

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 943**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2008** **E 08750800 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015** **EP 2162467**

54 Título: **Polipéptidos, dominios variables de anticuerpo y antagonistas**

30 Prioridad:

06.06.2007 US 933632 P

13.12.2007 GB 0724331

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

30.09.2015

73 Titular/es:

DOMANTIS LIMITED (100.0%)
980 GREAT WEST ROAD
BRENTFORD, MIDDLESEX TW8 9GS, GB

72 Inventor/es:

JESPERS, LAURENT;
PUPECKA, MALGORZATA;
TOMLINSON, IAN y
ENEVER, CAROLYN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 546 943 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

Polipéptidos, dominios variables de anticuerpo y antagonistas

La presente invención se refiere a polipéptidos resistentes a proteasas, a dominios variables únicos de inmunoglobulinas (anticuerpos) y a antagonistas anti-receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1, p55, CD120a, P60, al receptor TNF miembro de la superfamilia 1 A, TNFRSF1A) que los comprenden. La invención también se refiere a usos, formulaciones, composiciones y dispositivos que comprenden tales ligandos anti-TNFR1.

Antecedentes de la invención

Los polipéptidos y péptidos se han convertido en agentes cada vez más importantes en una variedad de aplicaciones, que incluyen aplicaciones industriales y el uso como agentes medicinales, terapéuticos y diagnósticos. Sin embargo, en ciertos estados fisiológicos, tales como estados inflamatorios (por ejemplo, COPD) y cáncer, la cantidad de proteasas presentes en un tejido, órgano o animal (por ejemplo, en el pulmón, en un adyacente a un tumor) puede aumentar. Este aumento de proteasas puede dar como resultado la degradación acelerada y la inactivación de proteínas endógenas y de péptidos, polipéptidos y proteínas terapéuticos que se administran para tratar la enfermedad. En consecuencia, algunos agentes que tuvieran potencial para su uso *in vivo* (por ejemplo, para su uso en el tratamiento, diagnóstico o prevención de una enfermedad) tienen solo una eficacia limitada debido a que se degradan e inactivan rápidamente por las proteasas.

Los polipéptidos resistentes a las proteasas proporcionan varias ventajas. Por ejemplo, los polipéptidos resistentes a las proteasas permanecen activos *in vivo* más que los agentes sensibles a las proteasas y, en consecuencia, permanecen funcionales durante un periodo de tiempo que es suficiente para producir sus efectos biológicos. Existe una necesidad de procedimientos mejorados para seleccionar polipéptidos que sean resistentes a la degradación por proteasas y que también tengan una actividad biológica deseada.

TNFR1

El TNFR1 es un receptor transmembrana que contiene una región extracelular que se une al ligando y un dominio intracelular que carece de actividad de transducción de la señal intrínseca pero que se puede asociar con moléculas de transducción de señal. El complejo de TNFR1 con TNF unido contiene tres cadenas de TNFR1 y tres cadenas de TNF. (Banner y col., Cell, 73(3) 431-445 (1993)). El ligando TNF está presente como un trímero, el cual se une a tres cadenas de TNFR1. (Id). Las tres cadenas de TNFR1 se agrupan estrechamente juntas en el complejo receptor-ligando, y este agrupamiento es un pre-requisito para la transducción de la señal mediada por TNFR1. De hecho, agentes multivalentes que se unen al TNFR1, tal como los anticuerpos anti-TNFR1, pueden inducir el agrupamiento de TNFR1 y transducción de la señal en ausencia de TNF y se utilizan comúnmente como agonistas de TNFR1 (véase, por ejemplo, Belka y col., EMBO, 14(6):1156-1165 (1995); Mandik-Nayak y col., J. Immunol, 167:1920-1928 (2001)). En consecuencia, los agentes multivalentes que se unen al TNFR1, en general no son eficaces antagonistas del TNFR1 aunque bloqueen la unión del TFN α al TNFR1.

La región extracelular del TNFR1 comprende un segmento terminal de trece aminoácidos (aminoácidos 1-13 de la SEC ID N° 603 (humano); aminoácidos 1-13 de la SEC ID N° 604 (ratón)), Dominio 1 (aminoácidos 14-53 de la SEC ID N° 603 (humano); aminoácidos 14-53 de la SEC ID N° 604 (ratón)), Dominio 2 (aminoácidos 54-97 de la SEC ID N° 603 (humano); aminoácidos 54-97 de la SEC ID N° 604 (ratón)), Dominio 3 (aminoácidos 98-138 de la SEC ID N° 603 (humano); aminoácidos 98-138 de la SEC ID N° 604 (ratón)), y Dominio 4 (aminoácidos 139-167 de la SEC ID N° 603 (humano); aminoácidos 139-167 de la SEC ID N° 604 (ratón)) que continúa con la región proximal de membrana (aminoácidos 168-182 de la SEC ID N° 603 (humano); aminoácidos 168-183 SEC ID N° 604 (ratón)). (Véase, Banner y col., Cell 73(3) 431-445 (1993) y Loetscher y col., Cell 61(2) 351-359 (1990)). Los dominios 2 y 3 están en contacto con el ligando unido (TNF β , TNF α). (Banner y col., Cell, 73(3) 431-445 (1993)). La región extracelular de TNFR1 también contiene una región que se denomina como dominio de ensamblaje de unión preligando o dominio PLAD (aminoácidos 1-53 de la SEC ID N° 603 (humano); aminoácidos 1-53 de la SEC ID N° 604 (ratón)) (El Gobierno de los EE. UU., documento WO 01/58953; Deng y col., Nature Medicine, 10.1038/nm1304 (2005)).

El TNFR1 se desprende de la superficie de las células *in vivo* por medio de un proceso que incluye la proteólisis del TNFR1 en el Dominio 4 o en la región proximal de membrana (aminoácidos 168-182 de la SEC ID N° 603; aminoácidos 168-183 de la SEC ID N° 604), para producir una forma soluble de TNFR1. El TNFR1 soluble mantiene la capacidad de unirse al TFN α , y de esta manera funciona como un inhibidor endógeno de la actividad del TFN α .

El documento WO 2007/049017 describe antagonistas del TNFR1 para su uso en el tratamiento de enfermedades respiratorias.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un dominio variable único de inmunoglobulina anti-receptor TFN α tipo 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de DOM1h-131-206 (que se muestra en la Figura 3). La divulgación proporciona un monómero DOM-1h-131-206 (sustancialmente) puro.

En una realización, el DOM-1h-131-206 es al menos un monómero puro en un 98, 99, 99,5%, o el 100% puro.

En un aspecto, la invención proporciona un dominio polipeptídico variable único de inmunoglobulina anti-receptor TFN α tipo 1 codificado por una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de nucleótidos del DOM-1h-131-206 (como se muestra en la Figura 19).

- 5 En un aspecto, la divulgación proporciona una proteína de fusión que comprende el polipéptido de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona un antagonista del receptor TFN α tipo 1 (TNFR1; p55) que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TNFR1 de acuerdo con la invención. En una realización, el antagonista comprende un primer y un segundo dominio variable único de inmunoglobulina, en que cada dominio variable es de acuerdo con la invención. Por ejemplo, en que el antagonista comprende un monómero de dicho dominio variable único o un homodímero de dicho dominio variable único.

- 10 En una realización, el antagonista es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, tal como un fragmento de unión al antígeno monovalente (por ejemplo, scFv, Fab, Fab', dAb) que tiene una especificidad de unión por el TNFR1. Otros ejemplos de antagonistas son ligandos que se describen en el presente documento que se unen al TNFR1. Los ligandos pueden comprender un dominio variable único de inmunoglobulina o dominio de anticuerpo (dAb) que tiene especificidad de unión por el TNFR1, o las regiones determinantes de complementariedad de tal dAb en un formato adecuado. En algunas realizaciones, el ligando es un monómero de dAb que consiste esencialmente, o consiste en, un dominio variable único de inmunoglobulina o dAb que tiene una especificidad de unión por el TNFR1. En otras realizaciones, el ligando es un polipéptido que comprende dAb (o las CDR de un dAb) en un formato adecuado, tal como un formato de anticuerpo.

- 20 Algunos antagonistas de TNFR1 no inhiben la unión del TFN α al TNFR1, pero inhiben la transducción de la señal por medio de TNFR1. Por ejemplo, un antagonista del TNFR1 puede inducir el agrupamiento inducido por TFN α , que precede a la transducción de la señal por medio de TNFR1. Tales antagonistas proporcionan varias ventajas. Por ejemplo, en presencia de tal antagonista, el TFN α se puede unir al TNFR1 que se expresa en la superficie de las células y se puede retirar del ambiente celular, pero la transducción de la señal mediada por TNFR1 no se activará. Por lo tanto la producción de señal inducida por TNFR1 de TFN α adicional y otros mediadores de la inflamación se inhibirá. De manera similar, los antagonistas de TNFR1 que se unen al TNFR1 e inhiben la transducción de la señal mediada por TNFR1, pero no inhiben la unión del TFN α al TNFR1, no inhibirán la unión al TFN α e inhibirá la actividad de TNFR1 soluble que se produce endógenamente. En consecuencia, la administración de tal antagonista a un mamífero que necesita del mismo puede complementar las rutas reguladoras endógenas que inhiben la actividad de TFN α y la actividad de TNFR1 *in vivo*. La divulgación también se refiere a ligandos que (i) se unen al TNFR1 (por ejemplo, en el Dominio 1), (ii) antagonizan la activación de la transducción de la señal mediada por TNFR1, y (iii) no inhibe la unión del TFN α al TNFR1. Tal ligando se une al TNFR1 soluble y no evita que el receptor soluble se una al TFN α , y por lo tanto la administración de tal antagonista a un mamífero que necesita el mismo puede complementar las rutas reguladoras endógenas que inhiben la actividad de TFN α *in vivo* aumentando la semivida del receptor soluble en el suero. Estas ventajas son particularmente relevantes para los ligandos que se han formateado para tener un tamaño hidrodinámico mayor, por ejemplo, uniéndose a un grupo PEG, albúmina sérica, transferrina, receptor de transferrina o al menos una parte de unión a la transferrina del mismo, una región Fc de anticuerpo, o por conjugación con un dominio de anticuerpo. Por ejemplo, un agente (por ejemplo, polipéptido, dominio variable o antagonista) que i) se une al TNFR1 (por ejemplo, el Dominio 1), (ii) antagoniza la activación de la transducción de la señal mediada por TNFR1, y (iii) no inhibe la unión del TFN α al TNFR1, tal como un monómero de dAb, se puede formatear como un fragmento de unión al antígeno mayor de un anticuerpo o como un anticuerpo (por ejemplo, formateado como un Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv). El tamaño hidrodinámico de un ligando y su semivida en el suero también se pueden aumentar conjugando o uniendo un agente de unión al TNFR1 (antagonista; dominio variable) a un dominio de unión (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a un antígeno o epítipo que aumenta la semivida *in vivo*, como se describe en el presente documento (véase, Anexo 1 del documento WO2006038027). Por ejemplo, el agente de unión al TNFR1 (por ejemplo un polipéptido) se puede conjugar o unir a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-seroalbúmina o a un anti-receptor Fc neonatal, por ejemplo un dAb, Fab, Fab' o scFv anti-SA o anti-receptor Fc neonatal, o a un anticuerpo anti-SA o anticuerpo anti-receptor Fc neonatal.

- 50 Ejemplos de albúmina, fragmentos de albúmina o variantes de albúmina adecuados para su uso en un ligando de unión al TNFR1 de acuerdo con la invención se describen en los documentos WO 2005/077042A2 y WO2006038027.

- En otras realizaciones de la invención descritas a lo largo de esta divulgación, en vez del uso del "dAb" en un antagonista o ligando de la invención, se contempla que el experto destinatario puede utilizar un dominio que comprenda las CDR de un dAb que se une al TNFR1 (por ejemplo, CDR que se injertan en un armazón o esqueleto, por ejemplo un anticuerpo, un armazón SpA, un dominio de receptor LDL clase A o un dominio EGF) o puede ser un dominio proteico que comprende un sitio de unión para el TNFR1, por ejemplo, en que el dominio se selecciona de entre un anticuerpo, un dominio SpA, un dominio de receptor LDL clase A o un dominio EGF. La divulgación como un todo se construye en consecuencia para proporcionar la divulgación de antagonistas, ligandos y procedimientos que utilizan tales dominios en lugar de un dAb.

Los polipéptidos, dominios variables únicos de inmunoglobulinas y los antagonistas de la invención pueden ser resistentes a una o más de las siguientes: serina proteasa, cisteína proteasa, aspartato proteasa, tiol proteasas, metaloproteasa de la matriz, carboxipeptidasa (por ejemplo, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B), tripsina, quimiotripsina, pepsina, papaína, elastasa, leucozima, pancreatina, trombina, catepsinas (por ejemplo, catepsina G),
 5 proteinasa (por ejemplo, proteinasa 1, proteinasa 2, proteinasa 3), termolisina, quimosina, enteropeptidasa, caspasa (por ejemplo, caspasa 1, caspasa 2, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 9, caspasa 12, caspasa 13), calpaína, ficaina, clostripaína, actinidaína, bromelaína, y separasa. En realizaciones particulares, la proteasa es tripsina, elastasa o leucozima. La proteasa también se puede proporcionar en un extracto biológico, un homogenado biológico o una preparación biológica. En una realización, la proteasa es una proteasa que se encuentra en el esputo, mucus (por
 10 ejemplo, mucus gástrico, mucus nasal, mucus bronquial), lavado broncoalveolar, homogenado pulmonar, extracto pulmonar, extracto pancreático, fluido gástrico, saliva o lágrimas. En una realización, la proteasa se encuentra en el ojo y/o las lágrimas. En una realización, la proteasa es una proteasa no bacteriana. En una realización, la proteasa es una proteasa animal, por ejemplo, de mamífero, por ejemplo humana. En una realización, la proteasa es una proteasa de tracto GI o una proteasa del tejido pulmonar, por ejemplo, una proteasa del tracto GI o una proteasa de
 15 tejido pulmonar que se encuentra en seres humanos. Tales proteasas que se enumeran en el presente documento también se pueden utilizar en los procedimientos descritos en el presente documento que implican la exposición de un repertorio de biblioteca a una proteasa.

En un aspecto, la divulgación proporciona un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a proteasas que comprende un sitio de unión al receptor TFN α tipo 1 (TNFR1; p55), que el dominio variable es resistente a las
 20 proteasas, por ejemplo, tripsina, cuando se incuban con

(i) una concentración (c) de al menos 10 microgramos/ml de proteasa a 37 °C durante un tiempo (t) de al menos una hora, o

(ii) una concentración (c') de al menos 40 microgramos/ml de proteasa a 30 °C durante un tiempo (t) de al menos una hora, en que el dominio variable comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un
 25 90% de la secuencia de aminoácidos de DOM1h-131-206 (como se muestra en la figura 3). En una realización, la relación (en una base mol/mol) de proteasa, por ejemplo, tripsina, respecto al dominio variable es de 8.000 a 80.000 de proteasa: dominio variable, por ejemplo cuando C es 10 microgramos/ml, la relación es de 800 a 80.000 de proteasa: dominio variable; o cuando C o C' es de 100 microgramos/ml, la relación es de 8.000 a 80.000 de proteasa: dominio variable. En una realización la relación (en una base peso/peso, por ejemplo
 30 microgramo/microgramo) de proteasa (por ejemplo, tripsina) con respecto a dominio variable es de 16.000 a 160.000 de proteasa: dominio variable, por ejemplo cuando C es de 10 microgramos/ml, la relación es de 1.600 a 160.000 de proteasa: dominio variable; o cuando C o C' es de 100 microgramos/ml, la relación es de 16.000 a 160.000 de proteasa: dominio variable. En una realización, la concentración (c o c') es al menos de 100 o 1000 microgramos/ml de proteasa. En una realización, la concentración (c o c') es al menos de 100 o 1000
 35 microgramos/ml de proteasa. Se hace una referencia a la descripción del presente documento de las condiciones adecuadas para la actividad proteolítica de la proteasa para su uso cuando se trabaja con repertorios o bibliotecas de péptidos o polipéptidos (por ejemplo, en parámetros p/p). Estas condiciones se pueden utilizar como condiciones para determinar la resistencia a la proteasa de un dominio variable único de inmunoglobulina en particular. En una realización, el tiempo (t) es o aproximadamente es una, tres o 24 horas o una noche (por
 40 ejemplo, aproximadamente de 12-16 horas). En una realización el dominio variable es bajo las condiciones (i) y la concentración (c) es o es aproximadamente de 10 o 100 microgramos/ml de proteasa y el tiempo (t) es de 1 hora. En una realización, el dominio variable es resistente bajo las condiciones (ii) y la concentración (c') es o es aproximadamente de 40 microgramos/ml de proteasa y el tiempo (t) es aproximadamente de 3 horas. En una realización la proteasa se selecciona de entre tripsina, elastasa, leucozima y pancreatina. En una realización, la
 45 proteasa es tripsina. En una realización, la proteasa es una proteasa que se encuentra en el esputo, mucus (por ejemplo, mucus gástrico, mucus nasal, mucus bronquial), lavado broncoalveolar, homogenado pulmonar, extracto pulmonar, extracto pancreático, fluido gástrico, saliva o lágrimas. En una realización, la proteasa se encuentra en el ojo y/o lágrimas. En una realización, la proteasa es una proteasa no bacteriana. En una realización la proteasa es una proteasa animal, por ejemplo de mamífero, por ejemplo humana. En una
 50 realización la proteasa es una proteasa del tracto GI o una proteasa de tejido pulmonar, por ejemplo, una proteasa del tracto GI o una proteasa de tejido pulmonar que se encuentra en seres humanos. Tal proteasa enumerada en el presente documento se puede utilizar también en los procedimientos descritos en el presente documento implican la exposición de un repertorio de una biblioteca a una proteasa.

En una realización, el dominio variable es resistente a la tripsina y/o al menos a otra proteasa que se selecciona de
 55 entre el grupo de elastasa, leucozima y pancreatina. Por ejemplo, la resistencia es a la tripsina y la elastasa; tripsina y leucozima; tripsina y pancreatina; tripsina, elastasa y leucozima; tripsina, elastasa y pancreatina; tripsina, elastasa, pancreatina y leucozima; o tripsina, pancreatina y leucozima.

En una realización, el dominio variable se presenta en un bacteriófago cuando se incuban bajo la condición (i) o (ii) por ejemplo de una biblioteca de fagos con un tamaño de 10^6 a 10^{13} , por ejemplo de 10^8 a 10^{12} unidades replicantes
 60 (viriones infecciosos).

En una realización, el dominio variable se une específicamente al TNFR1 después de la incubación bajo la condición (i) o (ii), por ejemplo que se evalúa utilizando BiaCore™ o ELISA, por ejemplo ELISA de fago o ELISA de fago

monoclonal.

En una realización, los dominios variables de la invención se unen específicamente a la proteína A o la proteína L. En una realización, la unión específica a la proteína A o L está presente después de la incubación bajo la condición (i) o (ii).

- 5 En una realización, los dominios variables de la invención puede tener una DO₄₅₀ que se lee en ELISA (por ejemplo ELISA de fago o ELISA de fago monoclonal), de al menos 0,404, por ejemplo, tras la incubación bajo la condición (i) o (ii).

En una realización, los dominios variables de la invención presentan (sustancialmente) una única banda en electroforesis en gel, por ejemplo, tras la incubación bajo la condición (i) o (ii).

- 10 En ciertas realizaciones, la invención proporciona un antagonista del TNFR1 que es un ligando específico dual que comprende un primer dAb de acuerdo con la invención que se une al TNFR1 y un segundo dAb que tiene la misma especificidad o diferente que el primer dAb. El segundo dAb se puede unir a una diana que se selecciona de entre ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, CEA, CD40, Ligando CD40, CD56, CD38, CD138, EGF, receptor EGF, ENA-78, Eotaxina, Eotaxin-2, Exodus-2, FAP α , FGF-ácido, FGF-básico, factor de crecimiento de fibroblastos -10, 15 ligando FLT3, Fractalquina (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF- β 1, albúmina sérica humana, insulina, IFN- γ , IGF-I, IGF-II, IL-1 α , 1L-1 β , IL-1 receptor, receptor IL-1 tipo 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 aa), IL-8 (77 aa), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inhibina α , Inhibina β , IP-10, factor de crecimiento de queratinocitos -2 (KGF-2), KGF, Leptina, LIF, Linfotactina, sustancia inhibidora Mulleriana, factor inhibidor de colonias de monocitos, proteína atrayente de monocitos, M-CSF, MDC (67 aa), MDC (69 aa), MCP-1 (MCAF), MCP- 20 MCP-3, MCP-4, MDC (67 aa), MDC (69 aa), MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, factor inhibidor progenitor mieloide -1 (MIPF-1), NAP-2, Neurturina, factor de crecimiento de nervios, β -NGF, NT-3, NT-4, Oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1 α , SDF1 β , SCF, SCGF, factor de células madre (SCF), TARC, TGF- α , TNF- α , TGF- β 2, TGF- β 3, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF- α , TNF- β , TNF I, TNF II, TNIL-1, TPO, VEGF, VEGF A, VEGF B; VEGF C, VEGF D, receptor VEGF 1, receptor VEGF 2, receptor VEGF 3, 25 GCP-2, GRO/MGSA, GRO- β , GRO- γ , HCC1, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3, HER 4, seroalbúmina, vWF, proteínas amiloides (por ejemplo, amiloide alfa), MMP12, PDK1, IgE, IL-13R α 1, IL-13R α 2, IL-15, IL-15R, I-16, IL-17R, IL-17, IL-18, IL-18R, IL-23 IL-23R, IL-25, CD2, CD4, CD11a, CD23, CD25, CD27, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD56, CD138, ALK5, EGFR, FcER1, TGFb, CCL2, CCL18, CEA, CR8, CTGF, CXCL12 (SDF-1), quimasa, FGF, Furina, Endotelina-1, Eotaxinas (por ejemplo, Eotaxina, Eotaxina-2, Eotaxina-3), GMCSF, ICAM-1, ICOS, IgE, IFNa, I-309, integrinas, L-selectina, MIF, MIP4, MDC, MCP-1, MMPs, elastasa de neutrófilos, osteopontina, OX-40, PARC, PD-1, 30 RANTES, SCF, SDF-1, siglec8, TARC, TGFb, Trombina, Tim-1, TNF, TRANCE, Triptasa, VEGF, VLA-4, VCAM, α 4 β 7, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, alfavbeta6, alfavbeta8, cMET, CD8, vWF, proteínas amiloides (por ejemplo, amiloide alfa), MMP12, PDK1, e IgE.

- 35 En una ejemplo, el ligando específico dual comprende un primer dAb que se une a un primer epítipo de TNFR1 y una segundo dAb que se une a un epítipo en una diana diferente. En otro ejemplo, el segundo dAb se une a un epítipo en la albúmina sérica.

- En otras realizaciones, el ligando es un ligando multiespecífico que comprende un primer dominio de unión al epítipo que tiene una especificidad de unión por TNFR1 y al menos otro dominio de unión al epítipo que tiene una especificidad de unión diferente del primer dominio de unión al epítipo. Por ejemplo el primer dominio de unión al 40 epítipo puede ser un dAb que se une al TNFR1 o puede ser un dominio que comprende la CDR de un dAb que se une al TNFR1 (por ejemplo, CDR que se insertan en una proteína de armazón o esqueleto, por ejemplo, un aficuerpo, un armazón SpA, un dominio receptor de LDL clase A o un dominio EGF) o puede ser un dominio que se une al TNFR1, en que el dominio se selecciona de entre un aficuerpo, un armazón SpA, un dominio receptor de LDL clase A o un dominio EGF.

- 45 En ciertas realizaciones, el polipéptido, antagonista, ligando o monómero dAb anti-TNFR1 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 tasa de constante K_{off} de 5×10^{-1} a $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ como se determina por resonancia de plasmones superficiales; 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 de referencia con células L929 con una DN50 de 500 nM a 50 pM; 4) antagoniza la 50 actividad del TNFR1 en un ensayo celular de referencia con una DN₅₀ de $\leq 100 \text{ nM}$, y 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 ratón de choque séptico inducido por galactosamida-LPS/D; 6) resiste la agregación; 7) se segrega 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 desdobra reversiblemente; 9) tiene eficacia en un modelo de enfermedad inflamatoria crónica que se selecciona de entre el grupo que consiste en modelo de ratón de artritis inducida por colágeno, modelo de ratón Δ ARE de artritis, 55 modelo de ratón Δ ARE de enfermedad inflamatoria intestinal, modelo de ratón de enfermedad inflamatoria intestinal inducida por sulfato sódico dextrano, modelo de ratón de enfermedad obstructiva crónica por humo de tabaco, y modelos adecuados de mono (por ejemplo, el modelo de primates de artritis inducida por colágeno); y/o 10) tiene eficacia en el tratamiento, supresión o prevención de una enfermedad inflamatoria crónica. Se hace referencia al

documento WO2006038027 para los detalles de ensayos y pruebas y los parámetros aplicables a las condiciones (1) a (10).

