAGATTTGGAATACGGGTGGTCATACATACTACGC  
AGACTCCGTGAAGGGC--CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT  
GCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAA---TATACGG  
GTCGTTGGGAGCCTTTTACTAC---TGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

FIGURA 280