En realizaciones particulares, el polipéptido, antagonista, ligando o monómero de dAb se disocia del TNFR1 con una constante de disociación (K_d) de 50 nM a 20 pM, y una tasa de constante K_{off} de 5×10^{-1} a $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ como se determina por resonancia de plasmones superficiales; inhibe la unión del Factor de Necrosis Tumoral Alfa ($\text{TNF}\alpha$) al TNFR1 con una CI_{50} de 500 nM a 50 pM; y neutraliza el TNFR1 humano en un ensayo de referencia con células L929 con una DN_{50} de 500 nM a 50 pM. En otras realizaciones particulares, el polipéptido, antagonista, ligando o monómero de dAb se disocia del TNFR1 con una constante de disociación (K_d) de 50 nM a 20 pM, y una tasa de constante K_{off} de 5×10^{-1} a $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ como se determina por resonancia de plasmones superficiales; inhibe la unión del Factor de Necrosis Tumoral Alfa ($\text{TNF}\alpha$) al TNFR1 con una CI_{50} de 500 nM a 50 pM; y tiene eficacia en un modelo de enfermedad inflamatoria crónica que se selecciona de entre el grupo que consiste en modelo de ratón de artritis inducida por colágeno, modelo de ratón ΔARE de artritis, modelo de ratón ΔARE de enfermedad inflamatoria intestinal, modelo de ratón de enfermedad inflamatoria intestinal inducida por sulfato sódico dextrano, modelo de ratón de enfermedad obstructiva crónica por humo de tabaco, y modelos adecuados de mono (por ejemplo, el modelo de primates de artritis inducida por colágeno). En otras realizaciones particulares, el polipéptido, antagonista, ligando o monómero de dAb se disocia del TNFR1 con una constante de disociación (K_d) de 50 nM a 20 pM, y una tasa de constante K_{off} de 5×10^{-1} a $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ como se determina por resonancia de plasmones superficiales; neutraliza el TNFR1 humano en un ensayo de referencia con células L929 con una DN_{50} de 500 nM a 50 pM; y antagoniza la actividad del TNFR1 en un ensayo celular de referencia con una DN_{50} de $\leq 100 \text{ nM}$, y una concentración de $\leq 10 \text{ }\mu\text{M}$ el dAb agoniza la actividad del TNFR1 en $\leq 5\%$ en el ensayo. Los polipéptidos, dominios variables únicos de inmunoglobulina y antagonistas resistentes de la invención son útiles en terapia, profilaxis y diagnóstico de enfermedades o afecciones en mamíferos, por ejemplo en seres humanos. En particular son útiles como base de fármacos que probablemente se encuentran con proteasas cuando se administran a un paciente, tal como un ser humano. Por ejemplo, cuando se administra en el tracto GI (por ejemplo, se administra vía oral, sublingual, rectal), en cuyo caso los polipéptidos, dominios variables únicos de inmunoglobulinas o antagonistas que se van a administrar se pueden someter a proteasas en uno o más del tracto GI superior, tracto GI inferior, boca, intestino delgado e intestino grueso. Una realización, por lo tanto, proporciona un polipéptido, dominio variable único de inmunoglobulina o antagonista resistente a proteasas para administrarse por vía oral, sublingual o rectal en el tracto GI de un paciente para tratar y/o prevenir una enfermedad o afección en el paciente. Por ejemplo, la administración oral a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o afección mediada por el TNF alfa tales como la artritis (por ejemplo artritis reumatoide), IBD, psoriasis, o enfermedad de Crohn. En otro ejemplo, el polipéptido, dominio variable único de inmunoglobulina o antagonista es probable que se encuentre con la proteasa cuando se administra (por ejemplo, por inhalación o vía intranasal) en el tejido pulmonar (por ejemplo, el pulmón o las vías aéreas). Una realización, por lo tanto, proporciona la administración del polipéptido, dominio variable único de inmunoglobulina o antagonista resistente a proteasa a un paciente (por ejemplo a un ser humano) por inhalación o vía intranasal al tejido pulmonar del paciente para tratar y/o prevenir una enfermedad o afección en el paciente. Tal afección puede ser asma (por ejemplo, asma alérgica), COPD, gripe o cualquier otra enfermedad o afección pulmonar que se desvela en el documento WO2006038027. En otro ejemplo, el polipéptido, dominio variable único de inmunoglobulina o antagonista es probable que se encuentre con la proteasa cuando se administra (por ejemplo por inyección intraocular, o como gotas oftálmicas) en un ojo de un paciente. Una realización, por lo tanto, proporciona para la administración ocular, la administración de un polipéptido, dominio variable único de inmunoglobulina o antagonista resistente a proteasas a un paciente (por ejemplo, un ser humano) para tratar y/o prevenir una enfermedad o afección (por ejemplo, una enfermedad o afección del ojo) en el paciente. La administración podría ser una administración tópica en el ojo, en forma de gotas oftálmicas o por inyección en el ojo, por ejemplo en el humor vítreo.

Los antagonistas, polipéptidos y dominios variables únicos de inmunoglobulina de acuerdo con la invención pueden presentar temperaturas de fusión (T_m) mejoradas o relativamente altas, proporcionando una mejor estabilidad. La unión a la diana con alta afinidad puede ser también o alternativamente una característica de los antagonistas, polipéptidos y dominios variables. Una o más de estas características, combinadas con la resistencia a proteasas, hace que los antagonistas, dominios variables y polipéptidos sean adecuados para su uso como fármacos en mamíferos, tales como los seres humanos, en que es probable que las proteasas se encuentren, por ejemplo, en la administración en el tracto GI o el tejido pulmonar.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona el antagonista del TNFR1 para suministro oral. En un aspecto, la invención proporciona el antagonista del TNFR1 para el suministro en el tracto GI de un paciente. En un aspecto, la invención proporciona el uso del antagonista del TNFR1 en la fabricación de un medicamento para suministro oral. En un aspecto, la invención proporciona el uso del antagonista del TNFR1 en la fabricación de un medicamento para el suministro en el tracto GI de un paciente. En una realización, el dominio variable es resistente a la tripsina y/o al menos a otra proteasa que se selecciona de entre elastasa, leucozima y pancreatina. Por ejemplo, la resistencia es a la tripsina y elastasa; tripsina y leucozima; tripsina y pancreatina, tripsina, elastasa y leucozima; tripsina, elastasa y pancreatina; tripsina, elastasa, pancreatina y leucozima; o tripsina, pancreatina y leucozima.

En un aspecto, la invención proporciona el antagonista del TNFR1 para el suministro pulmonar. En un aspecto, la invención proporciona el antagonista del TNFR1 para el suministro en el pulmón de un paciente. En un aspecto, la

invención proporciona el uso del antagonista del TNFR1 en la fabricación de un medicamento para el suministro pulmonar. En un aspecto, la invención proporciona el uso del antagonista del TNFR1 en la fabricación de un medicamento para el suministro en el pulmón de un paciente. En una realización el dominio variable es resistente a la leucozima.

- 5 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de suministro oral o suministro de un medicamento en el tracto GI de un paciente o en el pulmón o tejido pulmonar de un paciente, en que el procedimiento comprende la administración al paciente de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un antagonista del TNFR1 de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona el antagonista del TNFR1 de la invención para el tratamiento y/o la profilaxis de una afección inflamatoria. En un aspecto, la invención proporciona el uso del antagonista del TNFR1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de una afección inflamatoria. En una realización la afección se selecciona de entre el grupo que consiste en artritis, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Por ejemplo, dicha artritis es artritis reumatoide o artritis reumatoide juvenil. Por ejemplo, dicha enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa. Por ejemplo, dicha enfermedad pulmonar obstructiva crónica se selecciona de entre el grupo que consiste en bronquitis crónica, bronquitis obstructiva crónica y enfisema. Por ejemplo, dicha neumonía es una neumonía bacteriana. Por ejemplo, dicha neumonía bacteriana es una neumonía Estafilocócica.

En un aspecto, la invención proporciona el antagonista del TNFR1 para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad respiratoria. En un aspecto, la invención proporciona el uso del antagonista del TNFR1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad respiratoria. Por ejemplo, dicha enfermedad respiratoria se selecciona de entre el grupo que consiste en inflamación pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, neumonía, neumonitis por hipersensibilidad, infiltrado pulmonar con eosinofilia, enfermedad pulmonar ambiental, neumonía, bronquiectasia, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar primaria, tromboembolia pulmonar, trastornos de la pleura, trastornos del mediastino, trastornos del diafragma, hipoventilación, hiperventilación, apnea del sueño, síndrome de dificultad respiratoria aguda, mesotelioma, sarcoma, rechazo de injertos, enfermedad del huésped contra el injerto, cáncer de pulmón, rinitis alérgica, alergia, asbestosis, Aspergiloma, aspergilosis, bronquiectasia, bronquitis crónica, enfisema, neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad neumocócica invasiva, gripe, micobacterias no tuberculosas, derrame pleural, neumoconiosis, neumocitosis, neumonía, actinomicosis pulmonar, proteinosis alveolar pulmonar, ántrax pulmonar, edema pulmonar, embolia pulmonar, inflamación pulmonar, histiocitosis X pulmonar, hipertensión pulmonar, Nocardiosis pulmonar, tuberculosis pulmonar, enfermedad veno-oclusiva pulmonar, enfermedad reumatoide de pulmón, sarcoidosis, y granulomatosis de Wegener. Por ejemplo, la enfermedad es enfermedad pulmonar oclusiva crónica (COPD). Por ejemplo, la enfermedad es asma.

Un antagonista de la invención comprende un agente que inhibe el TNFR1 (por ejemplo, en que el agente se selecciona de entre el grupo que consiste en fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento Fv (por ejemplo, scFv, Fv unido por enlaces disulfuro), fragmento F(ab')₂, dAb), ligandos y monómeros y multímeros de dAb (por ejemplo, homo o heterodímeros) se puede administrar localmente en el tejido pulmonar por administración por inhalación o intranasal. Para la administración por inhalación o intranasal, el antagonista del TNFR1 se puede administrar utilizando un nebulizador, inhalador, atomizador, aerosol, nebulizador, inhalador de polvo seco, inhalador de dosis medida, pulverizar de dosis medida, nebulizador de dosis medida, atomizador de dosis medida, u otro inhalador o dispositivo de suministro intranasal. Por lo tanto, en una realización, la divulgación proporciona un dispositivo de suministro pulmonar que contiene el antagonista del TNFR1. En una realización, el dispositivo es un inhalador o un dispositivo de suministro intranasal.

En un aspecto, la invención proporciona una formulación oral que comprende el antagonista del TNFR1. La formulación puede ser un comprimido, píldora, cápsula, líquido o jarabe.

En una realización, la invención proporciona una formulación pulmonar para el suministro en el pulmón, en que la formulación comprende un antagonista, polipéptido o dominio variable de la invención con un intervalo de tamaños de partícula de menos de 5 micras, por ejemplo menos de 4,5, 5, 3,5 o 3 micras (por ejemplo, cuando están en el tampón de Britton-Robinson, por ejemplo a un pH de 6,5 a 8,0, por ejemplo, a un pH de 7 a 7,5, por ejemplo a un pH de 7 o un pH de 7,5).

En una realización, las formulaciones y composiciones de la invención se proporcionan a un pH de 6,5 a 8,0, por ejemplo 7 a 7,5, por ejemplo 7, por ejemplo 7,5.

Los dominios variables de acuerdo con cualquier aspecto de la invención puede tener una T_m de al menos 50 °C, o al menos 55 °C, o al menos 60 °C, o al menos 65 °C, o al menos 70 °C. Un antagonista, uso, procedimiento, dispositivo o formulación de la invención puede comprender tal dominio variable.

En un aspecto de la divulgación, los polipéptidos, dominios variables, antagonistas, composiciones o formulaciones de la invención son sustancialmente estables tras la incubación (a una concentración de polipéptido o de dominio variable de 1 mg/ml) a 37 a 50 °C durante 14 días en tampón de Britton-Robinson. En una realización, al menos un

65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% del polipéptido, antagonista o dominio variable permanece sin agregar tras tal incubación a 37 grados C. En una realización, al menos un 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% del polipéptido o el dominio variable permanecen monoméricos tras tal incubación a 37 grados C. En una realización, al menos un 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% del polipéptido, antagonista o dominio variable permanece no agregado tras tal incubación a 50 grados C. En una realización, al menos un 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% del polipéptido o el dominio variable permanece monomérico tras tal incubación a 50 grados C. En una realización, la no agregación de los polipéptidos, dominios variables, antagonistas se aprecia después de cualquiera de tales incubaciones. En una realización el pl del polipéptido o dominio variable permanece sin cambios o sustancialmente sin cambios tras la incubación a 37 grados C a una concentración del polipéptido o el dominio variable de 1 mg/ml en tampón Britton-Robinson.

En un aspecto de la divulgación, los polipéptidos, dominios variables, antagonistas, composiciones o formulaciones de la invención son sustancialmente estables tras la incubación (a una concentración de polipéptido o dominio variable de 100 mg/ml) a 4 °C durante 7 días en tampón Britton-Robinson a un pH de 7 a 7,5 (por ejemplo, a pH 7 o pH 7,5). En una realización, al menos un 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 o 99,5% del polipéptido o el dominio variable permanece no agregado tras tal incubación. En una realización, al menos un 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 o 99,5% del polipéptido o el dominio variable permanece monomérico tras tal incubación. En una realización, la no agregación de los polipéptidos, dominios variables, antagonistas se aprecia después de una cualquiera de tales incubaciones.

En un aspecto de la divulgación, los polipéptidos, dominios variables, antagonistas, composiciones o formulaciones de la invención son sustancialmente estables tras la nebulización (a una concentración de polipéptido o de dominio variable de 40 mg/ml) por ejemplo, a temperatura ambiente, 20 grados C o 37 °C, durante 1 hora, por ejemplo, en un nebulizador de chorro, por ejemplo la cubeta de un Pari LC +. En una realización, al menos un 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 o 99,5% del polipéptido, antagonista, o dominio variable permanece no agregado tras tal nebulización. En una realización, al menos un 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 o 99,5% del polipéptido, antagonista, o dominio variable permanece monomérico tras tal nebulización. En una realización, la no agregación de los polipéptidos, dominios variables, antagonistas se aprecia después de una cualquiera de tal nebulización.

Los dominios variables de acuerdo con cualquier aspecto de la invención pueden neutralizar la liberación de IL-8 estimulada por el TNF α en un ensayo celular MRC-5 con DN50 de 2 nM a 50 pM. Un antagonista, uso, procedimiento, dispositivo o formulación de la invención puede comprender tal dominio variable.

En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico asilado o recombinante que codifica un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina de acuerdo con cualquier aspecto de la invención. En un aspecto, la invención proporciona un vector que comprende el ácido nucleico. En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para producir el polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, comprendiendo el procedimiento el mantenimiento de la célula huésped bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho ácido nucleico o vector, de manera que se produzca un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina. El procedimiento puede además comprender el aislamiento del polipéptido, dominio variable o antagonista y opcionalmente la producción de una variante, por ejemplo una variante mutada, que tenga una afinidad y/o DN50 mejores que el polipéptido, dominio variable o antagonista aislado. Las técnicas para mejorar la afinidad de unión del dominio variable único de inmunoglobulina se conocen en la técnica, por ejemplo, técnicas por maduración de afinidad.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido o un antagonista de cualquier aspecto de la invención, y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina o el antagonista de cualquier aspecto de la invención comprende un dominio constante de anticuerpo, por ejemplo, un Fc de anticuerpo, opcionalmente en que el extremo N del Fc está unido (opcionalmente unido directamente) al extremo C del dominio variable.

El polipéptido o el dominio variable de la invención puede ser aislado y/o recombinante.

Se describe en el presente documento un procedimiento para seleccionar un péptido o polipéptido resistente a proteasas. El procedimiento comprende proporcionar un repertorio de péptidos o polipéptidos, combinar el repertorio y la proteasa bajo condiciones adecuadas para la actividad de la proteasa, y recuperar un péptido o polipéptido que tenga la actividad biológica deseada (por ejemplo, la unión específica al TNFR1), de manera que se selecciona un péptido o polipéptido resistente a proteasa.

El repertorio y la proteasa se incuban generalmente durante un periodo de al menos aproximadamente 30 minutos. Se puede utilizar cualquier proteasa que ese desee en el procedimiento, tal como una o más de las siguientes, serina proteasa, cisteína proteasa, aspartato proteasa, tiol proteasas, metaloproteasa de la matriz, carboxipeptidasa (por ejemplo, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B), tripsina, quimiotripsina, pepsina, papaína, elastasa,

leucozima, pancreatina, trombina, catepsinas (por ejemplo, catepsina G), proteinasa (por ejemplo, proteinasa 1, proteinasa 2, proteinasa 3), termolisina, quimosina, enteropeptidasa, caspasa (por ejemplo, caspasa 1, caspasa 2, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 9, caspasa 12, caspasa 13), calpaína, ficaina, clostripaína, actinidaína, bromelaína, y separasa. En realizaciones particulares, la proteasa es tripsina, elastasa o leucozima. La proteasa también se puede proporcionar en un extracto biológico, un homogenado biológico o una preparación biológica. Si se desea, el procedimiento comprende además la adición de un inhibidor de proteasa a la combinación del repertorio y la proteasa después de que se complete la incubación.

En algunas realizaciones, un péptido o polipéptido que tiene la actividad biológica deseada se recupera basándose en la actividad de unión. Por ejemplo, el péptido o polipéptido se puede recuperar basándose en la unión con un ligando genérico, tal como la proteína A, proteína G o proteína L. La actividad de unión también puede ser específica de un ligando diana. Ligandos diana ejemplares incluyen entre ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, CEA, CD40, Ligando CD40, CD56, CD38, CD138, EGF, receptor EGF, ENA-78, Eotaxina, Eotaxin-2, Exodus-2, FAPα, FGF-ácido, FGF-básico, factor de crecimiento de fibroblastos -10, ligando FLT3, Fractalquina (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF-β1, albúmina sérica humana, insulina, IFN-γ, IGF-I, IGF-II, IL-1α, 1L-1β, IL-1 receptor, receptor IL-1 tipo 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 aa), IL-8 (77 aa), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inhibina α, Inhibina β, IP-10, factor de crecimiento de queratinocitos -2 (KGF-2), KGF, Leptina, LIF, Linfotactina, sustancia inhibidora Mulleriana, factor inhibidor de colonias de monocitos, proteína atrayente de monocitos, M-CSF, MDC (67 aa), MDC (69 aa), MCP-1 (MCAF), MCP-2 MCP-3, MCP-4, MDC (67 aa), MDC (69 aa), MIG, MIP-1α, MIP-1β MIP-3α, MIP-3β, MIP-4, factor inhibidor progenitor mieloide -1 (MIPF-1), NAP-2, Neurturina, factor de crecimiento de nervios, β-NGF, NT-3, NT-4, Oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1α, SDF1β, SCF, SCGF, factor de células madre (SCF), TARC, TGF-α, TNF-α, TGF-β2, TGF-β3, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF-α, TNF-β, TNF I, TNF II, TNIL-1, TPO, VEGF, VEGF A, VEGF B; VEGF C, VEGF D, receptor VEGF 1, receptor VEGF 2, receptor VEGF 3, GCP-2, GRO/MGSA, GRO-β, GRO-γ, HCC1, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3, HER 4, seroalbúmina, vWF, proteínas amiloides (por ejemplo, amiloide alfa), MMP12, PDK1, IgE, IL-13Rα1, IL-13Rα2, IL-15, IL-15R, I-16, IL-17R, IL-17, IL-18, IL-18R, IL-23 II-23R, IL-25, CD2, CD4, CD11a, CD23, CD25, CD27, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD56, CD138, ALK5, EGFR, FcER1, TGFb, CCL2, CCL18, CEA, CR8, CTGF, CXCL12 (SDF-1), quimasa, FGF, Furina, Endotelina-1, Eotaxinas (por ejemplo, Eotaxina, Eotaxina-2, Eotaxina-3), GMCSF, ICAM-1, ICOS, IgE, IFNa, I-309, integrinas, L-selectina, MIF, MIP4, MDC, MCP-1, MMPs, elastasa de neutrófilos, osteopontina, OX-40, PARC, PD-1, RANTES, SCF, SDF-1, siglec8, TARC, TGFb, Trombina, Tim-1, TNF, TRANCE, Triptasa, VEGF, VLA-4, VCAM, α4β7, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, alfavbeta6, alfavbeta8, cMET, CD8, vWF, proteínas amiloides (por ejemplo, amiloide alfa), MMP12, PDK1, e IgE.

En realizaciones particulares, el péptido o polipéptido se recupera por selección.

En algunas realizaciones, el repertorio comprende un sistema de presentación. Por ejemplo, el sistema de presentación puede ser presentación en un bacteriófago, presentación en un ribosoma, compartimentación en emulsión y presentación, presentación en levaduras, presentación de puromicina, presentación bacteriana, presentación en plásmido, o presentación covalente. Los sistemas de presentación se unen a la función codificante de un ácido nucleico y las características del péptido o polipéptido codificado por el ácido nucleico. En realizaciones particulares, el sistema de presentación comprende paquetes genéticos replicables.

En algunas realizaciones, el sistema de presentación comprende un bacteriófago de presentación. Por ejemplo, el bacteriófago puede ser fd, M13, lambda. MS2 o T7. En realizaciones particulares, el sistema de presentación en bacteriófago es multivalente. En algunas realizaciones, el péptido o polipéptido se presenta como una proteína de fusión pIII.

En otras realizaciones, el procedimiento comprende además la amplificación del ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido que tiene la actividad biológica deseada. En realizaciones particulares, el ácido nucleico se amplifica por amplificación de fago, cultivo celular o reacción en cadena de la polimerasa.

En algunas realizaciones, el repertorio es un repertorio de dominios variables únicos de inmunoglobulinas. En realizaciones particulares, el dominio variable único de inmunoglobulina es un dominio variable de cadena pesada. En realizaciones más particulares, el dominio variable de cadena pesada es un dominio variable de cadena pesada humano. En otras realizaciones, el dominio variable único de inmunoglobulina es un dominio variable de cadena ligera. En realizaciones particulares, el dominio variable de cadena ligera es un dominio variable de cadena ligera humano.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para seleccionar un péptido o polipéptido que se une a un ligando diana (por ejemplo, TNFR1) con alta afinidad a partir de un repertorio de péptido o polipéptidos. El procedimiento comprende proporcionar un repertorio de péptidos o polipéptidos, combinando el repertorio y una proteasa bajo condiciones adecuadas para la actividad de la proteasa, y recuperando un péptido o polipéptido que se une al ligando diana.

El repertorio y la proteasa se incuban generalmente durante un periodo de al menos aproximadamente 30 minutos. Se puede utilizar cualquier proteasa que se desee en el procedimiento, tal como una de las siguientes, serina proteasa, cisteína proteasa, aspartato proteasa, tiol proteasas, metaloproteasa de la matriz, carboxipeptidasa (por

ejemplo, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B), tripsina, quimiotripsina, pepsina, papaína, elastasa, leucozima, pancreatina, trombina, catepsinas (por ejemplo, catepsina G), proteinasa (por ejemplo, proteinasa 1, proteinasa 2, proteinasa 3), termolisina, quimosina, enteropeptidasa, caspasa (por ejemplo, caspasa 1, caspasa 2, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 9, caspasa 12, caspasa 13), calpaína, ficaina, clostripaína, actinidaína, bromelaína, y separasa.

5 En realizaciones particulares, la proteasa es tripsina, elastasa o leucozima. La proteasa también se puede proporcionar en un extracto biológico, un homogenado biológico o una preparación biológica. Si se desea, el procedimiento comprende además la adición de un inhibidor de proteasa a la combinación del repertorio y la proteasa después de que se complete la incubación.

10 El péptido o polipéptido se puede recuperar basándose en la unión con cualquier ligando diana deseado, tal como los ligandos diana desvelados en el presente documento (por ejemplo, el TNFR1). En realizaciones particulares, el péptido o polipéptido se recuperan por selección.

15 En algunas realizaciones, el repertorio comprende un sistema de presentación. Por ejemplo, el sistema de presentación puede ser presentación en un bacteriófago, presentación en un ribosoma, compartimentación en emulsión y presentación, presentación en levaduras, presentación de puromicina, presentación bacteriana, presentación en plásmido, o presentación covalente. Los sistemas de presentación se unen a la función codificante de un ácido nucleico y las características del péptido o polipéptido codificado por el ácido nucleico. En realizaciones particulares, el sistema de presentación comprende paquetes genéticos replicables.

20 En algunas realizaciones, el sistema de presentación comprende un bacteriófago de presentación. Por ejemplo, el bacteriófago puede ser fd, M13, lambda. MS2 o T7. En realizaciones particulares, el sistema de presentación en bacteriófago es multivalente. En algunas realizaciones, el péptido o polipéptido se presenta como una proteína de fusión pIII.

En otras realizaciones, el procedimiento comprende además la amplificación del ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido que tiene la actividad biológica deseada. En realizaciones particulares, el ácido nucleico se amplifica por amplificación de fago, cultivo celular o reacción en cadena de la polimerasa.

25 En algunas realizaciones, el repertorio es un repertorio de dominios variables únicos de inmunoglobulinas. En realizaciones particulares, el dominio variable único de inmunoglobulina es un dominio variable de cadena pesada. En realizaciones más particulares, el dominio variable de cadena pesada es un dominio variable de cadena pesada humano. En otras realizaciones, el dominio variable único de inmunoglobulina es un dominio variable de cadena ligera. En realizaciones particulares, el dominio variable de cadena ligera es un dominio variable de cadena ligera humano.

30 En otro aspecto, en el presente documento se describe un procedimiento de producción de un repertorio de péptido o polipéptidos resistentes a proteasa. El procedimiento comprende proporcionar un repertorio de péptidos o polipéptidos, combinar el repertorio de péptidos o polipéptidos y una proteasa bajo condiciones adecuadas para la actividad proteasa, y recuperar una pluralidad de péptidos o polipéptidos que tiene la actividad biológica deseada, de forma que se produce un repertorio de péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa.

35 En algunas realizaciones, el repertorio y la proteasa se incuban durante un periodo de al menos aproximadamente 30 minutos. Por ejemplo, la proteasa utilizada en el procedimiento puede ser una o más de las siguientes, serina proteasa, cisteína proteasa, aspartato proteasa, tiol proteasas, metaloproteasa de la matriz, carboxipeptidasa (por ejemplo, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B), tripsina, quimiotripsina, pepsina, papaína, elastasa, leucozima, pancreatina, trombina, catepsinas (por ejemplo, catepsina G), proteinasa (por ejemplo, proteinasa 1, proteinasa 2, proteinasa 3), termolisina, quimosina, enteropeptidasa, caspasa (por ejemplo, caspasa 1, caspasa 2, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 9, caspasa 12, caspasa 13), calpaína, ficaina, clostripaína, actinidaína, bromelaína, y separasa. En realizaciones particulares, la proteasa es tripsina, elastasa o leucozima. La proteasa también se puede proporcionar en un extracto biológico, un homogenado biológico o una preparación biológica. Si se desea, el procedimiento comprende además la adición de un inhibidor de proteasa a la combinación del repertorio y la proteasa después de que se complete la incubación.

40 En algunas realizaciones, se recuperan una pluralidad de péptidos o polipéptidos que tienen una actividad biológica deseada basándose en la actividad de unión. Por ejemplo, se puede recuperar una pluralidad de péptidos o polipéptidos basándose en la unión a un ligando genérico, tal como la proteína A, proteína G o proteína L. La actividad de unión también puede ser la unión específica de un ligando diana, tal como un ligando diana descrito en el presente documento. En realizaciones particulares, se recupera una pluralidad de péptidos o polipéptidos que tienen la actividad biológica deseada por selección.

45 En algunas realizaciones, el repertorio comprende un sistema de presentación. Por ejemplo, el sistema de presentación puede ser presentación en un bacteriófago, presentación en un ribosoma, compartimentación en emulsión y presentación, presentación en levaduras, presentación de puromicina, presentación bacteriana, presentación en plásmido, o presentación covalente. Los sistemas de presentación se unen a la función codificante de un ácido nucleico y las características del péptido o polipéptido codificado por el ácido nucleico. En realizaciones particulares, el sistema de presentación comprende paquetes genéticos replicables.

En algunas realizaciones, el sistema de presentación comprende un bacteriófago de presentación. Por ejemplo, el bacteriófago puede ser fd, M13, lambda. MS2 o T7. En realizaciones particulares, el sistema de presentación en bacteriófago es multivalente. En algunas realizaciones, el péptido o polipéptido se presenta como una proteína de fusión pIII.

- 5 En otras realizaciones, el procedimiento comprende además la amplificación del ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido que tiene la actividad biológica deseada. En realizaciones particulares, el ácido nucleico se amplifica por amplificación de fago, cultivo celular o reacción en cadena de la polimerasa.

En algunas realizaciones, el repertorio es un repertorio de dominios variables únicos de inmunoglobulinas. En realizaciones particulares, el dominio variable único de inmunoglobulina es un dominio variable de cadena pesada. En realizaciones más particulares, el dominio variable de cadena pesada es un dominio variable de cadena pesada humano. En otras realizaciones, el dominio variable único de inmunoglobulina es un dominio variable de cadena ligera. En realizaciones particulares, el dominio variable de cadena ligera es un dominio variable de cadena ligera humano.

- 10 En realizaciones más particulares, el dominio variable de cadena pesada es un dominio variable de cadena pesada humano. En otras realizaciones, el dominio variable único de inmunoglobulina es un dominio variable de cadena ligera. En realizaciones particulares, el dominio variable de cadena ligera es un dominio variable de cadena ligera humano.
- 15 En otro aspecto, en el presente documento se describe un procedimiento para seleccionar un polipéptido resistente a proteasa que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina (dAb) que se une a un ligando diana (por ejemplo, el TNFR1) a partir de un repertorio. En una realización, el procedimiento comprende proporcionar un sistema de presentación en fago que comprende un repertorio de polipéptidos que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, combinar el sistema de presentación en fago y una proteasa que se selecciona del grupo que consiste en elastasa, leucozima y tripsina, bajo condiciones adecuadas para la actividad proteasa, y recuperar un fago que presenta un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina que se une al ligando diana.

En algunas realizaciones, la proteasa se utiliza a 100 µg/ml, y el sistema de presentación en fago y la proteasa combinados se cultivan a aproximadamente a 37 °C durante una noche.

- 25 En algunas realizaciones, el fago que presenta un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina que se une al ligando diana se recupera uniéndose a dicha diana. En otras realizaciones, el fago que presenta un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina que se une al ligando diana se recupera por selección.

También se describe un péptido o polipéptido resistente a proteasa aislado que se puede seleccionar o se selecciona por procedimientos que se describen en el presente documento. En una realización particular, se proporciona un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a proteasa (por ejemplo, tripsina, elastasa, leucozima) aislado (por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo humano, un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo humano) que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento.

- 30 También se describe un péptido o polipéptido resistente a proteasa aislado que se puede seleccionar o se selecciona por procedimientos que se describen en el presente documento. En una realización particular, se proporciona un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a proteasa (por ejemplo, tripsina, elastasa, leucozima) aislado (por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo humano, un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo humano) que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento.
- 35 Se describe además en el presente documento un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica un péptido o polipéptido resistente a proteasa (por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa, o leucozima) que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento, y a los vectores (por ejemplo, vectores de expresión) y células huésped que comprenden los ácidos nucleicos.

Se describe además en el presente documento un péptido o polipéptido resistente a proteasa (por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa, o leucozima) que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento, que comprende el mantenimiento de una célula huésped que contienen un ácido nucleico recombinante que codifica el péptido o polipéptido resistente a proteasa bajo condiciones adecuadas para la expresión, produciéndose de esta manera un péptido o polipéptido resistente a proteasa.

- 40 Se describe además en el presente documento un péptido o polipéptido resistente a proteasa (por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa, o leucozima) que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento para su uso en medicina (por ejemplo, para terapia o diagnóstico). Se describe además en el presente documento el uso de un péptido o polipéptido resistente a proteasa (por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa, o leucozima) que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad. Se describe además en el presente documento un péptido o polipéptido resistente a proteasa (por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa, o leucozima) que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad.
- 45 Se describe además en el presente documento un péptido o polipéptido resistente a proteasa (por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa, o leucozima) que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento para su uso en medicina (por ejemplo, para terapia o diagnóstico). Se describe además en el presente documento el uso de un péptido o polipéptido resistente a proteasa (por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa, o leucozima) que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad. Se describe además en el presente documento un péptido o polipéptido resistente a proteasa (por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa, o leucozima) que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad.
- 50 Se describe además en el presente documento un péptido o polipéptido resistente a proteasa (por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa, o leucozima) que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento para su uso en medicina (por ejemplo, para terapia o diagnóstico). Se describe además en el presente documento el uso de un péptido o polipéptido resistente a proteasa (por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa, o leucozima) que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad. Se describe además en el presente documento un péptido o polipéptido resistente a proteasa (por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa, o leucozima) que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

- 55 Se describe además en el presente documento un kit de diagnóstico para determinar si está presente el TNFR1 en una muestra o cuanto TNFR1 está presente en una muestra, que comprende un polipéptido, dominio variable de inmunoglobulina (dAb) o antagonista de la invención e instrucciones para su uso (por ejemplo, para determinar la presencia y/o cantidad de TNFR1 en la muestra). En algunas realizaciones, el kit comprende además uno o más

agentes auxiliares, tales como un tampón adecuado o un agente de detección adecuado (por ejemplo, un anticuerpo marcado que se puede detectar o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une al polipéptido o dAb de la invención o a un resto asociado o conjugado a él.

La divulgación también se refiere a un dispositivo que comprende una superficie sólida en la que se inmoviliza un polipéptido, antagonista o dAb de la invención tal que el polipéptido o dAb inmovilizado se une al TNFR1. Se puede utilizar cualquier superficie sólida adecuada en la que se pueda inmovilizar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, por ejemplo, cristal, plástico, carbohidratos (por ejemplo, perlas de agarosa). Se desea el soporte puede contener o modificarse para que contenga grupos funcionales que se deseen para facilitar la inmovilización. El dispositivo, y/o el soporte, pueden tener cualquier forma adecuada, por ejemplo, una lámina, bastoncillo, tira, placa, portaobjetos, perla, aglomerado, disco, gel, tubo, esfera, placa o plato, y similares. En algunas realizaciones, el dispositivo es una varilla.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una ilustración del sitio de clonación múltiple pDOM13 (aka pDOM33), que se utilizó para preparar un repertorio de fagos de presentación.

La FIG. 2 muestra varios geles Tricina Novex al 10-20% en proceso con muestras de diferentes puntos de tiempo de dAb que se incubaron con tripsina a 40 ug/ml a 30 °C. Las muestras se tomaron inmediatamente antes de la adición de tripsina y luego en una hora, tres horas y 24 horas tras la adición de tripsina. Las proteínas se tiñeron con 1 x SureBlue. Los geles ilustran que ambos DOM15-10 y DOM15-26-501 estaban digeridos significativamente durante las tres primeras horas de incubación con tripsina. La digestión de DOM15-26, DOM4-130-54 y DOM1h-131-511 solo se volvía aparente tras 24 horas de incubación con tripsina.

La FIG. 3 es una ilustración de las secuencias de aminoácidos de DOM1h-131-511 y 24 variantes seleccionadas. Los aminoácidos que se diferencian de la secuencia parental en los clones seleccionados se resaltan (los que son idénticos están marcados con puntos). Los bucles que corresponden a CDR1, CDR2 y CDR3 están encuadrados.

La FIG. 4 es una ilustración de las secuencias de aminoácidos de DOM4-130-54 y 27 variantes seleccionadas. Los aminoácidos que se diferencian de la secuencia parental en los clones seleccionados están resaltados (lo que son idénticos están marcados con puntos). Los bucles que corresponden a CDR1, CDR2 y CDR3 están encuadrados.

La FIG. 5 es una ilustración de las secuencias de aminoácidos de DOM15-26-555 y 21 variantes seleccionadas. Los aminoácidos que se diferencian de la secuencia parental en los clones seleccionados están resaltados (lo que son idénticos están marcados con puntos). Los bucles que corresponden a CDR1, CDR2 y CDR3 están encuadrados.

La FIG. 6 es una ilustración de las secuencias de aminoácidos de DOM15-10 y 16 variantes seleccionadas. Los aminoácidos que se diferencian de la secuencia parental en los clones seleccionados están resaltados (lo que son idénticos están marcados con puntos). Los bucles que corresponden a CDR1, CDR2 y CDR3 están encuadrados.

Las FIG. 7A-7D son los rastros BIAcore que muestran la unión de los dAb DOM1h-131-511 (FIG. 7A) y tres variantes de dAb, DOM1h-131-203 (FIG. 7B), DOM1h-131-204 (FIG. 7C) y DOM1h-131-206 (FIG. 7D), al TNFR1 inmovilizado tras la incubación con diferentes concentraciones de tripsina (que varían de 0 a 100 µg/ml) durante una noche a 37 °C. Los resultados muestran que las tres variantes son más resistentes que el parental a la proteólisis a altas concentraciones de tripsina (100 ug/ml).

Las FIG. 8A-8C son los rastros de BIAcore que muestran la unión de los dAb DOM1h-131-511 (FIG. 8A), DOM1h-131-202 (FIG. 8B) y DOM1h-131-206 (FIG. 8C) al TNFR1 inmovilizado tras la incubación con elastasa y leucosima durante una noche. Los dAb mostraban un aumento de resistencia a la proteólisis en comparación con el parental contra ambas elastasa y leucosima.

La FIG. 9 muestra dos geles Bis-Tris Novex 4-12% en proceso con muestras de los dAb DOM1h-131-511, DOM1h-131-203, DOM1h-131-204, DOM1h-131-206, DOM1h-131-54, DOM1h-131-201, y DOM1h-131-202 antes de la incubación con tripsina y muestras tras la incubación con 100 µg/ml de tripsina durante 1 hora, 3 horas y 24 horas.

Las FIG. 10A-10C son rastros BIAcore que muestran la unión de DOM4-130-54 (FIG. 10A), DOM4-130-201 (FIG. 10B) y DOM4-130-202 (FIG. 10C) a la proteína de fusión IL-1R1 inmovilizada, tras la incubación con diferentes concentraciones de tripsina (que varían de 0 a 100 µg/ml) durante una noche a 37 °C. Los resultados muestran que ambas variantes son más resistentes que su parental a la proteólisis a altas concentraciones de tripsina (100 µg/ml).

Las FIG. 11A-11C son rastros BIAcore que muestran la unión de DOM4-130-54 (FIG. 11A), DOM4-130-201 (FIG. 11B) y DOM4-130-202 (FIG. 11C) a la proteína de fusión IL-1R1 inmovilizada, tras la incubación con elastasa y leucosima durante una noche. Los dAb mostraban un aumento de la resistencia a la proteólisis en comparación con el parental contra ambas proteasas ensayadas.

- 5 La FIG. 12 es una ilustración de la secuencia de aminoácidos de DOM15-26-555 y 6 variantes. Los aminoácidos que se diferencian de la secuencia parental en los clones seleccionados están resaltados (los que son idénticos están marcados con puntos).

10 Las FIG. 13A y 13B son rastros BIAcore que muestran la unión del dAb parental, DOM15-26-555 (FIG. 13A) y la variante más resistente a proteasa, DOM15-26-593 (FIG. 13B) al VEGF inmovilizado. El parental y la variante se compararon en el BIAcore para la unión con el hVEGF a la concentración de dAb de 100 nM tras la incubación con tripsina a una concentración de 200 µg/ml. La reacción se llevó a cabo durante tres horas o 24 horas a 37 °C. Los resultados muestran que la variante es más resistente que el parental a la proteólisis tras 24 horas de tratamiento con tripsina.

15 La FIG. 14 es un gráfico que muestra los efectos del tratamiento con tripsina sobre el hVEGF unido a las variantes de DOM 15-26-555. Los resultados muestran claramente que todas las variantes son más resistentes que el parental (DOM15-26-555) a la proteólisis tras 24 horas de tratamiento con tripsina.

20 La FIG. 15 muestra dos geles Tricina Novex al 10-20% que se cargaron con 15 µg de muestras de DOM15-10 y DOM15-10-11. Las muestras se tomaron inmediatamente antes de la adición de tripsina, y luego a la hora, tres horas y 24 horas después de la adición de tripsina. Las proteínas se tiñeron con SureBlue (1x). Los resultados muestran que la actividad de unión que se aprecia en el estudio BIAcore refleja directamente la integridad de la proteína.

La FIG. 16 es una ilustración de la secuencia de aminoácidos de DOM15-10 y una variante, DOM15-10-11. Los aminoácidos que se diferencian de la secuencia parental en la variante están resaltados (los que son idénticos están marcados con puntos).

25 Las FIG. 17A y 17B son rastros BIAcore que muestran la unión del parental, DOM15-10 (FIG. 17A) y la variante, DOM15-10-11 (FIG. 17B), al VEGF inmovilizado. El parental y la variante se compararon con el BIAcore en cuanto a la unión de hVEGF al dAb con una concentración de 100 nM después de la incubación con tripsina a una concentración de 200 µg/ml. La reacción se llevó a cabo durante una hora, tres horas y 24 horas a 37 °C. Los resultados muestran que la variante es más resistente que el parental a la proteólisis tras 24 horas de tratamiento con tripsina.

La FIG. 18 muestra dos geles Tricina Novex 10-20% que se han cargado con 15 µg de muestras de DOM15-10 y DOM15-10-11. Las muestras se tomaron inmediatamente antes de la adición de tripsina, y luego a la hora, tres horas y 24 horas tras la adición de tripsina. Las proteínas se tiñeron con SureBlue (1x). Los resultados muestran que la actividad de unión que se aprecia en el estudio BIAcore refleja directamente la integridad de la proteína.

35 Las FIG. 19A-19L ilustran las secuencias de nucleótidos de varios ácidos nucleicos que codifican los dAb que son variantes de DOM1h-131-511 o DOM4-130-54. Las secuencias de nucleótidos codifican las secuencias de aminoácidos que se presentan en la FIG. 3 y la FIG. 4, respectivamente.

40 Las FIG. 20A-20E ilustran las secuencias de nucleótidos de varios ácidos nucleicos que codifican los dAb que son variantes de DOM15-26-555 o DOM15-10. Las secuencias de nucleótidos codifican las secuencias de aminoácidos que se presentan en las FIG. 5 y FIG 6, respectivamente.

La FIG. 21 muestra un mapa de vector del pDOM 38.

La FIG. 22 muestra un proceso en gel sobre Labchip de las proteínas DOM10-53-474 y DOM15-26-593 tratadas con tripsina con una relación 25:1 dAb:tripsina a 30 °C durante diferentes puntos de tiempo. Las flechas muestran la proteína de longitud completa.

45 La FIG. 23 es el rastro de una cromatografía de exclusión por tamaño que muestra el alto nivel de pureza que se obtiene en cada muestra después de la purificación por cromatografía MMC seguida por intercambio iónico. El UV se controló a 225 nm y la columna se ejecutó en 1x PBS con 10% de etanol (v/v). El porcentaje de monómeros se calculó por integración del área del pico con corrección de la línea base.

50 La FIG. 24 muestra los datos de estabilidad de proteasa para DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206.

La FIG. 25 es una SEC que ilustra los datos de estabilidad en 14 días de DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 y DOM1h-131-511 en tampón Britton-Robinson a 37 y 50 °C. La concentración para todos los dAb era 1 mg/ml. Se utilizó la SEC para determinar si había ocurrido algún cambio en la proteína durante el proceso térmico y la cantidad de monómero que se queda en la solución con respecto a la muestra en el tiempo = 0 (T0).

- Las FIG. 26A a I muestran los rastros de la SEC que muestran el efecto del proceso térmico (37 y 50 °C) sobre el DOM1h-131-511 (A a C), -202 (D a F) y -206 (G a I). También se muestra el porcentaje de monómero que permanece en la solución en un punto de tiempo determinado con respecto al T = 0.
- 5 La FIG. 27 Muestra los análisis IEF de DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 y DOM1h-131-511 a las 24 h, 48 h y 7 y 14 días de proceso térmico. Las muestras se habían incubado o a 37 o a 50 °C en tampón Britton-Robinson.
- La FIG. 28 es el RBA de TNFR-1 que muestra el efecto de 14 días de incubación de DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 y DOM1h-131-511 a 50 °C. Se asumía que la concentración de proteínas era 1 mg/ml. También se muestra un control negativo dAb (VH simulado) que no se une al antígeno.
- 10 La FIG. 29 ilustra los efectos del almacenamiento A: DOM1h-131-202, B: DOM1h-131-206 y C: DOM1h-131-511 a ~ 100 mg/ml durante 7 días en tampón Britton-Robinson a +4 °C. Se controló el UV a 280 nm.
- La FIG. 30 muestra los datos del ensayo de nebulizador de DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 y DOM1h-131-511 en el Pari E-flow y LC+. La concentración de proteína era de 5 mg/ml en tampón Britton-Robinson.
- La FIG. 31 ilustra los cambios en el porcentaje relativo en concentraciones de monómero durante la nebulización de DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 y DOM1h-131-511 en tampón de Britton-Robinson a 5 mg/ml.
- 15 La FIG. 32 muestra los rastros de la SEC de DOM1h-131-206 y DOM1h-131-511 en tampón Britton-Robinson tras la nebulización con el Pari LC+.
- La FIG. 33 muestra los rastros de la SEC de DOM1h-131-206 durante el proceso de nebulización durante 1 hora a 40 mg/ml en PBS. La proteína tanto en la cubeta del nebulizador y el aerosol tiene una alta resistencia a los efectos de cizalladura y proceso térmico que puede experimentar el dAb durante la nebulización.
- 20 La FIG. 34 muestra las curvas de velocidad de sedimentación para cada una de las tres proteínas candidatas (DOM1h-131-206 y DOM1h-131-511 y DOM1h-131-202). El pico bimodal que se observa para la muestra con la concentración más baja de DOM1h-131-206 es un artefacto que se debe a una fuga de la célula en este caso.
- La FIG. 35 muestra el efecto del tampón y el dispositivo sobre el tamaño de las gotas de GSK1995056A (DOM1h-131-511).
- 25 La FIG. 36 es la estabilidad del GSK1995056A (DOM1h-131-511) después de la nebulización en varios dispositivos evaluados por la formación de un dímero como se mide por SEC.
- La FIG. 37 muestra el ensayo del nebulizador de GSK1922567A (202), GSK1995057A (206) y GSK1995056A (511) en el Pari E-flow y LC+. A) ensayo en tampón de Britton-Robinson, B) ensayo en tampón PEG 1000/sacarosa.
- 30 La FIG. 38 representa una curva de dosis de TNF- α en el ensayo de unión al receptor TNFR-1 humano. Cada muestra se ensayó cuatro veces.
- La FIG. 39 muestra la inhibición por GSK1922567A (DOM1h-131-202), GSK1995057A (DOM1h-131-206) y GSK1995056A (DOM1h-131-511) en el ensayo de unión al receptor TNFR-1 humano. Cada muestra se ensayó cuatro veces.
- 35 La FIG. 40 ilustra la potencia de los dAb DOM15-26 y DOM15-26-593 en el VEGF RBA.
- La FIG. 41 muestra la farmacocinética de DMS1529 (DOM 15-26-593) y DMS1545 (DOM15-26-501) tras la administración de una dosis en embolada única i.v. a ratas a 5 mg/ml.
- 40 La FIG. 42A muestra el análisis SEC-MALLs (cromatografía de exclusión por tamaño-dispersión de luz láser multi-ángulo) de la fusión DMS 1529 Fc (fusión DOM 15-26-593 Fc) que confirma las propiedades monoméricas. Se muestran dos lotes diferentes que demuestran propiedades similares con respecto al índice de refracción (es decir, la concentración, líneas interrumpidas) y la dispersión de luz (líneas continuas). La línea marcada con la flecha significa el cálculo de la masa molecular.
- 45 La FIG. 42B muestra el análisis AUC (ultracentrifugación analítica) de la fusión DMS 1529 Fc (fusión DOM 15-26-593 Fc) que confirma las propiedades monoméricas. Se ensayó un lote de material a tres concentraciones diferentes, que se aproximan a 0,2, 0,5 y 1,0 mg/ml en tampón PBS. El análisis de la tasa de sedimentación confirmaba una masa molecular de aproximadamente 80 kDa.
- La FIG. 43 muestra los rastros DSC de DMS1529 (DOM15-26-593) y DOM15-26-501.
- La FIG. 44 es un ELISA de unión VEGF para DMS 1529 (DOM 15-26-593) antes y después de 10 ciclos de congelación-descongelación en dos lotes diferentes de material.

La FIG. 45 muestra la consistencia del perfil SEC de DOM 15-26-593 antes y después de 10 ciclos de congelación-descongelación.

La FIG. 46 ilustra los resultados de un estudio de estabilidad acelerada de la fusión DMS 1529 Fc (fusión DOM 15-26-593 Fc); demostrando el ELISA de unión que la actividad tras 7 días de incubación a la temperatura que se muestra.

La FIG. 47A muestra la estabilidad de DMS 1529 (DOM 15-26-593) en Cynomolgus humano tras 14 y 15 días de incubación a 37 °C.

La FIG. 47B muestra la estabilidad de DMS 1529 (DOM 15-26-593) en suero humano tras 14 y 15 días de incubación a 37 °C.

La FIG. 48 muestra la potencia de los dAb DOM15-26 y DOM15-26-593 como fusiones con Fc (DMS 1564 y 1529, respectivamente) en el VEGF RBA.

La FIG. 49 ilustra la inhibición de la proliferación de células HUVEC por la fusión DMS 1529 Fc (fusión DOM 15-26-593 Fc).

La FIG. 50 es el mapa del vector pDom33.

La FIG. 51 representa las secuencias (de aminoácidos y nucleótidos) de los dAb que se unen a la albúmina sérica.

Descripción detallada de la invención

A menos de que se indique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habituado en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácido nucleico, técnicas de hibridación y bioquímica). Se utilizan técnicas de referencia para los procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase en general, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d 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.) y procedimientos químicos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “antagonista del receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR-1)” o “ antagonista anti-TNFR-1” o similares se refiere a un agente (por ejemplo, una molécula, un compuesto) que se une al TNFR-1 y puede inhibir una (es decir, una o más) de las funciones del TNFR-1. Por ejemplo, una antagonista del TNFR-1 puede inhibir la unión del TNF α al TNFR-1 y/o inhibir la transducción de la señal mediada por medio de TNFR-1. En consecuencia, se pueden inhibir los procesos mediados por TNFR-1 y las respuestas celulares (por ejemplo, muerte celular inducida por el TNF α en un ensayo de toxicidad de referencia en L929) con un antagonista del TNFR-1.

Como se utiliza en el presente documento, “péptido” se refiere a aproximadamente dos a aproximadamente 50 aminoácidos que están unidos en conjunto por enlaces peptídicos.

Como se utiliza en el presente documento, “polipéptido” se refiere a al menos aproximadamente dos a aproximadamente 50 aminoácidos que están unidos en conjunto por enlaces peptídicos. Los polipéptidos en general comprenden una estructura terciaria y plegamiento en dominios funcionales.

Como se utiliza en el presente documento, un péptido o polipéptido (por ejemplo un dominio de anticuerpo (dAb)) que es “resistente a la degradación por proteasa” no se degrada sustancialmente por una proteasa cuando se incuba con la proteasa bajo condiciones adecuadas para la actividad de la proteasa. Un polipéptido (por ejemplo, un dAb) no se degrada sustancialmente, cuando se degrada no más de aproximadamente un 25%, no más de aproximadamente un 20%, no más de aproximadamente un 15%, no más de aproximadamente un 14%, no más de aproximadamente un 13%, no más de aproximadamente un 12%, no más de aproximadamente un 11%, no más de aproximadamente un 10%, no más de aproximadamente un 9%, no más de aproximadamente un 8%, no más de aproximadamente un 7%, no más de aproximadamente un 6%, no más de aproximadamente un 5%, no más de aproximadamente un 4%, no más de aproximadamente un 3%, no más de aproximadamente un 2%, no más de aproximadamente un 1%, o sustancialmente nada de la proteína por la proteasa tras la incubación con la proteasa durante aproximadamente una hora a una temperatura adecuada para la actividad de la proteasa. Por ejemplo a 37 a 50 grados C. La degradación de la proteína se puede evaluar utilizando cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, por SDS-PAGE o por un ensayo funcional (por ejemplo, unión al ligando) como se describe en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, “sistema de presentación” se refiere a un sistema en el que una colección de polipéptidos o péptidos son accesibles para la selección basada en una característica deseada, tal como una característica física, química o funcional. El sistema de presentación puede ser un repertorio adecuado de polipéptidos o péptidos (por ejemplo, en una solución, inmovilizados en un soporte adecuado). El sistema de

presentación puede ser también un sistema que emplea un sistema de expresión celular (por ejemplo, la expresión de una biblioteca de ácidos nucleicos en, por ejemplo, células transformadas, infectadas, transfectadas o transducidas y presentan los polipéptidos codificados en la superficie de las células) o un sistema de expresión acelular (por ejemplo, compartimentación en emulsión y presentación). Los sistemas de presentación ejemplares unen la función codificante de un ácido nucleico y las características físicas, químicas y/o funcionales de un polipéptido o péptido codificado por el ácido nucleico. Cuando se emplea tal sistema de presentación, se pueden seleccionar los polipéptidos o péptidos que tienen características físicas, químicas y/o funcionales deseadas y se puede fácilmente aislar o recuperar un ácido nucleico que codifica el polipéptido o péptido seleccionado. Se conocen en la técnica varios sistemas de presentación que unen la función codificante de un ácido nucleico y las características físicas, químicas y/o funcionales de un polipéptido o péptido, por ejemplo, la presentación en bacteriófago (fago de presentación, por ejemplo fagémido de presentación), presentación en ribosoma, compartimentación en emulsión y presentación, presentación en levaduras, presentación en puromicina, presentación bacteriana, presentación en plásmido, presentación covalente y similares. (Véase, por ejemplo, el documento EP 0436597 (Dyax), Patente de EE. UU. N° 6.172.197 (McCafferty y col.), Patente de EE. UU. N° 6.489.103 (Griffiths y col.)).

Como se utiliza en el presente documento, "repertorio" se refiere a una colección de polipéptidos o péptidos que se caracterizan por una diversidad de secuencia de aminoácidos. Los miembros individuales de un repertorio pueden tener características comunes, tales como características estructurales comunes (por ejemplo, una estructura central común) y/o características funcionales comunes (por ejemplo, la capacidad de unión a un ligando común (por ejemplo un ligando genérico o un ligando diana, TNFR-1)),

Como se utiliza en el presente documento, "funcional" describe un polipéptido o péptido que tiene una actividad biológica; tal como una actividad de unión específica. Por ejemplo, la expresión "polipéptido funcional" incluye un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a un antígeno diana por medio de su sitio de unión al antígeno.

Como se utiliza en el presente documento, "ligando genérico" se refiere a un ligando que se une a una parte sustancial de (por ejemplo, sustancialmente todos) los miembros funcionales de un repertorio determinado. Un ligando genérico (por ejemplo, un ligando genérico común) puede unirse a muchos miembros de un determinado repertorio incluso con los miembros que pueden no tener una especificidad de unión con un ligando diana común. En general, la presencia de un sitio de unión al ligando genérico en un polipéptido (como se indica por la capacidad de unirse a un ligando genérico) indica que el polipéptido está plegado correctamente y es funcional. Los ejemplos adecuados de ligandos genéricos incluyen los superantígenos, anticuerpos que se unen a un epítipo que se expresa en una parte sustancial de los miembros funcionales de un repertorio, y similares.

"Superantígeno" es un término de la técnica que se refiere a ligandos genéricos que interactúan con miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas en un sitio que es distinto de los sitios de unión a ligandos diana de estas proteínas. Las enterotoxinas estafilocócicas son ejemplos de superantígenos que interactúan con los receptores de los linfocitos T. Los superantígenos que se unen a los anticuerpos incluyen la Proteína G, que se une a la región constante de la IgG (Bjorck y Kronvall, J. Immunol., 133:969 (1984)); la Protein A que se une a la región constante de IgG y dominios VH (Forsgren y Sjoquist, J. Immunol., 97:822 (1966)); y la Proteína L que se une a los dominios VL (Bjorck, J. Immunol., 140:1194 (1988)).

Como se utiliza en el presente documento, "ligando diana" se refiere a un ligando que se une específicamente o selectivamente a un polipéptido o péptido. Por ejemplo, cuando el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, el ligando diana puede ser cualquier antígeno o epítipo que se desee. La unión al antígeno diana depende de que el polipéptido o péptido sea funcional.

Como se utiliza en el presente documento se refiere a una IgG, IgM, IgA, IgD o IgE o un fragmento (tal como un Fab, F(ab')₂, Fv, Fv unido por enlaces disulfuro, scFv, anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada, scFv unido por enlaces disulfuro, diacuerpo) tanto si se derivan de cualquier especie que produce naturalmente un anticuerpo, o creados por tecnología de ADN recombinante; como si se aíslan del suero, linfocitos B, hibridomas, transfectomas, levaduras o bacterias.

Como se utiliza en el presente documento, "formato de anticuerpo" se refiere a cualquier estructura polipeptídica en la que se pueden incorporar uno o más dominios variables de anticuerpo de forma que le confiere la especificidad de unión para el antígeno en la estructura. Se conoce en la técnica una variedad de formatos de anticuerpo adecuados, tales como, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de cadena simple, anticuerpo biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpo, cadenas ligeras de anticuerpos, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas y/o cadenas ligeras de anticuerpo, fragmentos de unión al antígeno de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, un fragmento Fv (por ejemplo un Fv de cadena sencilla (scFv), un Fv unido por enlaces disulfuro), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂), un dominio variable único de anticuerpo (por ejemplo, un dAb, V_H, V_{HH}, V_L) y versiones modificadas de cualquiera de los anteriores (por ejemplo modificados por unión covalente o polietilenglicol u otro polímero adecuado o una V_{HH} humanizado).

La frase “dominio variable único de inmunoglobulina” se refiere a un dominio variable de anticuerpo (V_H , V_{HH} , V_L) que se unen específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de otras regiones o dominios V. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (por ejemplo, homo o heteromultímero) con otras regiones variables o dominios variables en que las otras regiones o dominios no se necesitan para la unión al antígeno por el dominio variable de inmunoglobulina (es decir, en que el dominio variable único de inmunoglobulina se une al antígeno independientemente de los dominios variables adicionales). Un “dominio de anticuerpo” o “dAb” es lo mismo que un “dominio variable único de inmunoglobulina” como se utiliza la expresión en el presente documento. Un “único dominio variable de inmunoglobulina” es lo mismo que un “dominio variable único de inmunoglobulina” como la expresión que se utiliza en el presente documento. Un “dominio único variable de anticuerpo” o un “dominio variable único de anticuerpo” es lo mismo que un “dominio variable único de inmunoglobulina” como la expresión que se utiliza en el presente documento. Un dominio variable único de inmunoglobulina es en una realización un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables únicos de anticuerpo de otras especies tales como roedores (por ejemplo, como se desvela en el documento WO 00/29004), tiburón nodriza y dAb V_{HH} de *Camélido*. Los V_{HH} de *Camélido* son polipéptidos con un dominio variable único de inmunoglobulina que se derivan de especies que incluyen al camello, llama, alpaca, dromedario, y guanaco, que producen cadenas pesadas de anticuerpo naturalmente carentes de cadenas ligeras. El V_{HH} puede ser humanizado.

Un “dominio” es una estructura de proteína plegada que tiene una estructura terciaria independiente del resto de la proteína. En general, los dominios son responsables de propiedades funcionales independientes de las proteínas, y en muchos casos se pueden añadir, retirar o transferir a otras proteínas sin pérdida de la función de la proteína restante y/o del dominio. Un “dominio variable único de anticuerpo” es un dominio polipeptídico plegado que comprende secuencias características de los dominios variables de anticuerpo. Por lo tanto, incluye dominios variables de anticuerpo completos y dominios variables modificados, por ejemplo en los que se han remplazado uno o más bucles por secuencias que nos características de dominios variables de anticuerpo, o dominios variables de anticuerpo que se han truncado o que comprenden extensiones en los extremos N o C, así como fragmentos plegados de los dominios variables que mantienen al menos la actividad de unión y la especificidad del dominio de longitud completa.

El término “biblioteca” se refiere a una mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos heterogéneos. La biblioteca está compuesta de miembros, cada uno de los cuales tiene una única secuencia de polipéptido o de ácido nucleico. En este extremo, “biblioteca” es sinónimo de “repertorio”. Las diferencias de secuencia entre los miembros de la biblioteca son las responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede tener forma de una mezcla simple de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede tener forma de organismos o células, por ejemplo, bacterias, virus, células animales o vegetales y similares, que se transforman con una biblioteca de ácidos nucleicos. En una realización, cada organismo o célula individual contiene solo uno o un número limitado de miembros de la biblioteca. En una realización, 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, por lo tanto, una biblioteca puede tomar la forma de una población de organismos huésped, conteniendo cada organismo una o más copias de un vector de expresión que contiene un único miembro de la biblioteca en forma de ácido nucleico que se puede expresar para producir su correspondiente miembro polipeptídico. Por lo tanto, la población de organismos huésped tiene el potencial de codificar un gran repertorio de distintos polipéptidos.

Un “armazón universal” es una única secuencia de armazón de anticuerpo que corresponde a las regiones de un anticuerpo conservado en la secuencia como define Kabat (“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, US Department of Health y Human Services) o los que corresponden al repertorio de inmunoglobulinas de la línea germinal humana o la estructura como la definida por Chothia y Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917. Las bibliotecas y repertorios pueden utilizar un único armazón, o un grupo de tales armazones, lo que se descubierto que permite la derivación de virtualmente cualquier especificidad de unión por medio solamente de la variación en las regiones hipervariables.

Como se utiliza en el presente documento, el término “dosis” se refiere a la cantidad de ligando que se administra a un sujeto al mismo tiempo (dosis unitaria), o en dos o más administraciones en un intervalo de tiempo determinado. Por ejemplo, la dosis puede referirse a la cantidad de ligando (por ejemplo, el ligando que comprende el dominio variable único de inmunoglobulina que se une al antígeno diana) que se administra a un sujeto en el curso de un día (24 horas) (dosis diaria), dos días, una semana, dos semanas, tres semanas o uno o más meses (por ejemplo, por una única administración, o por dos o más administraciones). El intervalo entre dosis puede ser cualquier cantidad de tiempo que se desee.

El término “semivida”, se refiere al tiempo que se tarda para que se reduzca la concentración del ligando en el suero (por ejemplo, dAb, polipéptido o antagonista) un 50%, *in vivo*, por ejemplo debido a la degradación del ligando y/o aclaramiento o secuestro del ligando por mecanismos naturales. Los ligandos de la invención se pueden estabilizar *in vivo* y aumentarse su semivida uniéndolos a moléculas que resisten la degradación y/o el aclaramiento o secuestro. Típicamente, tales moléculas son proteínas de origen natural que por sí mismas tienen una larga semivida *in vivo*. La semivida de un ligando aumenta si su actividad funcional persiste, *in vivo*, durante un periodo más largo que un ligando similar que no es específico de la molécula que aumenta la semivida. Por ejemplo, un ligando específico para la seroalbúmina (HSA) y una molécula diana se comparan con el mismo ligando en el que no

está presente la especificidad por HSA, que no se une a la HSA pero se une a otra molécula. Por ejemplo, se puede unir a una tercera diana en la célula. Típicamente, la semivida aumenta un 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. De manera alternativa, o además, son posibles aumentos en el intervalo de hasta 30x, 40x, 50x, 60x; 70x, 80x, 100x, 150x de la semivida.

Como se utiliza en el presente documento, "tamaño hidrodinámico" se refiere al tamaño aparente de una molécula (por ejemplo, una molécula de proteína, ligando) basándose en la difusión de la molécula por medio de una solución acuosa. La difusión, o movimiento de una proteína a través de la solución se puede procesar para derivar un tamaño aparente de la proteína, en que el tamaño se da por el "radio de Stokes" o "radio hidrodinámico" de la partícula de proteína. El "tamaño hidrodinámico" de una proteína depende de tanto la masa como la forma (conformación), tal que dos proteínas que tienen la misma masa molecular puede tener diferentes tamaños hidrodinámicos basándose en la conformación total de la proteína.

Como se denomina en el presente documento, el término "compite" significa que la unión de una primera diana a su dominio de unión a la diana afín se inhibe en presencia de un segundo dominio de unión que es específico para dicha diana afín. Por ejemplo, la unión se puede inhibir estéricamente, por ejemplo, por bloqueo físico de un dominio de unión o por alteración de la estructura o ambiente de un dominio de unión tal que su afinidad o aidez por una diana se reduce. Véase el documento WO2006038027 para los detalles de cómo llevar a cabo experimentos con ELISA de competición y BiaCore de competición para determinar la competición entre el primer y segundo dominios de unión.

Los cálculos de "homología" o "identidad" o "similitud" entre dos secuencias (los términos se utilizan de manera intercambiable en el presente documento) se lleva a cabo de la siguiente manera. Las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, los huecos se pueden introducir en una o ambas de una primera y segunda secuencias de aminoácido o ácido nucleico para el alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas se pueden ignorar con fines de comparación). En una realización, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines de comparación es al menos un 30%, o al menos un 40%, o al menos un 50%, o al menos un 60%, o al menos un 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Se comparan entonces los restos de aminoácido o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que en la posición correspondiente de la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se utiliza en el presente documento "homología" de aminoácidos o ácidos nucleicos es equivalente a "identidad" de aminoácidos o ácidos nucleicos). El porcentaje de identidad entre las 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 necesitan introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. Los alineamientos de secuencias de aminoácidos y nucleótidos y la homología, similitud o identidad, como se define en el presente documento se pueden preparar y determinar utilizando el algoritmo BLAST 2 Sequences, utilizando los parámetros por defecto (Tatusova, T. A. y col., FEMS Microbiol Lett, 174:187-188 (1999)).

PROCEDIMIENTOS DE SELECCIÓN

La invención en una realización se refiere a polipéptidos y dAb que se seleccionan por un procedimiento de selección de péptidos y polipéptidos resistentes a la proteasa que tienen una actividad biológica deseada. Se utilizan dos presiones selectivas en el procedimiento para producir un proceso eficaz para seleccionar polipéptidos que son altamente estables y resistentes a la degeneración por proteasas, y que tienen la actividad biológica deseada. Como se describe en el presente documento, los péptidos y polipéptidos resistentes a proteasas mantiene la actividad biológica. Por el contrario, los péptidos y polipéptidos sensibles a las proteasas son escindidos o digeridos por la proteasa en los procedimientos descritos en el presente documento, y por lo tanto, pierden su actividad biológica. En consecuencia, los péptidos o polipéptidos resistentes a las proteasas se seleccionan generalmente basándose en su actividad biológica, tal como la actividad de unión.

Los procedimientos descritos en el presente documento proporcionan varias ventajas. Por ejemplo, como se desvela y se ejemplifica en el presente documento, los dominios variables, antagonistas, péptidos o polipéptidos que se seleccionan por resistencia a la degradación proteolítica por una proteasa (por ejemplo, tripsina), también son resistentes a la degradación por otras proteasas (por ejemplo, elastasa, leucocima). En una realización, la resistencia a proteasas se correlaciona con una alta temperatura de fusión (T_m) del péptido o polipéptido. Las temperaturas de fusión más altas son indicativas de dominios variables, antagonistas, péptidos y polipéptidos más estables. La resistencia a la degradación por proteasas también se correlaciona en una realización con una alta afinidad de unión a ligandos diana. Por lo tanto, los procedimientos descritos en el presente documento proporcionan una forma eficaz de seleccionar, aislar y/o recuperar dominios variables, antagonistas, péptidos, polipéptidos que tienen una actividad biológica y que son muy adecuados para usos terapéuticos y/o diagnósticos *in vivo* debido a que son resistentes a proteasas y estables. En una realización la resistencia a proteasas se correlaciona con un PK mejorado, por ejemplo una mejora por encima de un dominio variable, antagonista, péptido o polipéptido que no es resistente a proteasas. Un PK mejorado puede ser un AUC (área bajo la curva) y/o una semivida mejorados. En una realización, la resistencia a proteasas se correlaciona con una estabilidad mejorada del dominio variable, antagonista, péptido o polipéptido a la cizalladura o el proceso térmico y/o una propensión reducida

a agregarse durante la nebulización, por ejemplo, una mejora por encima de un dominio variable, antagonista, péptido o polipéptido que no es resistente a las proteasas. En una realización la resistencia a las proteasas se correlaciona con una estabilidad de almacenamiento mejorada, por ejemplo, una mejora por encima de un dominio variable, antagonista, péptido o polipéptido que no es resistente a las proteasas. En un aspecto, se proporcionan una, dos, tres, cuatro o todas las ventajas, siendo las ventajas la resistencia a la degradación por proteasas, mayor T_m y alta afinidad de unión a un ligando diana.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para seleccionar, aislar y/o recuperar un péptido o polipéptido de una biblioteca o un repertorio de péptidos o polipéptidos (por ejemplo, un sistema de presentación) que es resistente a la degradación por una proteasa (por ejemplo, una o más proteasas). En una realización, el procedimiento es un procedimiento para seleccionar, aislar y/o recuperar un polipéptido de una biblioteca o repertorio de péptidos y polipéptidos (por ejemplo, un sistema de presentación) que es resistente a la degradación por una proteasa (por ejemplo, una o más proteasas). En general, el procedimiento comprende proporcionar una biblioteca o repertorio de péptidos o polipéptidos, combinar la biblioteca o repertorio con una proteasa (por ejemplo, tripsina, elastasa, leucozima, pancreatina, esputo) bajo condiciones adecuadas para la actividad de la proteasa, y seleccionar, aislar y/o recuperar un péptido o polipéptido que es resistente a la degradación por la proteasa y tiene una actividad biológica deseada. Los péptidos o polipéptidos que se degradan por una proteasa generalmente tienen una actividad biológica reducida o pierden su actividad biológica debido a la actividad de la proteasa. En consecuencia, los péptidos o polipéptidos que son resistentes a la degradación por proteasas se puede seleccionar, aislar y/o recuperar utilizando el procedimiento basado en su actividad biológica, tal como la actividad de unión (por ejemplo, la unión a un ligando general, la unión a un ligando específico, la unión a un sustrato), actividad catalítica u otra actividad biológica.

La biblioteca o repertorio de péptidos o polipéptidos se combina con una proteasa (por ejemplo, una o más proteasas) bajo condiciones adecuadas para la actividad proteolítica de la proteasa. Las condiciones que son adecuadas para la actividad proteolítica de la proteasa, y las preparaciones biológicas o mezclas que contienen actividad proteolítica, se conocen bien en la técnica o las puede determinar fácilmente un experto habituado en la técnica. Si se desea, las condiciones adecuadas se pueden identificar u optimizar, por ejemplo, evaluando la actividad de proteasa bajo un intervalo de condiciones de pH, concentraciones de proteasa, temperaturas y/o variando la cantidad de tiempo en que se permite reaccionar a la biblioteca o repertorio y la proteasa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la relación (con una base mol/mol) de proteasa, por ejemplo, tripsina, respecto al péptido o polipéptido (por ejemplo, un dominio variable) es 800 a 80.000 (por ejemplo, de 8.000 a 80.000) proteasa: péptido o polipéptido; o cuando se utilizan 10 microgramos/ml de proteasa, la relación es de 800 a 80.000 proteasa: péptido o polipéptido; o cuando se utilizan 100 microgramos/ml de proteasa, la relación es de 8.000 a 80.000 proteasa: péptido o polipéptido. En una realización la relación (en una base de peso/peso, por ejemplo microgramo/microgramo) de proteasa (por ejemplo, tripsina) respecto al péptido o polipéptido (por ejemplo, un dominio variable) es de 1.600 a 160.000 (por ejemplo, de 16.000 a 160.000) proteasa: péptido o polipéptido por ejemplo cuando se utilizan 10 microgramos/ml, la relación es de 1.600 a 160.000 proteasa: péptido o polipéptido; o cuando se utilizan 100 microgramos/ml de proteasa, la relación es de 16.000 a 160.000 proteasa: péptido o polipéptido. En una realización, la proteasa que se utiliza a una concentración de al menos 100 o 1000 microgramos/ml y la relación proteasa: péptido (en una base mol/mol) de proteasa, por ejemplo tripsina, respecto al péptido o polipéptido (por ejemplo, un dominio variable) es de 8.000 a 80.000 proteasa: péptido o polipéptido. En una realización, la proteasa se utiliza a una concentración de al menos 10 microgramos/ml y la relación proteasa: péptido (en una base mol/mol) de proteasa, por ejemplo tripsina, respecto al péptido o polipéptido (por ejemplo, un dominio variable) es 800 a 80.000 proteasa: péptido o polipéptido. En una realización, la relación (en una base peso/peso, por ejemplo microgramo/microgramo) de proteasa (por ejemplo, tripsina) respecto al péptido o polipéptido (por ejemplo, un dominio variable) es 1600 a 160.000 proteasa: péptido o polipéptido por ejemplo cuando C es de 10 microgramos/ml; o cuando C o C' es de 100 microgramos/ml, la relación es de 16.000 a 160.000 proteasa: péptido o polipéptido. En una realización, la concentración (c o c') es al menos de 100 a 1000 microgramos/ml de proteasa. Para ensayar un péptido o polipéptido individual o aislado (por ejemplo, un dominio variable de inmunoglobulina), por ejemplo uno que ya se ha aislado de un repertorio o biblioteca, se puede añadir una proteasa a una solución de péptido o polipéptido en un tampón adecuado (por ejemplo, PBS) para producir una solución péptido o polipéptido/proteasa, tal como una solución de al menos aproximadamente un 0,01% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, de aproximadamente un 0,01% a aproximadamente un 5% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, de aproximadamente un 0,05% a aproximadamente un 5% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, aproximadamente de un 0,1% a aproximadamente un 5% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, de aproximadamente un 0,5% a aproximadamente un 5% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 5% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,01% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,02% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,03% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,04% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,05% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,06% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,07% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,08% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,09% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,1% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,2% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,3% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,4% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos

aproximadamente un 0,5% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,6% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,7% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,8% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 0,9% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 1% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 2% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 3% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente un 4% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, o aproximadamente un 5% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido. La mezcla se puede incubar a una temperatura adecuada para la actividad de proteasa (por ejemplo, temperatura ambiente, aproximadamente 37 °C) y las muestras se pueden tomar a intervalos de tiempo (por ejemplo, a 1 hora, 2 horas, 3 horas, etc.). Las muestras se pueden analizar en cuanto a la degradación proteica utilizando cualquier procedimiento adecuado, tal como análisis SDS-PAGE o unión de ligandos, y los resultados se pueden utilizar para establecer un curso de tiempo de degradación.

Se puede utilizar cualquier proteasa o proteasas que se deseen en los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, se pueden utilizar una proteasa única, cualquier combinación deseada de diferentes proteasas, o cualquier preparación biológica, extracto biológico, u homogenado biológico que contiene actividad proteolítica. No es necesario que la se conozca identidad de la proteasa o proteasas que se utilizan. Ejemplos adecuados de proteasas que se pueden utilizar solas o en cualquier combinación deseada incluyen serina proteasa, cisteína proteasa, aspartato proteasa, tiol proteasas, metaloproteasa de la matriz, carboxipeptidasa (por ejemplo, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B), tripsina, quimiotripsina, pepsina, papaína, elastasa, leucosima, pancreatina, trombina, catépsinas (por ejemplo, catépsina G), proteinasa (por ejemplo, proteinasa 1, proteinasa 2, proteinasa 3), termolisina, quimosina, enteropeptidasa, caspasa (por ejemplo, caspasa 1, caspasa 2, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 9, caspasa 12, caspasa 13), calpaína, ficaina, clostripaína, actinidaína, bromelaína, y separasa. En realizaciones particulares, la proteasa es tripsina, elastasa o leucosima. La proteasa también se puede proporcionar en un extracto biológico, un homogenado biológico o una preparación biológica. En una realización, la proteasa es una proteasa que se encuentra en el esputo, mucus (por ejemplo, mucus gástrico, mucus nasal, mucus bronquial), lavado broncoalveolar, homogenado pulmonar, extracto pulmonar, extracto pancreático, fluido gástrico, saliva, lágrimas y similares. La proteasa se utiliza en una cantidad adecuada para que se produzca la degradación proteolítica. Por ejemplo, como se describe en el presente documento, la proteasa se puede utilizar a aproximadamente un 0,01% a aproximadamente un 5% (p/p, proteasa/péptido o polipéptido). Cuando la proteasa se combina con un sistema de presentación que comprende el repertorio de péptidos o polipéptidos (por ejemplo, un sistema de presentación en fago), por ejemplo, la proteasa se puede utilizar a una concentración de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 40 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 60 µg/ml, aproximadamente 70 µg/ml, aproximadamente 80 µg/ml, aproximadamente 90 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 200 µg/ml, aproximadamente 300 µg/ml, aproximadamente 400 µg/ml, aproximadamente 500 µg/ml, aproximadamente 600 µg/ml, aproximadamente 700 µg/ml, aproximadamente 800 µg/ml, aproximadamente 900 µg/ml, aproximadamente 1000 µg/ml, aproximadamente 1,5 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 2,5 mg/ml o aproximadamente 3 mg/ml.

La proteasa se incuba con la colección de péptidos o polipéptidos (biblioteca o repertorio) a una temperatura que es adecuada para la actividad de la proteasa. Por ejemplo, la proteasa y la colección de péptidos o polipéptidos se puede incubar a una temperatura de 20°C a aproximadamente 40°C (por ejemplo, a temperatura ambiente, aproximadamente 20°C, aproximadamente 21°C, aproximadamente 22°C, aproximadamente 23°C, aproximadamente 24°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 26°C, aproximadamente 27°C, aproximadamente 28°C, aproximadamente 29°C, aproximadamente 30°C, aproximadamente 31°C, aproximadamente 32°C, aproximadamente 33°C, aproximadamente 34°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 36°C, aproximadamente 37°C, aproximadamente 38°C, aproximadamente 39°C, aproximadamente 40°C). La proteasa y la colección de péptidos y polipéptidos se incuban juntos durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca la degradación proteolítica. Por ejemplo, la colección de péptidos o polipéptidos se puede incubar junto con la proteasa durante 30 minutos a aproximadamente 24 o aproximadamente 48 horas. En algunos ejemplos, la colección de péptidos o polipéptidos se incuba junto con la proteasa durante una noche, o durante aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, o más.

En general es deseable, al menos en las primeras rondas de selección (por ejemplo, cuando se utiliza un sistema de presentación), que la proteasa da como resultado una reducción en la cantidad de clones que tiene la actividad biológica deseada que se selecciona por al menos un orden de magnitud, en comparación con las selecciones que no incluyen la incubación con proteasa. En ejemplos particulares, la cantidad de proteasa y las condiciones que se utilizan en los procedimientos son suficientes para reducir el número de clones recuperados por al menos un log (un

factor de 10), al menos 2 log (un factor de 100), al menos aproximadamente 3 log (un factor de 1000) o al menos aproximadamente 4 log (un factor de 10.000). Las cantidades adecuadas de proteasa y condiciones de incubación que dará como resultado la reducción deseada de clones que se recuperan se pueden determinar utilizando procedimientos y/o las directrices proporcionadas en el presente documento.

- 5 La proteasa y la colección de péptidos o polipéptidos se pueden combinar e incubar utilizando cualquier procedimiento adecuado (por ejemplo, *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*). Por ejemplo, la proteasa y la colección de péptidos o polipéptidos se pueden combinar en un envase adecuado y dejarlo en reposo, sacudirlo, agitarlo, girarlo o similar, a una temperatura adecuada para la actividad de proteasa. Si se desea, la proteasa y la colección de péptidos o polipéptidos se pueden combinar en un sistema *in vivo* o *ex vivo*, tal como introduciendo la colección de polipéptidos (por ejemplo, una biblioteca o repertorio de fagos de presentación) en un animal adecuado (por ejemplo, un ratón), y después de que haya pasado el tiempo suficiente para la actividad de proteasa, recuperar la colección de péptidos o polipéptidos. En otro ejemplo, se perfunde un órgano o tejido con la colección de polipéptidos (por ejemplo, una biblioteca o repertorio de fagos de presentación), y después de que haya pasado el tiempo suficiente para la actividad de proteasa, se recupera la colección de polipéptidos.
- 10 Después de la incubación, se puede seleccionar un péptido o polipéptido resistente a proteasa basándose en una actividad biológica deseada, tal como la actividad de unión. Si se desea, se puede añadir un inhibidor de la proteasa antes de la selección. Se puede utilizar cualquier inhibidor de proteasa adecuado (o combinación de dos o más inhibidores de proteasa) que no interfieran sustancialmente con el procedimiento de selección. Ejemplos de inhibidores adecuados incluyen, α 1-anti-tripsina, α 2-macroglobulina, amastatina, antipaina, antitrombina III, aprolinina, 4-(2-Aminoetil) hidrocloreuro de fluoruro benzenosulfonilo (AEBSF), Fluoruro de (4-Amidino-Fenil)-Metano-Sulfonilo (APMSF), bestatina, benzamidina, quimostatina, 3,4-Dicloroisocoumarina, fluorofosfato de diisopropilo (DIFP), E-64, etilendiamina de ácido tetraacético (EDTA), elastatina I, leupeptina, N-Ethihnaleimida, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), pepstatina, 1,10-Fenantrolit, fosforamidon, inhibidores de serina proteasa, N-tosil-L-lisinaclorometil cetona (TLCK), Na-Tosil-Fe-clorometil cetona (TPCK) y similares. Además, muchas preparaciones que contienen inhibidores de varias clases de proteasas están disponibles comercialmente (por ejemplo, Inhibidor completo de proteasa Roche Cocktail Tablets™ (Roche Diagnostics Corporation; Indianapolis, IN, EE. UU.), que inhibe la quimotripsina, termolisina, papaína, pronasa, extracto pancreático y tripsina).
- 15
- 20
- 25

Se puede seleccionar un péptido o polipéptido resistente a la proteasa utilizando un procedimiento de selección por la actividad biológica, que permite que se distingan y seleccionen los péptidos y polipéptidos que tienen la actividad biológica deseada de los péptidos y polipéptidos que no tienen la actividad biológica deseada. En general, los péptidos o polipéptidos que se han digerido o escindido por la proteasa pierden su actividad biológica, mientras que los péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa se mantienen funcionales. Por lo tanto, se pueden utilizar ensayos adecuados de actividad biológica para seleccionar péptidos o polipéptidos resistentes a proteasas. Por ejemplo, se puede evaluar una función de unión común (por ejemplo, la unión a un ligando general, unión a un ligando específico, o unión a un sustrato) utilizando un ensayo de unión adecuado (por ejemplo, ELISA, ensayo de selección). Por ejemplo, los polipéptidos que se unen a un ligando diana o un ligando genérico, tal como la proteína A, proteína L, o un anticuerpo, se pueden seleccionar, aislar y/o recuperar por ensayo de selección o utilizando una matriz de afinidad adecuada. El ensayo de selección se puede llevar a cabo añadiendo una solución de ligandos (por ejemplo, ligando genérico, ligando diana) a un recipiente adecuado (por ejemplo, un tubo, una placa de Petri) y permitiendo que el ligando se deposite o revista las paredes del recipiente. El exceso de ligando se puede lavar y se pueden añadir los polipéptidos (por ejemplo, una biblioteca de fagos de presentación) al recipiente y se mantienen el recipiente bajo condiciones adecuadas para que los polipéptidos se unan al ligando inmovilizado. El polipéptido que no se une se puede lavar y se pueden recuperar los polipéptidos unidos utilizando cualquier procedimiento adecuado, tal como el raspado o bajando el pH, por ejemplo.

30

35

40

45 Cuando se utiliza un sistema de presentación en fagos, se puede ensayar la unión en un ELISA de fago. El ELISA de fago se puede llevar a cabo de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado. En un ejemplo, las poblaciones de fagos que se produce en cada ronda de selección se pueden explorar en cuanto a su unión al ligando diana seleccionado o al ligando genérico por ELISA, para identificar el fago que presenta los péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa. Si se desea, los péptidos y polipéptidos solubles se pueden ensayar en cuanto a su unión al ligando diana o ligando genérico, por ejemplo por ELISA utilizando reactivos, por ejemplo, contra el marcador del extremo N o C (véase por ejemplo, Winter y col. (1994) Ann. Rev. Immunology 12, 433-55 y las referencias citadas en el presente documento). La diversidad del fago seleccionado también se puede evaluar por electroforesis en gel de productos PCR (Marks y col. 1991, *supra*; Nissim y col. 1994 *supra*), hibridación (Tomlinson y col., (1992) J. Mol. Biol. 227, 776) o por secuenciación del vector ADN.

50

55 Además de la especificidad por TNFR1, un antagonista o polipéptido (por ejemplo, un ligando específico dual) que comprende un polipéptido anti-TNFR1 resistente a la proteasa (por ejemplo, un dominio variable único de anticuerpo) puede tener una especificidad de unión por un ligando genérico o cualquier ligando diana deseado, tal como proteínas humanas o animales, que incluyen citoquinas, factores de crecimiento, receptores de citoquinas, receptores de factores de crecimiento, enzimas (por ejemplo, proteasas), cofactores para enzimas, proteínas de unión al ADN, lípidos y carbohidratos.

60

En algunas realizaciones, el péptido o polipéptido resistente a proteasa (por ejemplo, el dAb) o el antagonista se une al TNFR1 en el tejido pulmonar. En una realización, el antagonista o polipéptido se une también a una diana más en el tejido pulmonar.

Cuando se utiliza un sistema de presentación (por ejemplo, un sistema de presentación que une la función codificante de un ácido nucleico y las características funcionales del péptido o polipéptido codificado por el ácido nucleico) en los procedimientos descritos en el presente documento, puede ser ventajoso frecuentemente amplificar o aumentar el número de copias de los ácidos nucleicos que codifican los péptidos o polipéptidos seleccionados. Esto proporciona una forma eficaz para obtener cantidades suficientes de ácidos nucleicos y/o péptidos o polipéptidos para las rondas adicionales de selección, utilizando los procedimientos que se describen en el presente documento u otros procedimientos adecuados, o por preparación de repertorios adicionales (por ejemplo, repertorios de maduración de afinidad). Por lo tanto, en algunas realizaciones, los procedimientos comprenden la utilización de un sistema de presentación (por ejemplo, que une la función codificadora de un ácido nucleico y las características funcionales del péptido o polipéptido codificado por el ácido nucleico, tal como un fago de presentación) y comprenden además la amplificación o aumento del número de copias de un ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido seleccionado. Los ácidos nucleicos se pueden amplificar utilizando cualquiera de los procedimientos adecuados, tal como por fago de amplificación, cultivo celular o reacción de la cadena de polimerasa.

Los procedimientos descritos en el presente documento se pueden utilizar como parte de un programa para aislar los péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa, por ejemplo, los dAb, que puede comprender, si se desea, otros procedimientos de selección adecuada. En estas situaciones, los procedimientos descritos en el presente documento se pueden emplear en cualquier punto que se desee en el programa, tal como antes o después de utilizarse otros procedimientos de selección. Los procedimientos descritos en el presente documento se pueden utilizar también para proporcionar dos o más rondas de selección, como se describe y se ejemplifica en el presente documento.

En un ejemplo, el procedimiento es para seleccionar un péptido o polipéptido, por ejemplo, un dAb, que es resistente a la degradación por elastasa, que comprende proporcionar una biblioteca o repertorio de péptidos o polipéptidos, combinar la biblioteca o repertorio con elastasa (o una preparación biológica, extracto u homogenado que comprende elastasa) bajo condiciones adecuadas para la digestión proteolítica por elastasa, y seleccionar, aislar y/o recuperar un péptido o polipéptido que es resistente a la degradación por elastasa y tiene actividad de unión por el TNFR1.

En realizaciones particulares, se proporciona un procedimiento para la selección de un dominio variable único de inmunoglobulina (un dAb) que es resistente a la degradación por elastasa y se une al TNFR1. En estas realizaciones, se proporciona una biblioteca o repertorio que comprende dAb y se combina con elastasa (o una preparación biológica, extracto u homogenado que comprende elastasa) bajo condiciones adecuadas para la digestión proteolítica por elastasa. Se seleccionan los dAb resistentes a la elastasa que se unen específicamente al TNFR1. Por ejemplo, el dAb resistente a la elastasa no se degrada sustancialmente cuando se incuba a 37 °C en una solución al 0,04% (p/p) de elastasa durante un periodo de al menos aproximadamente 2 horas. En una realización, el dAb resistente a la elastasa no se degrada sustancialmente cuando se incuba a 37 °C en una solución de 0,04% (p/p) de elastasa durante un periodo de al menos aproximadamente 12 horas. En una realización, el dAb resistente a la elastasa no se degrada sustancialmente cuando se incuba a 37 °C en una solución al 0,04% (p/p) de elastasa durante un periodo de al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 36 horas, o al menos aproximadamente 48 horas.

En una realización, se proporciona un procedimiento para seleccionar un dominio variable único de inmunoglobulina (un dAb) que es resistente a la degradación por elastasa y se une al TNFR1. El procedimiento comprende proporcionar un sistema de presentación en fago que comprende un repertorio de polipéptidos que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, combinar el sistema de presentación en fago con elastasa (aproximadamente 100 µg/ml) e incubar la mezcla a aproximadamente 37 °C, por ejemplo, durante una noche (por ejemplo, aproximadamente 12-16 horas), y luego seleccionar el fago que presenta un dAb que se une específicamente al TNFR1.

En un ejemplo, se proporciona un procedimiento para seleccionar un péptido o polipéptido (por ejemplo, un dAb) que es resistente a la degradación por leucosima, que comprende proporcionar una biblioteca o repertorio de péptidos o polipéptidos, combinar la biblioteca o el repertorio con leucosima (o una preparación biológica, extracto u homogenado que comprende leucosima) bajo condiciones adecuadas para la digestión proteolítica por leucosima, y seleccionar, aislar y/o recuperar un péptido o polipéptido que es resistente a la degradación por leucosima y tiene una actividad de unión específica al TNFR1.

En realizaciones particulares, se proporciona un procedimiento para la selección de un dominio variable único de inmunoglobulina (un dAb) que es resistente a la degradación por leucosima y se une al TNFR1. En estas realizaciones, se proporciona una biblioteca o repertorio que comprende dAb y se combina con leucosima (o una preparación biológica, extracto u homogenado que comprende leucosima) bajo condiciones adecuadas para la digestión proteolítica por leucosima. Se seleccionan los dAb resistentes a la leucosima que se unen específicamente al TNFR1. Por ejemplo, el dAb resistente a la leucosima no se degrada sustancialmente cuando se incuba a 37 °C

en una solución al 0,04% (p/p) de leucozima durante un periodo de al menos aproximadamente 2 horas. En una realización, el dAb resistente a la leucozima no se degrada sustancialmente cuando se incuba a 37 °C en una solución de 0,04% (p/p) de leucozima durante un periodo de al menos aproximadamente 12 horas. En una realización, el dAb resistente a la leucozima no se degrada sustancialmente cuando se incuba a 37 °C en una solución al 0,04% (p/p) de leucozima durante un periodo de al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 36 horas, o al menos aproximadamente 48 horas.

En una realización, se proporciona un procedimiento para seleccionar un dominio variable único de inmunoglobulina (un dAb) que es resistente a la degradación por leucozima y se une al TNFR1. El procedimiento comprende proporcionar un sistema de presentación en fago que comprende un repertorio de polipéptidos que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, combinar el sistema de presentación en fago con leucozima (aproximadamente 100 µg/ml) e incubar la mezcla a aproximadamente 37 °C, por ejemplo, durante una noche (por ejemplo, aproximadamente 12-16 horas), y luego seleccionar el fago que presenta un dAb que se une específicamente al TNFR1.

En otro ejemplo, se proporciona un procedimiento para seleccionar un péptido o polipéptido (por ejemplo, un dAb) que es resistente a la degradación por tripsina, que comprende proporcionar una biblioteca o repertorio de péptidos o polipéptidos, combinar la biblioteca o el repertorio con tripsina (o una preparación biológica, extracto u homogenado que comprende tripsina) bajo condiciones adecuadas para la digestión proteolítica por tripsina, y seleccionar, aislar y/o recuperar un péptido o polipéptido que es resistente a la degradación por tripsina y tiene una actividad de unión específica al TNFR1.

En realizaciones particulares, se proporciona un procedimiento para la selección de un dominio variable único de inmunoglobulina (un dAb) que es resistente a la degradación por tripsina y se une al TNFR1. En estas realizaciones, se proporciona una biblioteca o repertorio que comprende dAb y se combina con tripsina (o una preparación biológica, extracto u homogenado que comprende tripsina) bajo condiciones adecuadas para la digestión proteolítica por tripsina. Se seleccionan los dAb resistentes a la tripsina que se unen específicamente al TNFR1. Por ejemplo, el dAb resistente a la tripsina no se degrada sustancialmente cuando se incuba a 37 °C en una solución al 0,04% (p/p) de tripsina durante un periodo de al menos aproximadamente 2 horas. En una realización, el dAb resistente a la tripsina no se degrada sustancialmente cuando se incuba a 37 °C en una solución de 0,04% (p/p) de tripsina durante un periodo de al menos aproximadamente 3 horas. En una realización, el dAb resistente a la tripsina no se degrada sustancialmente cuando se incuba a 37 °C en una solución al 0,04% (p/p) de tripsina durante un periodo de al menos aproximadamente 4 horas, al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 7 horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 9 horas, al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 11 horas, o al menos aproximadamente 12 horas.

En una realización ejemplar, se proporciona un procedimiento para seleccionar un dominio variable único de inmunoglobulina (un dAb) que es resistente a la degradación por tripsina y se une al TNFR1. El procedimiento comprende proporcionar un sistema de presentación en fago que comprende un repertorio de polipéptidos que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, combinar el sistema de presentación en fago con tripsina (aproximadamente 100 µg/ml) e incubar la mezcla a aproximadamente 37 °C, por ejemplo, durante una noche (por ejemplo, aproximadamente 12-16 horas), y luego seleccionar el fago que presenta un dAb que se une específicamente al TNFR1.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para producir un repertorio de péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa (por ejemplo, dAb). El procedimiento comprende proporcionar un repertorio de péptidos o polipéptidos; combinar el repertorio de péptidos o polipéptidos y una proteasa bajo condiciones adecuadas para la actividad de la proteasa; y recuperar una pluralidad de péptidos o polipéptidos que se unen específicamente al TNFR1, en que se produce un repertorio de péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa. Las proteasas, sistemas de presentación, condiciones para la actividad proteasa, y los procedimientos para seleccionar péptidos o polipéptidos son adecuados para su uso en el procedimiento que se describe en el presente documento con respecto a otros procedimientos.

En algunas realizaciones, se utiliza un sistema de presentación (por ejemplo, un sistema de presentación que une la función codificante de un ácido nucleico y las características funcionales del péptido o polipéptido codificado por el ácido nucleico) que comprende un repertorio de péptidos o polipéptido, y el procedimiento comprende además la amplificación o aumento del número de copias de los ácidos nucleicos que codifican la pluralidad de péptidos o polipéptidos seleccionados. Los ácidos nucleicos se pueden amplificar utilizando cualquier procedimiento adecuado, tal como amplificación por fago, cultivo celular o reacción en cadena de la polimerasa.

En una realización particular, se proporciona un procedimiento para producir un repertorio de polipéptidos resistentes a la proteasa que comprende dAb anti-TNFR1. El procedimiento comprende proporcionar un repertorio de polipéptidos que comprende dAb; combinar el repertorio de péptidos o polipéptidos y una proteasa (por ejemplo, tripsina, elastasa, leucozima) bajo condiciones adecuadas para la actividad de la proteasa; y recuperar una pluralidad de polipéptidos que comprenden dAb que tienen una especificidad de unión por el TNFR1. El procedimiento puede utilizarse para producir un repertorio intacto, o un repertorio que está predispuesto hacia una especificidad de unión que se desee, tal como un repertorio de maduración de afinidad basado en un dAb parental que tiene una especificidad de unión por el TNFR1.

Sistemas de presentación de polipéptidos

En una realización, el repertorio o biblioteca de péptidos o polipéptidos que se proporciona para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento comprenden un sistema de presentación adecuado. El sistema de presentación puede resistir la degradación por proteasa (por ejemplo, una proteasa única o una combinación de proteasas, y cualquier extracto biológico, homogenado o preparación que contenga actividad proteolítica (por ejemplo, esputo, mucus (por ejemplo, mucus gástrico, mucus nasal, mucus bronquial), lavado broncoalveolar, homogenado de pulmón, extracto de pulmón, extracto pancreático, fluido gástrico, saliva, lágrimas y similares). El sistema de presentación y la unión entre el sistema de presentación y el polipéptido presentado es en una realización al menos tan resistente a la proteasa como el más estable de los los péptidos o polipéptidos del repertorio. Esto permite que un ácido nucleico que codifica un polipéptido presentado seleccionado se aísle y/o amplifique fácilmente.

En un ejemplo, un péptido o polipéptido resistente a proteasa, por ejemplo un dAb, se puede seleccionar, aislar y/o recuperar de un repertorio de péptidos o polipéptidos que está en una solución, o que está covalente o no covalentemente unida a una superficie adecuada, tal como un plástico o cristal (por ejemplo, una placa microtiter, una matriz de polipéptido tal como una micromatriz). Por ejemplo, se puede utilizar una matriz de péptidos en una superficie de manera que aloje cada miembro distinto de la biblioteca (por ejemplo, una secuencia peptídica única) en una localización separada, predefinida en la matriz. La identidad de cada miembro de la biblioteca en tal matriz se puede determinar por su localización espacial en la matriz. Las localizaciones en la matriz en las que se producen interacciones de unión entre un ligando diana, por ejemplo, y los miembros reactivos de la biblioteca se puede determinar, identificando de esta manera las secuencias de los miembros reactivos basándose en la localización espacial. (Véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N° 5.143.854, documentos WO 90/15070 y WO 92/10092).

En una realización, los procedimientos emplean un sistema de presentación que une la función codificante de un ácido nucleico y las características físicas, químicas y funcionales del polipéptido codificado por el ácido nucleico. Tal sistema de presentación puede comprender una pluralidad de paquetes genéticos replicables, tal como un bacteriófago, o células (bacterias). En una realización, el sistema de presentación comprende una biblioteca, tal como una biblioteca de bacteriófagos de presentación.

Se han descrito varios sistemas de presentación por bacteriófago adecuados (por ejemplo, sistemas de presentación monovalente o de presentación multivalente). (Véase, por ejemplo, Griffiths y col., Patente de EE. UU. N° 6.555.313 B1; Johnson y col., Patente de EE. UU. N° 5.733.743; McCafferty y col., Patente de EE. UU. N° 5.969.108; Mulligan-Kehoe, Patente de EE. UU. N° 5.702.892; Winter, G. y col., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994); Soumilion, P. y col., Appl. Biochem. Biotechnol. 47(2-3):175-189 (1994); Castagnoli, L. y col., Comb. Chem. High Throughput Screen, 4(2):121-133 (2001)). Los péptidos o polipéptidos que se presentan en un sistema de presentación por bacteriófago se puede presentar sobre cualquier bacteriófago adecuado, tal como un fago filamentosos (por ejemplo, fd, M13, F1), un fago lítico (por ejemplo, T4, T7, lambda), o un fago ARN (por ejemplo, MS2), por ejemplo.

En general, se produce o se proporciona una biblioteca de fagos que presenta un repertorio de péptidos o polipéptidos del fago, como proteínas de fusión con una proteína de cubierta del fago adecuada (por ejemplo, la proteína fd pIII). La proteína de fusión puede presentar los péptidos o polipéptidos en la punta de la proteína de la cubierta del fago, o si se desea en una posición interna. Por ejemplo, el péptido o polipéptido que se presenta se puede presentar en una posición que está en el extremo amino del dominio 1 de pIII. (El extremo N del dominio 1 de pIII se denomina también N1). El polipéptido que se presenta puede fusionarse directamente a pIII (por ejemplo, al extremo N del dominio 1 de pIII) o se fusiona a pIII utilizando un engarce. Si se desea, la fusión puede comprender además un marcador (por ejemplo, un epítipo myc, marcador His). Las bibliotecas que comprenden un repertorio de péptidos o polipéptidos que se presentan como proteínas de fusión con una proteína de la envoltura del fago se pueden producir utilizando cualquiera de los procedimientos adecuados, tal como introduciendo una biblioteca de vectores fago o vectores fagémido que codifican los péptidos o polipéptidos presentados en una bacteria huésped, y cultivando la bacteria resultante para producir el fago (por ejemplo, utilizando un fago auxiliar adecuado o complementando el plásmido si se desea). La biblioteca de fagos se puede recuperar del cultivo utilizando cualquier procedimiento adecuado, tal como precipitación y centrifugación.

El sistema de presentación puede comprender un repertorio de péptidos y polipéptidos que contiene cualquier cantidad que se desee de diversidad. Por ejemplo, el repertorio puede contener péptidos o polipéptidos que tienen que tienen secuencias de aminoácidos que corresponden con los polipéptidos de origen natural que se expresan por un organismo, grupo de organismos (por ejemplo, un repertorio de secuencias de dAb V_{HH} aisladas de un camélido), tejido deseado o tipo celular deseado, o puede contener péptidos o polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos aleatorias o aleatorizadas. Si se desea, los polipéptidos pueden compartir un centro común o almacén. Los polipéptidos en tal repertorio o biblioteca pueden comprender regiones definidas de secuencia de aminoácidos aleatorias o aleatorizadas y regiones de secuencia de aminoácidos comunes. En ciertas realizaciones, todos o sustancialmente todos los polipéptidos de un repertorio son de un tipo deseado, tal como una enzima deseada (por ejemplo, una polimerasa) o un fragmento de unión al antígeno de anticuerpo deseado (por ejemplo, V_H humana o V_L humana). En realizaciones, el sistema de presentación comprende un repertorio de polipéptidos en que cada polipéptido comprende un dominio variable de anticuerpo. Por ejemplo, cada polipéptido en el repertorio puede contener una V_H, una V_L o un Fv (por ejemplo, un Fv de cadena sencilla).

La diversidad de secuencia de aminoácidos se puede introducir en cualquier región deseada de un péptido o polipéptido o armazón utilizando cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, la diversidad de secuencia de aminoácidos se puede introducir en una región diana, tal como una región determinante de complementariedad de un dominio variable de anticuerpo o un dominio hidrófobo, preparando una biblioteca de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos diversificados utilizando cualquiera de los procedimientos de mutagénesis adecuados (por ejemplo, PCR de baja fidelidad, mutagénesis mediada por oligonucleótidos o dirigida al sitio, diversificación utilizando codones NNK) o cualquier otro procedimiento adecuado, si se desea, una región de un polipéptido que se va a diversificar se puede aleatorizar.

El tamaño de los polipéptidos que integran el repertorio es sobre todo una cuestión de elección, y no se necesita un tamaño de polipéptido uniforme. En una realización, los polipéptidos en el repertorio tienen al menos una estructura terciaria (que forma al menos un dominio).

Selección/Aislamiento/Recuperación

Un péptido o polipéptido resistente a proteasa (por ejemplo, una población de polipéptidos resistente a proteasa) se puede seleccionar, aislar y/o recuperar de un repertorio o biblioteca (por ejemplo, en un sistema de presentación) utilizando cualquier procedimiento adecuado. En una realización, un polipéptido resistente a proteasa se selecciona o aísla basándose en una característica seleccionable (por ejemplo, una característica física, una característica química, una característica funcional). Las características funcionales seleccionables adecuadas incluyen las actividades biológicas de los péptidos o polipéptidos del repertorio, por ejemplo, la unión a un ligando genérico por medio de un epítipo que se expresa en un péptido o polipéptido, y la actividad catalítica. (Véase, por ejemplo, Tomlinson y col., documento WO 99/20749; documento WO 01/57065; documento WO 99/58655). En una realización, la selección se basa en la unión específica al TNFR1. En otra realización, la selección se basa en las características funcionales seleccionadas para producir un segundo repertorio en el que los miembros son resistentes a la proteasa, seguido por la selección de un miembro del segundo repertorio que se une específicamente al TNFR1.

En algunas realizaciones, el péptido o polipéptido resistente a proteasa se selecciona y/o aísla de una biblioteca o repertorio de péptidos o polipéptidos en los que todos los péptidos o polipéptidos resistentes a la proteasa se pueden seleccionar de una biblioteca o repertorio en los que sustancialmente todos los péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa comparten una característica seleccionable común. Por ejemplo, el péptido o polipéptido resistente a proteasa se puede seleccionar de una biblioteca o repertorio en el que sustancialmente todos los péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa se unen a un ligando genérico común, que se une o están unidos por) un anticuerpo común, o posee una actividad catalítica común. Este tipo de selección es particularmente útil para preparar un repertorio de péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa basándose en un péptido o polipéptido parental que tiene la actividad biológica deseada, por ejemplo, cuando se lleva a cabo la maduración de afinidad de un dominio variable único de inmunoglobulina.

La selección basándose en la unión a un ligando genérico común da lugar a una colección o población de péptidos o polipéptidos que contienen todos o sustancialmente todos los péptidos o polipéptidos resistentes a proteasas que componían la biblioteca o repertorio original. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos que se unen a un ligando diana o a un ligando genérico, tal como la proteína A, proteína L o un anticuerpo, se pueden seleccionar, aislar y/o recuperar por ensayo de selección o utilizando una matriz de afinidad adecuada. El ensayo de selección se puede llevar a cabo añadiendo una solución de ligando (por ejemplo, ligando genérico, ligando diana) en un recipiente adecuado (por ejemplo, un tubo, una placa de Petri) y permitiendo que el ligando se deposite o recubra las paredes del recipiente. El exceso de ligando se puede lavar y se pueden añadir los péptidos o polipéptidos (por ejemplo, un repertorio que se ha incubado con una proteasa) al recipiente y se mantiene el recipiente bajo condiciones adecuadas para que los péptidos o polipéptidos se unan al ligando inmovilizado. Los péptidos o polipéptidos no unidos se pueden lavar y se pueden recuperar los péptidos o polipéptidos unidos utilizando un procedimiento adecuado, tal como raspado o bajando el pH, por ejemplo.

Las matrices de afinidad por el ligando adecuadas en general contienen un soporte sólido o perla (por ejemplo, de agarosa) a los que se une un ligando covalente o no covalentemente. La matriz de afinidad se puede combinar con péptidos o polipéptidos (por ejemplo un repertorio que se ha incubado con una proteasa) utilizando un sistema por lotes, un proceso en columna o cualquier otro proceso adecuado bajo condiciones adecuadas para unir los péptidos o polipéptidos al ligando en la matriz. Los péptidos o polipéptidos que no se unen a la matriz de afinidad se pueden lavar y los péptidos o polipéptidos unidos se pueden eluir y recuperar utilizando cualquier procedimiento adecuado, tal como elución con un tampón de pH bajo, con un agente desnaturizante suave (por ejemplo, urea) o con un péptido que compita por la unión con el ligando. En un ejemplo, se combina un ligando diana biotinilado con un repertorio bajo condiciones adecuadas para que los péptidos o polipéptidos del repertorio se unan al ligando diana (TNFR1). Los péptidos o polipéptidos unidos se recuperan utilizando avidina o estreptavidina inmovilizada (por ejemplo, en una perla).

En algunas realizaciones, el ligando genérico es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se unen a las características estructurales de péptidos o polipéptidos que están sustancialmente conservadas en los péptidos o polipéptidos de una biblioteca o repertorio

son particularmente útiles como ligandos genéricos. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno adecuados para su uso como ligandos para aislar, seleccionar y/o recuperar los péptidos o polipéptidos resistentes a la proteasa pueden ser monoclonales o policlonales y se pueden preparar cualquier procedimiento adecuado.

BIBLIOTECAS/REPERTORIOS

- 5 En otros aspectos, se proporcionan repertorios de péptidos y polipéptidos resistentes a proteasa, bibliotecas que codifican los péptidos y polipéptidos resistentes a proteasa, y procedimientos para producir tales bibliotecas y repertorios.

10 Las bibliotecas que codifican y/o contienen péptidos y polipéptidos resistentes a proteasa se pueden preparar u obtener utilizando cualquier procedimiento adecuado. La biblioteca se puede diseñar para que codifique péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa basándose en un péptido o polipéptido de interés (por ejemplo, un péptido o polipéptido anti-TNFR1 que se selecciona de una biblioteca) o se puede seleccionar de otra biblioteca utilizando los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, se puede preparar una biblioteca enriquecida en polipéptidos resistentes a proteasa utilizando un sistema de presentación de polipéptidos adecuado.

15 En un ejemplo, se combina una librería de fagos de presentación que comprende un repertorio de polipéptidos presentados que comprenden dominios variables únicos de inmunoglobulina (por ejemplo, V_H , V_K , V_L) con una proteasa bajo condiciones adecuadas para la actividad de la proteasa, como se describe en el presente documento. Los polipéptidos resistentes a la proteasa se recuperan basándose en una actividad biológica deseada, tal como una actividad de unión (por ejemplo, de unión a un ligando genérico, de unión a un ligando diana) produciendo de esta manera una biblioteca enriquecida en polipéptidos resistentes a proteasa. En una realización, la recuperación se basa en la unión a ligandos genéricos para producir una biblioteca enriquecida seguido por la selección de un miembro anti-TNFR1 de esa biblioteca basándose en la unión específica al TNFR1.

20 En otro ejemplo, una biblioteca de fagos de presentación que comprende un repertorio de polipéptidos presentados que comprende dominios variables únicos de inmunoglobulina (por ejemplo, V_H , V_K , V_L) se explora primero para identificar miembros del repertorio que tiene especificidad de unión por un antígeno diana deseado (TNFR1). Se recupera una colección de polipéptidos que tienen la especificidad de unión deseada y la colección se combina con una proteasa bajo condiciones adecuadas para la actividad proteolítica, como se describe en el presente documento. Se recupera una colección de polipéptidos resistentes a la proteasa que tienen la especificidad de unión por la diana deseada, produciendo una biblioteca enriquecida en polipéptidos resistentes a proteasa y con alta afinidad. Como se describe en el presente documento en una realización, la resistencia a la proteasa en este procedimiento de selección se correlaciona con la alta afinidad de unión.

25 Las bibliotecas que codifican un repertorio de un tipo de polipéptidos deseado se puede producir fácilmente utilizando cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, se puede obtener una secuencia de ácido nucleico que codifique un tipo de polipéptido deseado (por ejemplo, una polimerasa, un dominio variable de inmunoglobulina) y se puede preparar una colección de ácidos nucleicos que contenga cada uno una o más mutaciones, por ejemplo, amplificando el ácido nucleico utilizando un sistema de reacción en cadena de la polimerasa propensa a errores (PCR), por mutagénesis química (Deng y col., J. Biol. Chem., 269:9533 (1994)) o utilizando cepas bacterianas mutadoras (Low y col., J. Mol. Biol., 260:359 (1996)).

30 En otras realizaciones, se pueden dirigir regiones particulares del ácido nucleico para la diversificación. Los procedimientos para mutar posiciones seleccionadas también se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, el uso de oligonucleótidos mal emparejados u oligonucleótidos degenerados, con o sin el uso de PCR. Por ejemplo, se han creado bibliotecas de anticuerpos sintéticos dirigiendo las mutaciones a los bucles de unión al antígeno. Las regiones de anticuerpo aleatorias o semi-aleatorias H3 y L3 se han añadido a los segmentos genéticos V de la línea germinal de inmunoglobulinas para producir grandes bibliotecas con regiones de armazón sin mutar (Hoogenboom y Winter (1992) supra; Nissim y col. (1994) supra; Griffiths y col. (1994) supra; DeKruif y col. (1995) supra). Tal diversificación se ha extendido para incluir algunos o todos los otros bucles de unión al antígeno (Crameri y col. (1996) Nature Med., 2:100; Riechmann y col. (1995) Bio/Technology, 13:475; Morphosys, documento WO 97/08320, supra). En otras realizaciones, se pueden dirigir regiones particulares del ácido nucleico para la diversificación, por ejemplo, por una estrategia PCR de dos etapas empleando el producto de la primera PCR como un "mega-cebador". (Véase, por ejemplo, Landt, O. y col., Gene 96:125-128 (1990)). La diversificación dirigida se puede conseguir también, por ejemplo, por SOE PCR. (Véase, por ejemplo, Horton, R.M. y col., Gene 77:61-68 (1989)).

35 La diversidad de secuencia en posiciones seleccionadas se puede conseguir alternando la secuencia codificante que especifica la secuencia del polipéptido tal que se puedan incorporar varios aminoácidos posibles (por ejemplo, los 20 o un subgrupo de los mismos) en esa posición. Utilizando la nomenclatura IUPAC, el codón más versátil es el NNK, que codifica todos los aminoácidos así como el codón de parada TAG. El codón NNK se puede utilizar con el fin de introducir la diversidad necesaria. También se utilizan otros codones con los que se consigue el mismo fin, incluyendo el codón NNN, que dirige la producción de codones de parada TGA y TAA adicionales. Tal estrategia dirigida puede permitir que se explore el espacio de secuencia completo en un área diana.

Las bibliotecas pueden comprender polipéptidos anticuerpos resistentes a proteasa que tengan una conformación de cadena principal conocida. (Véase, por ejemplo, Tomlinson y col., documento WO-99/20749).

Las bibliotecas se pueden preparar en un vector o plásmido adecuado. Como se utiliza en el presente documento, vector se refiere a un elemento independiente que se utiliza para introducir un ADN heterólogo en las células para la expresión y/o replicación del mismo. Se puede utilizar cualquier vector adecuado, incluyendo plásmidos (por ejemplo, plásmidos bacterianos), vectores víricos o bacteriófagos, cromosomas artificiales y vectores episómicos. Tales vectores se pueden utilizar para clonación y mutagénesis simple, o un vector de expresión se puede utilizar para dirigir la expresión de la biblioteca. Los vectores y plásmidos contienen habitualmente uno o más sitios de clonación (por ejemplo, un poliengarce), un origen de replicación y al menos un gen marcador indicador. Los vectores de expresión pueden contener además elementos para dirigir la transcripción y la traducción de un polipéptido, tal como un elemento amplificador, promotor, señal de terminación de la transcripción, secuencias de señal, y similares. Estos elementos se pueden ordenar de tal manera que estén unidos operativamente a una inserción clonada que codifica un polipéptido, tal que el polipéptido se expresa y se produce cuando tal vector de expresión se mantiene bajo condiciones adecuadas para la expresión (por ejemplo, en una célula huésped adecuada).

Los vectores de clonación y expresión contienen en general secuencias de ácido nucleico que hacen posible que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Típicamente, en los vectores de clonación, esta secuencia es la que hace posible que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias que se replican autónomamente. Tales secuencias se conocen para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido de 2 micras es adecuado para levaduras, y varios orígenes víricos (por ejemplo, SV40, adenovirus) son útiles para clonar vectores de células de mamífero. En general, el origen de la replicación no es necesario para los vectores de expresión en mamíferos, a menos de que se utilicen en células de mamífero capaces de replicar altos niveles de ADN, tal como las células COS.

Los vectores de clonación o expresión pueden contener un gen de selección también denominado marcador indicador. Tales genes marcadores codifican una proteína, necesaria para la supervivencia o crecimiento de las células huésped transformadas que se cultivan en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contienen el gen de selección por lo tanto, 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, deficiencias auxotróficas de complementos, o suministro de nutrientes críticos no disponibles en los medios de cultivo.

Los vectores de expresión adecuados pueden contener varios componentes, por ejemplo, un origen de replicación, un gen marcador indicador, uno o más elementos de control, tal como un elemento de control de la transcripción (por ejemplo, un promotor, amplificador, terminador) y/o una o más señales de traducción, una secuencia de señal o secuencia directora, y similares. Los elementos de control de la expresión y una secuencia de señal o directora, si están presentes, pueden proporcionarlas el vector u otra fuente. Por ejemplo, se pueden utilizar las secuencias de control de la transcripción y/o la traducción de un ácido nucleico clonado que codifica una cadena de anticuerpo para la expresión directa.

Se puede proporcionar un promotor para la expresión en una célula huésped deseada. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, un promotor puede estar unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, una cadena de anticuerpo o una parte del mismo, tal que dirija la transcripción del ácido nucleico. Hay disponible una variedad de promotores adecuados para procariotas (por ejemplo, los sistemas de promotor β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, sistema de promotor triptófano (trp), lac, tac, promotores T7 para *E. coli*) y eucariotas (por ejemplo, promotor temprano y tardío de virus 40 de simio, promotor de extremo largo repetido del virus del sarcoma de Rous, promotor de citomegalovirus, promotor tardío de adenovirus, promotor EG-1a).

Además, los vectores de expresión comprenden típicamente un marcador indicador para seleccionar células huésped que albergan el vector, y, en el caso de un vector de expresión replicable, un origen de replicación. Los genes que codifican productos que confieren la resistencia a fármacos o antibióticos son marcadores indicadores comunes y se pueden utilizar en células procariotas (por ejemplo, gen de β -lactamasa (resistencia a ampicilina), gen *Tet* para la resistencia a tetraciclinas) y eucariotas (por ejemplo, genes de resistencia a la neomicina (G418 o geneticina), gpt (ácido micofenólico), ampicilina, o higromicina). Los genes marcadores de la dihidrofolato reductasa permiten la selección con metotrexato en una variedad de huéspedes. Los genes que codifican el producto genético de marcadores auxotróficos del huésped (por ejemplo, *LEU2*, *URA3*, *HIS3*) a menudo se utilizan como marcadores indicadores en levaduras. El uso de vectores víricos (por ejemplo, baculovirus) o fagos, y vectores que son capaces de integrarse en el genoma de la célula huésped, tal como vectores retrovíricos, también se contempla.

Los vectores de expresión adecuados para la expresión en procariotas (por ejemplo, células bacterianas tales como *E. coli*) o células de mamífero incluyen, por ejemplo, un vector pET (por ejemplo, pET-12a, pET-36, pET-37, pET-39, pET-40, Novagen y otros), un vector fago (por ejemplo, pCANTAB 5 E, Pharmacia), pRIT2T (vector de fusión con Protein A, Pharmacia), pCDM8, pCDNA1.1/amp, pCDNA3.1, pRc/RSV, pEF-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), pCMV-

SCRIPT, pFB, pSG5, pXT1 (Stratagene, La Jolla, CA), pCDEF3 (Goldman, L.A., y col., Biotechniques, 21:1013-1015 (1996)), pSVSPORT (GibcoBRL, Rockville, MD), pEFBos (Mizushima, S., y col., Nucleic Acids Res., 18:5322 (1990)) y similares. Hay disponibles vectores de expresión que son adecuados para su uso en la expresión en varios huéspedes, tal como células procariotas (*E. coli*), células de insecto (células S2 de *Drosophila* Schnieder, Sf9), levaduras (*P. methanolica*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*) y células de mamífero (por ejemplo, células COS).

Ejemplos de vectores son vectores de expresión que hacen posible la expresión de una secuencia de nucleótidos que corresponden con un miembro de la biblioteca de polipéptidos. Por lo tanto, la selección con ligandos genéricos y/o diana se puede llevar a cabo por propagación por separado y expresión de un clon único que expresa el miembro de la biblioteca de polipéptidos. Como se ha descrito anteriormente, el sistema de selección por presentación puede ser un bacteriófago de presentación. Por lo tanto, se pueden utilizar vectores fago y fagémido. Un ejemplo de vectores son los vectores fagémidos que tienen un origen de replicación de *E. coli* (para la replicación de doble cadena) y también un origen de replicación del fago (para la producción de un ADN de cadena sencilla). La modificación y expresión de tales vectores se conoce bien en la técnica (Hoogenboom y Winter (1992) supra; Nissim y col. (1994) supra). En resumen, el vector puede contener un gen β -lactamasa para conferir la selectividad en el fagémido y un promotor lac corriente arriba de un casete de expresión que puede contener una secuencia directora adecuada, un sitio de clonación múltiple, uno o más marcadores peptídicos, uno o más codones TAG de parada y la proteína pIII del fago. Por lo tanto, utilizando varias cepas supresoras o no supresoras de *E. coli* y con la adición de glucosa, isopropil-tio- β -D-galactosidasa (IPTG) o un fago auxiliar, tal como el VCS M13, el vector es capaz de replicarse como un plásmido sin expresión, se producen grandes cantidades del miembro de la biblioteca de polipéptidos solamente o producto de fago, algunos de los cuales contienen al menos una copia de la fusión polipéptido-pIII en su superficie.

Las bibliotecas y repertorios descritos en el presente documento pueden contener formatos de anticuerpo. Por ejemplo, el polipéptido que está contenido en las bibliotecas y repertorios puede ser un domino V_H o V_L completo separado, cualquiera de los cuales pueden estar modificados o no modificados. Se pueden producir fácilmente fragmentos scFv, así como otros polipéptidos anticuerpos, utilizando cualquier procedimiento adecuado. Se conocen en la técnica varios procedimientos adecuados de modificación de anticuerpos. Por ejemplo, se puede formar un scFv uniendo ácidos nucleicos que codifican dos dominios variables con un oligonucleótido adecuado que codifica un péptido engarce adecuado, tal como (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ u otros péptidos engarces adecuados. El engarce se une al extremo C de la primera región V y el extremo N de la segunda región V. Se pueden utilizar técnicas similares para la construcción de otros formatos de anticuerpo, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab')₂. Para el formato de fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden combinar los polipéptidos V_H y V_L con segmentos de la región constante, que se puede aislar a partir de genes reordenados, genes C de la línea germinal o sintetizarse a partir de los datos de la secuencia del anticuerpo. Una biblioteca o repertorio que se describe en el presente documento puede ser una biblioteca o repertorio V_H o V_L .

Los polipéptidos que comprenden un dominio variable resistente a proteasa puede comprender un sitio de unión al ligando diana (TNFR1) y un sitio de unión a un ligando genérico. En ciertas realizaciones, el sitio de unión al ligando genérico es un sitio de unión a un superantígeno tal como la proteína A, la proteína L o la proteína G. Los dominios variables se pueden basar en cualquier dominio variable deseado, por ejemplo un V_H humano (por ejemplo, V_H 1a, V_H 1b, V_H 2, V_H 3, V_H 4, V_H 5, V_H 6), un V_L humano (por ejemplo, V_L I, V_L II, V_L III, V_L IV, V_L V, V_L VI o V_K 1) o un V_K humano (por ejemplo, V_K 2, V_K 3, V_K 4, V_K 5, V_K 6, V_K 7, V_K 8, V_K 9 o V_K 10) o un V_{HH} de camélido, que opcionalmente se ha humanizado.

ÁCIDOS NUCLEICOS, CÉLULAS HUÉSPED Y PROCEDIMIENTOS PARA PRODUCIR POLIPÉPTIDOS RESISTENTES A PROTEASAS

La invención se refiere a los ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa, por ejemplo, que se pueden seleccionar o se seleccionan por los procedimientos descritos en el presente documento.

Los ácidos nucleicos a los que se denomina en el presente documento "aislados" son ácidos nucleicos que se han separado de otro material (por ejemplo, otros ácidos nucleicos tal como ADN genómico, ADNc y/o ARN) en su ambiente original (por ejemplo, en las células o en una mezcla de ácidos nucleicos tal como una biblioteca). Un ácido nucleico aislado se puede aislar como parte de un vector (por ejemplo, un plásmido).

Los ácidos nucleicos a los que se denomina en el presente documento "recombinantes" son ácidos nucleicos que se han producido por metodología de ADN recombinante que dependen de la recombinación artificial, tal como clonación en un vector o cromosoma utilizando, por ejemplo, enzimas de restricción, recombinación homóloga, virus y similares, y ácidos nucleicos preparados utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La invención también se refiere a una célula huésped recombinante que comprende un (uno o más) ácido nucleico recombinante o construcción de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido resistente a proteasa, por ejemplo, un péptido o polipéptido que se puede seleccionar o se selecciona por los procedimientos descritos en el presente documento. También se proporciona un procedimiento para preparar un péptido o polipéptido resistente a proteasa, que comprende el mantenimiento de una célula huésped de la invención

bajo condiciones adecuadas para la expresión de un péptido o polipéptido resistente a proteasa. El procedimiento puede comprender además la etapa de aislamiento o recuperación del péptido o polipéptido resistente a proteasa, si así se desea.

Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico (es decir una o más moléculas de ácido nucleico) que codifica un péptido o polipéptido resistente a proteasa, o una construcción de expresión (es decir, una o más construcciones) que comprenden tal(es) molécula(s) de ácido nucleico, se pueden introducir en una célula huésped adecuada para crear una célula huésped recombinante utilizando cualquier procedimiento adecuado para la célula huésped seleccionada (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, infección), tal que la(s) molécula(s) de ácido nucleico está unida operativamente a uno o más elementos de control de expresión (por ejemplo, en un vector, en una construcción creada por procesos en la célula, integrado en el genoma de la célula huésped). La célula huésped recombinante resultante se puede mantener bajo condiciones adecuadas para la expresión (por ejemplo, en presencia de un inductor, en un animal adecuado, en medios de cultivo adecuados suplementados con sales, factores de crecimiento, antibióticos, suplementos nutricionales, etc., adecuados), de manera que se produce el péptido o polipéptidos que se codifica. Si se desea, el péptido o polipéptido codificado se puede aislar o recuperar (por ejemplo, a partir del animal, la célula huésped, el medio, la leche). Este proceso engloba la expresión en una célula huésped de un animal transgénico (véase, por ejemplo, el documento WO 92/03918, GenPharm International).

El péptido o polipéptido resistente a proteasa que se selecciona por el procedimiento descrito en el presente documento se puede producir también en un sistema de expresión *in vitro* adecuado, por síntesis química o por cualquier otro procedimiento adecuado. Por lo tanto, la presente invención proporciona péptidos y polipéptidos resistentes a proteasa.

POLIPÉPTIDOS, dAb Y ANTAGONISTAS

Como se describe y ejemplifica en el presente documento, los dAb resistentes a proteasa de la invención se unen generalmente a su ligando diana con alta afinidad. Por lo tanto, en otro aspecto, se proporciona un procedimiento para seleccionar, aislar y/o recuperar un polipéptido o dAb de la invención que se une al TNFR1 con alta afinidad. En general, el procedimiento comprende proporcionar una biblioteca o repertorio de péptidos o polipéptidos (por ejemplo, dAb), combinar la biblioteca o repertorio con una proteasa (por ejemplo, tripsina, elastasa, leucozima, pancreatina, esputo) bajo condiciones adecuadas para la actividad de proteasa, y seleccionar, aislar y/o recuperar un péptido o polipéptido que se une a un ligando (por ejemplo, un ligando diana). Debido a que la librería o repertorio se ha expuesto a una proteasa bajo condiciones en las que los péptidos o polipéptidos sensibles a la proteasa se digieren, la actividad de la proteasa puede eliminar los polipéptidos menos estables que tienen una afinidad de unión baja, y de esta manera se produce una colección de péptidos o polipéptidos con alta afinidad de unión. Por ejemplo, el polipéptido o dAb de la invención se puede unir al TNFR1 con una afinidad (K_D ; $K_D = K_{off}(kd)/K_{on}(ka)$) como se determina por resonancia de plasmones superficiales) de un μM o más fuerte, aproximadamente 500 nM a aproximadamente 0,5 pM. Por ejemplo, el polipéptido o dAb de la invención se puede unir al TNFR1 con una afinidad de aproximadamente 500 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 10 pM o aproximadamente 0,5 pM. Aunque sin quedar ligados por teoría alguna, se cree que los péptidos y polipéptidos que son resistentes a las proteasas tienen una entropía más baja y/o una energía de estabilización más alta. Por lo tanto, la correlación entre la resistencia a la proteasa y la alta afinidad de unión se puede relacionar con la compactibilidad y estabilidad de las superficies de los péptidos y polipéptidos y dAb que se seleccionan con el procedimiento descrito en el presente documento.

En una realización, el polipéptido, dAb o antagonista de la invención inhibe la unión del TNF alfa al receptor de TNF alfa I (receptor p55) con una concentración inhibitoria 50 (CI50) de o aproximadamente 500 nM a 50 pM, o 100 nM a 50 pM, o 10 nM a 100 pM, o 1 nM a 100 pM; por ejemplo 50 nM o menos, o 5 nM o menos, o 500 pM o menos, o 200 pM o menos, o 100 pM o menos.

En ciertas realizaciones, el polipéptido, dAb o antagonista se une específicamente al TNFR1, por ejemplo, el TNFR1 humano, y se disocia del TNFR1 humano con una constante de disociación (K_D) de 300 nM a 1 pM o 300 nM a 5 pM o 50 nM a 1 pM o 50 nM a 5 pM o 50 nM a 20 pM o aproximadamente 10 pM o aproximadamente 15 pM o aproximadamente 20 pM como se determina por resonancia de plasmones superficiales. En ciertas realizaciones, el polipéptido, dAb o antagonista se une específicamente al TNFR1, por ejemplo, el TNFR1 humano, y se disocia del TNFR1 humano con una tasa constante K_{off} de $5 \times 10^{-1} s^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} s^{-1}$ o $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} s^{-1}$ o $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} s^{-1}$ o $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} s^{-1}$ o $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ o $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ como se determina por resonancia de plasmones superficiales. En ciertas realizaciones, el polipéptido, dAb o antagonista se une específicamente al TNFR1, por ejemplo, al TNFR1 humano, con una K_{on} de $1 \times 10^{-3} M^{-1}s^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} M^{-1}s^{-1}$ o $1 \times 10^{-3} M^{-1}s^{-1}$ a $1 \times 10^{-6} M^{-1}s^{-1}$ o aproximadamente $1 \times 10^{-4} M^{-1}s^{-1}$ o aproximadamente $1 \times 10^{-5} M^{-1}s^{-1}$. En una realización, el polipéptido, dAb o antagonista se une específicamente al TNFR1, por ejemplo al TNFR1 humano, y se disocia del TNFR1 humano con una constante de disociación (K_D) y una K_{off} como se define en el presente párrafo. En una realización, el polipéptido, dAb o antagonista se une específicamente al TNFR1, por ejemplo, TNFR1 humano, y se disocia del TNFR1 humano con una constante de disociación (K_D) y una K_{on} como se define en el presente párrafo. En algunas realizaciones, el polipéptido o dAb se une específicamente al TNFR1 (por ejemplo, al TNFR1 humano) con una K_D y/o una K_{off} y/o una K_{on} como se dicta

en el presente párrafo y comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos o aproximadamente al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o un 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos del DOMlh-131-206 (que se muestra en la figura 3).

- 5 El polipéptido, dAb o antagonista se puede expresar en *E. coli* o en especies de *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*). En una realización, el ligando o el monómero dAb se segrega en una cantidad de al menos aproximadamente 0,5 mg/l cuando se expresa en *E. coli* o en especies de *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*). Aunque los ligandos y monómeros de dAb descritos en el presente documento pueden segregarse cuando se expresan en *E. coli* o especies de *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*), se pueden producir cualquier procedimiento adecuado, tal como por procedimientos sintéticos químicos o procedimientos biológicos de producción que no emplean *E. coli* ni especies de *Pichia*.
- 10 En algunas realizaciones, el polipéptido, dAb o antagonista no comprende un dominio variable de inmunoglobulina de camélido, o uno o más aminoácidos del armazón que son únicos de los dominios variables de inmunoglobulina codificados por los segmentos genéticos de la línea germinal de anticuerpo de camélidos, por ejemplo, en la posición 108, 37, 44, 45 y/o 47.
- 15 Los antagonistas del TNFR1 de acuerdo con la invención pueden ser monovalentes o multivalentes. En algunas realizaciones, el antagonista es monovalente y contiene un sitio de unión que interactúa con el TNFR1, el sitio de unión lo proporciona un polipéptido o dAb de la invención. Los antagonistas monovalentes se unen a un TNFR1 y pueden no inducir unión cruzada o agrupamiento de TNFR1 en la superficie de las células lo que puede dar lugar a la activación del receptor y la transducción de la señal.
- 20 En otras realizaciones, el antagonista es multivalente. Los antagonistas multivalentes de TNFR1 pueden contener dos o más copias de un sitio de unión particular para el TNFR1 o contienen dos o más sitios de unión diferentes que se unen al TNFR1, siendo al menos uno de los sitios de unión proporcionado por un polipéptido o dAb de la invención. Por ejemplo, como se describe en el presente documento el antagonista de TNFR1 puede ser un dímero, trímero o multímero que comprende dos o más copias de un polipéptido o dAb particular de la invención que se une al TNFR1, o dos o más polipéptidos o dAb de la invención diferentes que se unen al TNFR1. En una realización, un antagonista multivalente de TNFR1 no agoniza sustancialmente con TNFR1 (actúa como un agonista del TNFR1) en un ensayo celular de referencia (es decir cuando está presente en una concentración de 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1000 μM o 5.000 μM, que resulta en no más de aproximadamente el 5% de la actividad mediada por TNFR1 inducida por el TNFα (100 pg/ml) en el ensayo).
- 25 En ciertas realizaciones, el antagonista multivalente de TNFR1 contiene dos o más sitios para un epítipo o dominio de TNFR1 deseado. Por ejemplo, el antagonista multivalente de TNFR1 puede comprender dos o más sitios de unión que se unen al mismo epítipo en el Dominio 1 del TNFR1.
- 30 En otras realizaciones, el antagonista multivalente de TNFR1 contiene dos o más sitios de unión proporcionados por los polipéptidos o dAb de la invención que se unen a diferentes epítopos o dominios de TNFR1. En una realización, tales antagonistas multivalentes no agonizan con TNFR1 cuando están presentes en una concentración de aproximadamente 1 nM, o aproximadamente 10 nM, o aproximadamente 100 nM, o aproximadamente 1 μM, o aproximadamente 10 μM, en un ensayo de toxicidad en L929 de referencia o un ensayo de IL-8 en HeLa de referencia como se describe en el documento WO2006038027.
- 35 Otros antagonistas de TNFR1 no inhiben la unión del TNFα al TNFR1. Tales ligandos (y antagonistas) pueden tener utilidad como agentes de diagnóstico, debido a que se pueden utilizar para unirse y detectar, cuantificar o medir el TNFR1 en una muestra y no competirán con el TNF en la muestra por la unión al TNFR1. En consecuencia, se puede hacer una determinación precisa de si o cuánto TNFR1 hay en la muestra.
- 40 En otras realizaciones, el polipéptido, dAb o antagonista se une específicamente al TNFR1 con una K_D descrita en el presente documento e inhibe la mortalidad en un modelo de ratón de choque séptico inducido por D-galactosamina/LPS (es decir, evita la mortalidad o reduce la mortalidad en al menos aproximadamente un 10%, en comparación con un control adecuado). En una realización, el polipéptido, dAb o antagonista inhibe la mortalidad en al menos aproximadamente un 25%, o en al menos aproximadamente un 50%, en comparación con un control adecuado en un modelo de ratón de choque séptico inducido por D-galactosamina/LPS cuando se administra a aproximadamente 5 mg/kg o más, por ejemplo aproximadamente 1mg/kg.
- 45 En otras realizaciones, el polipéptido, dAb o antagonista se une al TNFR1 y antagoniza la actividad del TNFR1 en un ensayo celular de referencia con una DN_{50} de ≤ 100 nM, y a una concentración de ≤ 10 μM el dAb agoniza la actividad del TNFR1 en $\leq 5\%$ en el ensayo.
- 50 En realizaciones particulares, el polipéptido, dAb o antagonista no agoniza sustancialmente al TNFR1 (actúa como agonista de TNFR1) en un ensayo celular de referencia (es decir cuando está en una concentración de 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1000 μM o 5.000 μM, que resulta en no más de aproximadamente el 5% de la actividad mediada por TNFR1 inducida por el TNFα (100 pg/ml) en el ensayo).
- 55

En ciertas realizaciones, el polipéptido, 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 aproximadamente de 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg (por ejemplo, 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 modelos de enfermedad inflamatoria crónica (véase los descritos en el documento WO2006038027) son reconocidos por los expertos en la técnica ya que prevén la eficacia terapéutica en seres humanos.

En realizaciones particulares, el polipéptido, dAb o antagonista es eficaz en el modelo de referencia en ratón de artritis inducida por colágeno (véase el documento WO2006038027 para los detalles del modelo). Por ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del polipéptido, dAb o antagonista puede reducir la puntuación artrítica media de la suma de las cuatro patas en el modelo de referencia en ratón de artritis inducida por colágeno, 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 de un polipéptido, dAb o antagonista puede retrasar la aparición de síntomas de artritis en el modelo de referencia en ratón de artritis inducida por colágeno, 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 polipéptido, dAb o antagonista puede resultar en una puntuación artrítica media de la suma de las cuatro patas en el modelo de referencia en ratón de artritis inducida por colágeno 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 realizaciones, el polipéptido, dAb o antagonista es eficaz en el modelo Δ ARE de artritis en ratón (véase el documento WO2006038027 para detalles del modelo). Por ejemplo, administrando una cantidad eficaz del polipéptido, dAb o antagonista se puede reducir la puntuación artrítica media en el modelo Δ ARE de artritis en ratón, por ejemplo, en aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 1 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 polipéptido, dAb o antagonista puede retrasar la aparición de los síntomas de artritis en el modelo Δ ARE de artritis en ratón en, por ejemplo, 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 polipéptido, dAb o antagonista puede dar como resultado una puntuación artrítica media en el modelo Δ ARE de artritis en ratón 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 realizaciones, el polipéptido, dAb o antagonista es eficaz en el modelo Δ ARE de enfermedad inflamatoria del intestino grueso (IBD) en ratón (véase el documento WO2006038027 para detalles sobre el modelo). Por ejemplo, administrando una cantidad eficaz del polipéptido, dAb o antagonista se puede reducir la puntuación media de inflamación aguda y/o crónica en el modelo Δ ARE de IBD en ratón, por ejemplo, en aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 1 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 polipéptido, dAb o antagonista puede retrasar la aparición de los síntomas de IBD en el modelo Δ ARE de IBD en ratón en, por ejemplo, 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 polipéptido, dAb o antagonista puede dar como resultado una puntuación artrítica media en el modelo Δ ARE de IBD en ratón 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 realizaciones, el polipéptido, dAb o antagonista es eficaz en el modelo sulfato sódico dextrano (DSS) de enfermedad inflamatoria del intestino grueso (IBD) inducida en ratón (véase el documento WO2006038027 para detalles sobre el modelo). Por ejemplo, administrando una cantidad eficaz del polipéptido, dAb o antagonista se puede reducir la puntuación media de gravedad en el modelo DSS de IBD en ratón, por ejemplo, en aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 1 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 polipéptido, dAb o antagonista puede retrasar la aparición de los síntomas de IBD en el modelo DSS de IBD en ratón

en, por ejemplo, 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 polipéptido, dAb o antagonista puede dar como resultado una puntuación media de gravedad en el modelo DSS de IBD en ratón 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 realizaciones particulares, el polipéptido, dAb o antagonista es eficaz en el modelo de humo de tabaco en ratón de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (véase el documento WO2006038027 y el documento WO2007049017 para detalles del modelo). Por ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede reducir o retrasar la aparición de los síntomas de COPD, en comparación con un control adecuado.

Están disponibles sistemas de modelos animales que se pueden utilizar para explorar la eficacia de los antagonistas del TNFR1 (por ejemplo, ligandos, anticuerpos o proteínas de unión de los mismos) para proteger contra o para tratar la enfermedad. Los procedimientos para ensayar el lupus eritematoso sistémico (LES) en ratones susceptibles se conocen en la técnica (Knight y col. (1978) J. Exp. Med., 147: 1653; Reinersten y col. (1978) New Eng. J. Med., 299: 515). La miastenia gravis (MG) se ensaya en ratones SJL/J hembra induciendo la enfermedad con proteína AchR soluble de otras especies (Lindstrom y col. (1988) Adv. Immunol., 42: 233). La artritis se induce en una estirpe susceptible de ratón por inyección de colágeno tipo II (Stuart y col. (1984) Ann. Rev. Immunol., 42: 233). Se ha descrito un modelo por el que se induce un adyuvante de artritis en ratas susceptibles por inyección de proteína de choque térmico micobacteriana (Van Eden y col. (1988) Nature, 331: 171). La tiroiditis se induce en ratones por la administración de tiroglobulina como se ha descrito (Maron y col. (1980) J. Exp. Med., 152: 1115). La diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) se produce naturalmente o puede inducirse en ciertas estirpes de ratón tal como las que describen Kanasawa y col. (1984) Diabetologia, 27: 113. El EAE en ratón y rata sirve como modelo para la MS humana. En este modelo, la enfermedad desmielinizante se induce por la administración de proteína básica de mielina (véase Paterson (1986) Textbook of Immunopathology, Mischer y col., eds., Grune y Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin y col. (1973) Science, 179: 478; y Satoh y col. (1987) J. Immunol., 138: 179).

En general, los presentes ligandos (por ejemplo, antagonistas) se utilizarán en su forma purificada junto con vehículos farmacológicamente apropiados. Típicamente, estos vehículos incluyen soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, cualquiera que incluya medios salinos y/o tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico y lactato de Ringer. Se pueden escoger adyuvantes aceptables fisiológicamente adecuados, si fuera necesario para mantener un complejo de polipéptidos en suspensión, de entre espesantes tal como la carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.

Los vehículos intravenosos incluyen fluidos y reconstituyentes de nutrientes y reconstituyentes de electrolitos, tal como los que se basan en dextrosa de Ringer. También puede haber presentes conservantes y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición). Se pueden utilizar una variedad de formulaciones adecuadas, incluyendo formulaciones de liberación extendida.

Los ligandos (por ejemplo, los antagonistas) de la presente invención se pueden utilizar como composiciones que se administran por separado, o en conjunción con otros agentes. Estos pueden incluir varios fármacos inmunoterápicos, tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino, e inmunotoxina. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de varios agentes citotóxicos u otros agentes en conjunción con los ligandos de la presente invención, o incluso combinaciones de ligandos de acuerdo con la presente invención que tienen diferentes especificidades, tales como ligandos que se seleccionan diferentes antígenos diana o epítomos, estén o no agrupados antes de la administración.

La vía de administración de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede ser cualquiera de las que conocen comúnmente los expertos habituados en la técnica. Como terapia, incluyendo sin limitación la inmunoterapia, los ligandos seleccionados de la invención se pueden administrar a cualquier paciente de acuerdo con las técnicas de referencia.

La administración puede ser por cualquier modo apropiado, que incluye la vía parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, vía pulmonar, o también, adecuadamente, por infusión directa con un catéter. La dosificación y frecuencia de administración dependerá de la edad, sexo y estado del paciente, administración concurrente de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros a tener en cuenta por el médico. La administración puede ser local (por ejemplo, suministro local del pulmón por administración pulmonar, por ejemplo, administración intranasal) o sistémica como esté indicado.

Los ligandos de la presente invención se pueden liofilizar para almacenarlos y reconstituílos en un vehículo adecuado antes de su uso. Esta técnica ha demostrado que es eficaz con inmunoglobulinas convencionales y se pueden emplear técnicas de liofilización y reconstitución que se conocen en la técnica. Los expertos en la técnica apreciarán que la liofilización y reconstitución puede dar lugar a varios grados de pérdida de actividad (por ejemplo,

las inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG) y que los niveles de utilización se tienen que ajustar al alza para compensar.

Las composiciones que contienen los presentes ligandos (por ejemplo, antagonistas) o un cóctel de los mismos se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En ciertas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para conseguir al menos una inhibición parcial, supresión, modulación, destrucción, o algún otro parámetro medible, de una población de células seleccionadas se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades que se necesitan para conseguir esta dosificación dependerá de la gravedad de la enfermedad y el estado general del propio sistema inmunitario del paciente, pero en general varía desde 0,005 a 5,0 mg de ligando, por ejemplo un dAb o antagonista por kilogramo de peso corporal, siendo las dosis de 0,05 a 2,0 mg/kg/dosis las más utilizadas. Para las aplicaciones profilácticas, se pueden administrar las composiciones que contienen los presentes ligandos o cócteles de los mismos en dosificaciones similares o ligeramente más bajas, para evitar, inhibir o retrasar la aparición de la enfermedad (por ejemplo, para una sostener una remisión o inactividad, o para prevenir una fase aguda). El clínico experto será capaz de determinar el intervalo de dosificación apropiado para tratar, suprimir o prevenir la enfermedad. Cuando un ligando de TNFR1 (por ejemplo, un antagonista) se administra para tratar, suprimir o prevenir una enfermedad inflamatoria crónica, se puede administrar hasta cuatro veces al día, dos veces por semana, una vez 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 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 realizaciones particulares, el ligando de TNFR1 (por ejemplo, el 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 (por ejemplo, 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 que se lleva a cabo utilizando las composiciones descritas en el presente documento se considera "eficaz" si se reducen uno o más síntomas (por ejemplo, en al menos un 10% o al menos un punto en una escala de evaluación clínica), con respecto a tales síntomas presentes antes del tratamiento, respecto a tales síntomas en un individuo (ser humano o modelo animal) que no se trate con tal composición u otro control adecuado. Los síntomas variarán obviamente dependiendo de la enfermedad o trastorno al que se dirige, pero puede medirlo un médico o técnico experto habituado. Tales síntomas se pueden medir, por ejemplo, controlando el nivel de uno o más indicadores bioquímicos de la enfermedad o trastorno (por ejemplo, niveles de una enzima o metabolito correlacionado con la enfermedad, número de células afectadas, etc.), controlando las manifestaciones físicas (por ejemplo, inflamación, tamaño tumoral, etc.), o por una escala de evaluación clínica aceptada, por ejemplo, la escala de estado de discapacidad expandida (para la esclerosis múltiple), el cuestionario de enfermedad inflamatoria del intestino grueso de Irvine (evaluación de 32 puntos que evalúa la calidad de vida con respecto a la función del intestino grueso, síntomas sistémicos, función social y estado emocional - la puntuación varía de 32 a 224, indicando las puntuaciones más altas una mejor calidad de vida), la escala de calidad de vida en artritis reumatoide, u otra escala de evaluación clínica aceptada como se conoce en el campo. Una reducción sostenida (por ejemplo, un día o más, o más larga) de los síntomas de la enfermedad o trastorno en al menos un 10% o en uno o más puntos de una escala clínica determinada es indicativa de un tratamiento "eficaz". De manera similar, la profilaxis que se lleva a cabo utilizando una composición como se describe en el presente documento es "eficaz" si se retrasa, reduce o abole la aparición o gravedad de uno o más síntomas con respecto a tales síntomas en un individuo similar (ser humano o modelo animal) que no se trata con la composición.

Una composición que contiene un ligando (por ejemplo, un antagonista) o cóctel de los mismos de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en grupos profilácticos y terapéuticos para ayudar en la alteración, inactivación, destrucción o eliminación de una población diana seleccionada en un mamífero. Además, los repertorios seleccionados de polipéptidos que se describen en el presente documento se pueden utilizar extracorpóreamente, o *in vitro* selectivamente para destruir, vaciar o eliminar eficazmente de otra manera una población celular diana de una colección heterogénea de células. Se puede combinar la sangre de un mamífero de manera extracorpórea con los ligandos de manera que se destruyan o se eliminan de otra manera las células no deseadas de la sangre para devolverla al mamífero de acuerdo con técnicas de referencia.

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

Los ligandos (por ejemplo, los antagonistas anti-TNFR1, monómeros de dAb) se pueden administrar y/o formular junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales o agentes activos. Cuando un ligando (por ejemplo, un dAb) se administra con un agente terapéutico adicional, el ligando se puede administrar antes, simultáneamente con o posteriormente a la administración del agente adicional. En general, el ligando y el agente adicional se administran en una manera que proporciona un solapamiento del efecto terapéutico.

En una realización, la invención es un polipéptido, dAb o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento, supresión o prevención de una enfermedad inflamatoria crónica.

En una realización, la invención es un polipéptido, dAb o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento, supresión o prevención de la artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica).

En otra realización, la invención es un polipéptido, dAb o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento, supresión o prevención de la psoriasis.

En otra realización, la invención es un polipéptido, dAb o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento, supresión o prevención de una enfermedad inflamatoria del intestino grueso (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa).

En otra realización, la invención es un polipéptido, dAb o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento, supresión o prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (por ejemplo, bronquitis crónica, bronquitis obstructiva crónica, enfisema).

En otra realización, la invención es un polipéptido, dAb o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento, supresión o prevención de la neumonía (por ejemplo, neumonía bacteriana, tal como la neumonía estafilocócica).

La invención proporciona usos para tratar, suprimir o prevenir otras enfermedades pulmonares además de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la neumonía. Las otras enfermedades pulmonares que se pueden tratar, suprimir o prevenir de acuerdo con la invención incluyen, por ejemplo, fibrosis quísticas y asma (por ejemplo asma resistente a esteroides). Por lo tanto, en otra realización, la invención es un polipéptido, dAb o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento, supresión o prevención de una enfermedad pulmonar (por ejemplo, fibrosis quísticas, asma).

En realizaciones particulares, un antagonista del TNFR1 se administra por medio de suministro pulmonar, tal como por inhalación (por ejemplo, intrabronquial, inhalación intranasal u oral, gotas intranasales) o por suministro sistémico (por ejemplo, parenteral, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo).

En otra realización, la divulgación es un polipéptido, dAb o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento, supresión o prevención del choque séptico.

En un aspecto más de la invención, se proporciona una composición que comprende un polipéptido, dAb o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Además, la presente divulgación proporciona un polipéptido, dAb o antagonista del TNFR1 o una composición de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En una realización la enfermedad es el cáncer o una enfermedad inflamatoria, por ejemplo, artritis reumatoide, asma o enfermedad de Crohn.

FORMATOS

El aumento de la semivida es útil en aplicaciones de inmunoglobulinas *in vivo*, especialmente para los anticuerpos y más especialmente para los fragmentos de anticuerpo de pequeño tamaño. Tales fragmentos Fv, Fv unidos por enlaces disulfuro, Fab, scFv, dAb) sufren un aclaramiento rápido en el cuerpo; por lo tanto, aunque son capaces de alcanzar la mayoría de las partes del cuerpo rápidamente, y se producen rápidamente y son fáciles de manipular, sus aplicaciones *in vivo* están limitadas solamente por su breve persistencia *in vivo*. Una realización de la invención resuelve este problema proporcionando un aumento de la semivida de los ligandos *in vivo* y en consecuencia tiempos más largos de persistencia en el cuerpo de la actividad funcional del ligando.

Los procedimientos para los análisis farmacocinéticos y la determinación de la semivida son familiares para los expertos en la técnica. Se pueden encontrar los detalles en Kenneth, A y col: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y en Peters y col, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, published by Marcel Dekker, 2nd Rev. edición (1982), que describe los parámetros farmacocinéticos tales como las semividas t_{α} y t_{β} y el área bajo la curva (AUC).

Las semividas ($t_{1/2}$ alfa y $t_{1/2}$ beta) y el AUC se pueden determinar a partir de una curva de la concentración del ligando en el suero contra el tiempo. Se puede utilizar el paquete de análisis WinNonlin (disponible en Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, USA), por ejemplo, para modelar la curva. En una primer fase (la fase alfa) el ligando se somete principalmente a la distribución en el paciente, con alguna eliminación. Una segunda fase (la fase beta) es la fase terminal cuando el ligando se ha distribuido y la concentración en el suero disminuye según se va aclarando el ligando del paciente. La semivida t alfa es la semivida de la primera fase y la semivida t beta es la semivida de la segunda fase. Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona un ligando o una composición que comprende un ligando de acuerdo con la invención que tiene una semivida $t\alpha$ en el intervalo de 15 minutos o más. En una realización el límite inferior del intervalo es de 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o de manera alternativa, un ligando o composición de acuerdo con la invención tendrá una semivida $t\alpha$ en el intervalo de hasta 12 horas incluidas. En una realización, el límite 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, 2 a 5 horas o 3 a 4 horas.

En una realización, la presente invención proporciona un ligando (polipéptido, dAb o antagonista) o una composición que comprende un ligando de acuerdo con la invención que tiene una semivida $t\beta$ en el intervalo de 2,5 horas o más. En una realización, el límite inferior del intervalo es de 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas, o 12 horas. Además o de manera alternativa, un ligando o composición de acuerdo con la invención tiene una semivida $t\beta$ en el intervalo de hasta 21 días incluidos. En una realización, el límite superior del intervalo es de 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días o 20 días. En una realización, un ligando o composición de acuerdo con la invención tendrá una semivida $t\beta$ en el intervalo de 12 a 60 horas. En una realización más, estará en un intervalo de 12 a 48 horas. En una realización más, estará en el intervalo de 12 a 26 horas.

Además, o alternativamente a los criterios anteriores, la presente invención proporciona un ligando o una composición que comprende un ligando de acuerdo con la invención que tiene un valor AUC (área bajo la curva) en el intervalo de 1 mg.min/ml o más. En una realización, el límite inferior del intervalo es 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 o 300 mg.min/ml. Además, en una realización, el límite superior del intervalo es 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 o 50 mg.min/ml. En una realización un ligando de acuerdo con la invención tendrá un AUC en el intervalo que se selecciona de entre el grupo que consiste en el siguiente: 15 a 150 mg.min/ml, 15 a 100 mg.min/ml; y 15 a 50 mg.min/ml.

Los polipéptidos y dAb de la invención y los antagonistas comprenden los que se pueden formatear para que tengan un mayor tamaño hidrodinámico, por ejemplo, uniéndose a un grupo PEG, albúmina sérica, transferrina, receptor de transferrina o al menos la parte de unión a la transferrina del mismo, una región Fc de anticuerpo, o por conjugación con un dominio de anticuerpo. Por ejemplo, los polipéptidos, dAb y antagonistas se formatean más grandes como un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo o como un anticuerpo (por ejemplo, se formatean como un Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv).

El tamaño hidrodinámico de los ligandos (por ejemplo, monómeros y multímeros de dAb) de la invención se puede determinar utilizando procedimientos que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la cromatografía por filtración en gel para determinar el tamaño hidrodinámico de un ligando. Las matrices de filtración en gel adecuadas para determinar los tamaños hidrodinámicos de los ligandos tal como las matrices de agarosa reticuladas, se conocen bien y están disponibles fácilmente.

El tamaño de un formato de ligando (por ejemplo, el tamaño de un resto PEG unido a un monómero de dAb), se puede variar dependiendo de la aplicación que se desee. Por ejemplo, cuando se pretende que el ligando deje la circulación y entre en los tejidos periféricos, es deseable mantener un tamaño hidrodinámico bajo del ligando para facilitar la extravasación desde la corriente sanguínea. De manera alternativa, cuando se desea que el ligando permanezca en la circulación sistémica durante un periodo de tiempo más largo el tamaño del ligando se tiene que aumentar, por ejemplo formateándolo como una proteína tipo Ig.

Extensión de la semivida dirigiendo a un antígeno o epítipo que aumenta la semivida *in vivo*

El tamaño hidrodinámico de un ligando y su semivida en el suero también se puede aumentar conjugando o asociando un polipéptido, dAb o antagonista de unión al TNFR1 de la invención a un dominio de unión (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que une un antígeno o epítipo que aumenta la semivida *in vivo*, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el agente de unión al TNFR1 (por ejemplo, un polipéptido) se puede conjugar o unir a un anticuerpo anti-seroalbúmina o un anticuerpo anti-receptor Fc neonatal o a un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un dAb, Fab, Fab', o scFv anti-SA o anti-receptor Fc neonatal, o a un aficuerpo anti-SA o un aficuerpo del receptor Fc neonatal o a un avímero anti-SA, o a un dominio de unión anti-SA que comprende un armazón que se selecciona de entre, pero preferentemente no limitado al grupo que consisten en CTLA-4, lipocalina, SpA, un aficuerpo, un avímero, GroEl y fibronectina (véase el documento PCT/GB2008/000453 presentado el 8 de febrero de 2008 que desvela estos dominios de unión). La conjugación se refiere a una composición que comprende un polipéptido, dAb o antagonista de la invención que está enlazado (covalente o no covalentemente) a un dominio de unión que se une a la albúmina sérica.

Los polipéptidos adecuados que aumentan la semivida en el suero *in vivo* incluyen, por ejemplo, las proteínas de fusión agentes neurofarmacéuticos del ligando específico del receptor de transferrina (véase la Patente de EE. UU. N° 5.977.307), el receptor celular endotelial capilar, transferrina, receptor de transferrina (por ejemplo, el receptor de transferrina soluble), insulina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF 1), receptor del factor de crecimiento tipo insulina 2 (IGF 2), receptor de insulina, factor X de coagulación sanguínea, α 1-antitripsina y HNF 1 α . Los polipéptidos adecuados que aumentan la semivida en el suero incluyen también la glucoproteína alfa-1 (orosomucoide; AAQ), antiqumiotripsina alfa-1 (ACT), microglobulina alfa-1 (proteína HC; AIM), antitrombina III (AT III), apolipoproteína A-1 (Apo A-1), apolipoproteína B (Apo B), ceruloplasmina (Cp), componente complemento C3 (C3), componente complemento C4 (C4), inhibidor de esterasa C1 (C1 INH), proteína C-reactiva (CRP), ferritina (FER), hemopexina (HPX), lipoproteína (a) (Lp(a)), proteína de unión a manosa (MBP), mioglobina (Myo), prealbúmina (transtiretina; PAL), proteína de unión al retinol (RBP), y factor reumatoide (RF).

Las proteínas adecuadas de la matriz extracelular incluyen, por ejemplo, colágenos, lamininas, integrinas y fibronectina. Los colágenos son las proteínas más importantes de la matriz extracelular. Se conocen actualmente aproximadamente 15 tipos de moléculas de colágeno, que se encuentran en diferentes partes del cuerpo, por ejemplo, el colágeno tipo I (que supone el 90% del colágeno del cuerpo) se encuentra en hueso, piel, tendones, ligamentos, córnea, órganos internos o el colágeno tipo II que se encuentra en el cartílago, discos vertebrales, notocorda, y humor vítreo del ojo.

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

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

Los polipéptidos adecuados que aumentan la semivida en el suero *in vivo* también incluyen proteínas que se localizan en el riñón (por ejemplo, policistina, colágeno tipo IV, transportador K1 de anión orgánico, antígeno de Heymann), proteínas localizadas en el hígado (por ejemplo, alcohol deshidrogenasa, G250), proteínas localizadas en el pulmón (por ejemplo, componente secretor, que se une a la IgA), proteínas localizadas en el corazón (por ejemplo, HSP 27, que se asocia con cardiomiopatía dilatada), proteínas localizadas en la piel (por ejemplo, queratina), proteínas específicas del hueso tales como proteínas morfogénicas (BMP), que son un subgrupo de la superfamilia de proteínas del factor β transformante del crecimiento que han demostrado una actividad osteogénica (por ejemplo, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8), proteínas específicas de tumores (por ejemplo, antígeno trofoblástico, receptor herceptina, receptor estrogénico, catepsinas (por ejemplo, catepsina B, que se puede encontrar en el hígado y bazo)).

Las proteínas específicas de enfermedad adecuadas incluyen, por ejemplo, antígenos que se expresan solo en linfocitos T activados, que incluyen LAG-3 (gen de activación de linfocitos), ligando de osteoprotegerina (OPGL; véase Nature 402, 304-309 (1999)), OX40 (un miembro de la familia del receptor de TNF, que se expresa en linfocitos T activados y específicamente regulado positivamente en las células que producen virus de leucemia tipo I (HTLV-1) de linfocitos T humanos; véase Immunol. 165 (1):263-70 (2000)). Las proteínas específicas de enfermedad adecuadas incluyen, por ejemplo, metaloproteasas (asociadas con artritis/cánceres) que incluyen CG6512 de *Drosophila*, paraplegina humana, FtsH humana, AFG3L2 humana, ftsH murina; y factores de crecimiento angiogénico, que incluyen factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGF-1) factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2), factor de crecimiento endotelial vascular/factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF), factor transformante del crecimiento- α (TGF α), factor de necrosis tumoral (TNF- α), angiogenina, interleucina-3 (IL-3), interleucina-8 (IL-8), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento placentario (P1GF), midkina del factor de crecimiento derivado de plaquetas - BB (PDGF), y fractalquina.

Los polipéptidos adecuados que aumentan la semivida *in vivo* también incluyen las proteínas de presión tales como las proteínas de choque térmico (HSP). Las HSP se encuentran normalmente intracelularmente. Cuando se encuentran extracelularmente, es un indicador de que la célula ha muerto y ha vertido sus contenidos. Cuando se produce esta muerte celular no programada (necrosis) como resultado de un traumatismo, enfermedad o lesión, las HSP extracelulares desencadenan una respuesta del sistema inmunitario. La unión a HSP extracelulares puede dar como resultado la localización de las composiciones de la invención en el sitio de la enfermedad.

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

dAb que se unen a la albúmina sérica

La invención en una realización proporciona un polipéptido o antagonista (por ejemplo, ligandos específicos duales que comprenden un dAb anti-TNFR1 (un primer dAb)) que se une al TNFR1 y un segundo dAb que se une a la albúmina sérica (SA), el segundo dAb se une a la SA con una K_D como se determina por resonancia de plasmones superficiales de 1 nM a 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 200, 300, 400 o 500 μ M (es decir, $\times 10^{-9}$ a 5×10^{-4}), o de 100 nM a 10 μ M, o 1 a 5 μ M o de 3 a 70 nM o de 10 nM a 1, 2, 3, 4 o 5 μ M. Por ejemplo 30 a 70 nM como se determina por resonancia de plasmones superficiales. En una realización, el primer dAb (o un monómero de dAb) se une a la SA (por ejemplo, HSA) con una K_D como se determina por resonancia de plasmones superficiales de aproximadamente 1, 50, 70, 100, 150, 200, 300 nM o 1, 2 o 3 μ M. En una realización, para un ligando específico dual que comprende un primer dAb anti-SA y un segundo dAb para TNFR1, la afinidad (por ejemplo, la K_D y/o K_{off} como se mide por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo utilizando BiaCore) del segundo dAb para esta diana es desde 1 a 100000 veces (por ejemplo, de 100 a 100000, o 1000 a 100000, o 10000 a 100000 veces) la afinidad del primer dAb por la SA. En una realización, la albúmina sérica es albúmina sérica humana (HSA). 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. En una realización, la albúmina sérica es albúmina sérica humana (HSA). En una realización, el primer dAb se une a la SA (por ejemplo, HSA) con una K_D de aproximadamente 50, por ejemplo 70, 100, 150 o 200 nM. Los detalles de los ligandos específicos duales se encuentran en los documentos WO03002609, WO04003019 y WO04058821.

Los ligandos de la invención pueden comprender en una realización un dAb que se une a la albúmina sérica (SA) con una K_D como se determina por resonancia de plasmones superficiales de 1 nM a 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 200, 300, 400 o 500 μ M (es decir, $\times 10^{-9}$ a 5×10^{-4}), o 100 nM a 10 μ M, o 1 a 5 μ M o 3 a 70 nM o 10 nM a 1, 2, 3, 4 o 5 μ M. Por ejemplo 30 a 70 nM como se determina por resonancia de plasmones superficiales. En una realización, el primer dAb (o un monómero de dAb) se une a la SA (por ejemplo, la HSA) con una K_D como se determina por resonancia de plasmones superficiales de aproximadamente 1, 50, 70, 100, 150, 200, 300 nM o 1, 2 o 3 μ M. En una realización, el primer y segundo dAb están unidos por un engarce, por ejemplo un engarce de 1 a 4 aminoácidos o de 1 a 3 aminoácidos, o mayor de 3 aminoácidos o mayor de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 aminoácidos. En una realización, se utiliza un engarce más largo (más de 3 aminoácidos) para aumentar la potencia (K_D de uno o ambos dAb en el antagonista).

En realizaciones particulares de los ligandos y antagonistas, el dAb se une a la albúmina sérica y compite por la unión a la albúmina con un dAb que se selecciona de entre el grupo que consiste en MSA-16, MSA-26 (Véase el documento WO04003019 para desvelar estas secuencias), DOM7m-16 (SEC ID N° 473), DOM7m-12 (SEC ID N° 474), DOM7m-26 (SEC ID N° 475), DOM7r-1 (SEC ID N° 476), DOM7r-3 (SEC ID N° 477), DOM7r-4 (SEC ID N° 478), DOM7r-5 (SEC ID N° 479), DOM7r-7 (SEC ID N° 480), DOM7r-8 (SEC ID N° 481), DOM7h-2 (SEC ID N° 482), DOM7h-3 (SEC ID N° 483), DOM7h-4 (SEC ID N° 484), DOM7h-6 (SEC ID N° 485), DOM7h-1 (SEC ID N° 486), DOM7h-7 (SEC ID N° 487), DOM7h-22 (SEC ID N° 489), DOM7h-23 (SEC ID N° 490), DOM7h-24 (SEC ID N° 491), DOM7h-25 (SEC ID N° 492), DOM7h-26 (SEC ID N° 493), DOM7h-21 (SEC ID N° 494), DOM7h-27 (SEC ID N° 495), DOM7h-8 (SEC ID N° 496), DOM7r-13 (SEC ID N° 497), DOM7r-14 (SEC ID N° 498), DOM7r-15 (SEC ID N° 499), DOM7t-16 (SEC ID N° 500), DOM7r-17 (SEC ID N° 501), DOM7r-18 (SEC ID N° 502), DOM7r-19 (SEC ID N° 503), DOM7r-20 (SEC ID N° 504), DOM7r-21 (SEC ID N° 505), DOM7r-22 (SEC ID N° 506), DOM7r-23 (SEC ID N° 507), DOM7r-24 (SEC ID N° 508), DOM7r-25 (SEC ID N° 509), DOM7r-26 (SEC ID N° 510), DOM7r-27 (SEC ID N° 511), DOM7r-28 (SEC ID N° 512), DOM7r-29 (SEC ID N° 513), DOM7r-30 (SEC ID N° 514), DOM7r-31 (SEC ID N° 515), DOM7r-32 (SEC ID N° 516), DOM7r-33 (SEC ID N° 517) (Véase el documento WO2007080392 para desvelar estas secuencias; los números de SEC ID de este párrafo son los que aparecen en el documento WO2007080392),

dAb8, dAb 10, dAb36, dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, dAb7h24, dAb7h25, dAb7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb11, dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1, dAb7r3, dAb7r4, dAb7r5, dAb7r7, dAb7r8, dAb7r13, dAb7r14, dAb7r15, dAb7r16, dAb7r17, dAb7r18, dAb7r19, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13, dAb7h14, dAb7p1, y dAb7p2 (véase el documento PCT/GB2008/000453 presentado el 8 de febrero de 2008 para desvelar estas secuencias). Estas secuencias también se presentan en la figura 51.

En ciertas realizaciones, el dAb se une a la albúmina sérica humana y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 80%, o al menos aproximadamente un 85%, o al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 96%, o al menos aproximadamente un 97%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% con la secuencia de aminoácidos de un dAb que se selecciona de entre el grupo que consiste en

MSA-16, MSA-26, DOM7m-16 (SEC ID N° 473), DOM7m-12 (SEC ID N° 474), DOM7m-26 (SEC ID N° 475), DOM7r-1 (SEC ID N° 476), DOM7r-3 (SEC ID N° 477), DOM7r-4 (SEC ID N° 478), DOM7r-5 (SEC ID N° 479), DOM7r-7 (SEC ID N° 480),

DOM7r-8 (SEC ID N° 481), DOM7h-2 (SEC ID N° 482), DOM7h-3 (SEC ID N° 483), DOM7h-4 (SEC ID N° 484), DOM7h-6 (SEC ID N° 485), DOM7h-1 (SEC ID N° 486), DOM7h-7 (SEC ID N° 487), DOM7h-22 (SEC ID N° 489), DOM7h-23 (SEC ID N° 490), DOM7h-24 (SEC ID N° 491), DOM7h-25 (SEC ID N° 492), DOM7h-26 (SEC ID N° 493), DOM7h-21 (SEC ID N° 494), DOM7h-27 (SEC ID N° 495), DOM7h-8 (SEC ID N° 496), DOM7r-13 (SEC ID N° 497), DOM7r-14 (SEC ID N° 498), DOM7r-15 (SEC ID N° 499), DOM7r-16 (SEC ID N° 500), DOM7r-17 (SEC ID N° 501), DOM7r-18 (SEC ID N° 502), DOM7r-19 (SEC ID N° 503), DOM7r-20 (SEC ID N° 504), DOM7r-21 (SEC ID N° 505), DOM7r-22 (SEC ID N° 506), DOM7r-23 (SEC ID N° 507), DOM7r-24 (SEC ID N° 508), DOM7r-25 (SEC ID N° 509), DOM7r-26 (SEC ID N° 510), DOM7r-27 (SEC ID N° 511), DOM7r-28 (SEC ID N° 512), DOM7r-29 (SEC ID N° 513), DOM7r-30 (SEC ID N° 514), DOM7r-31 (SEC ID N° 515), DOM7r-32 (SEC ID N° 516), DOM7r-33 (SEC ID N° 517) (los números de SEC ID de este párrafo son los que aparecen en el documento WO2007080392), dAb8, dAb 10, dAb36, dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, dAb7h24, dAb7h25, dAb7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb11, dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1, dAb7r3, dAb7r4, dAb7r5, dAb7r7, dAb7r8, dAb7r13, dAb7r14, dAb7r15, dAb7r16, dAb7r17, dAb7r18, dAb7r19, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13, dAb7h14, dAb7p1, y dAb7p2.

Por ejemplo, el dAb que se une a la albúmina sérica humana puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 96%, o al menos aproximadamente un 97%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% con DOM7h-2 (SEC ID N° 482), DOM7h-3 (SEC ID N° 483), DOM7h-4 (SEC ID N° 484), DOM7h-6 (SEC ID N° 485), DOM7h-1 (SEC ID N° 486), DOM7h-7 (SEC ID N° 487), DOM7h-8 (SEC ID N° 496), DOM7r-13 (SEC ID N° 497), DOM7r-14 (SEC ID N° 498), DOM7h-22 (SEC ID N° 489), DOM7h-23 (SEC ID N° 490), DOM7h-24 (SEC ID N° 491), DOM7h-25 (SEC ID N° 492), DOM7h-26 (SEC ID N° 493), DOM7h-21 (SEC ID N° 494), DOM7h-27 (SEC ID N° 495) (los números de SEC ID de este párrafo son los que aparecen en el documento WO2007080392), dAb8, dAb 10, dAb36, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, dAb7h24, dAb7h25, dAb7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb11, dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 y dAb7h14.

En ciertas realizaciones, el dAb se une a la albúmina sérica humana y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 80%, o al menos aproximadamente un 85%, o al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 96%, o al menos aproximadamente un 97%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% con la secuencia de aminoácidos de un dAb que se selecciona de entre el grupo que consiste en DOM7h-2 (SEC ID N° 482), DOM7h-6 (SEC ID N° 485), DOM7h-1 (SEC ID N° 486), DOM7h-7 (SEC ID N° 487), DOM7h-8 (SEC ID N° 496), DOM7h-22 (SEC ID N° 489), DOM7h-23 (SEC ID N° 490), DOM7h-24 (SEC ID N° 491), DOM7h-25 (SEC ID N° 492), DOM7h-26 (SEC ID N° 493), DOM7h-21 (SEC ID N° 494), DOM7h-27 (SEC ID N° 495) (los números de SEC ID de este párrafo son los que aparecen en el documento WO2007080392), dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, dAb7h24, dAb7h25, dAb7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb38, dAb41, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 y dAb7h14.

En realizaciones más particulares, el dAb es un dAb V_K que se une a la albúmina sérica humana y tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en DOM7h-2 (SEC ID N° 482), DOM7h-6 (SEC ID N° 485), DOM7h-1 (SEC ID N° 486), DOM7h-7 (SEC ID N° 487), DOM7h-8 (SEC ID N° 496) (los números de SEC ID de este párrafo son los que aparecen en el documento WO2007080392), dAb2, dAb4, dAb7, dAb38, dAb41, dAb54, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 y dAb7h14.

En realizaciones más particulares, el dAb es una dAb V_H que se une a la albúmina sérica humana y tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre dAb7h30 y dAb7h31.

En realizaciones más particulares, el dAb es dAb7h11 o dAb7h14.

En otras realizaciones, el dAb, ligando o antagonista se une a la albúmina sérica humana y comprende una, dos o tres CDR de cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriores, por ejemplo, una, dos o tres de las CDR de dAb7h11 o dAb7h14.

La V_{HH} de camélido que se une a la albúmina sérica incluye los que se desvelan en el documento WO 2004/041862 (Ablynx N.V.) y en el documento WO2007080392, tal como la Secuencia A (SEC ID N° 518), Secuencia B (SEC ID N° 519), Secuencia C (SEC ID N° 520), Secuencia D (SEC ID N° 521), Secuencia E (SEC ID N° 522), Secuencia F (SEC ID N° 523), Secuencia G (SEC ID N° 524), Secuencia H (SEC ID N° 525), Secuencia I (SEC ID N° 526),

Secuencia J (SEC ID N° 527), Secuencia K (SEC ID N° 528), Secuencia L (SEC ID N° 529), Secuencia M (SEC ID N° 530), Secuencia N (SEC ID N° 531), Secuencia O (SEC ID N° 532), Secuencia P (SEC ID N° 533), Secuencia Q (SEC ID N° 534), estos números de secuencia corresponden a las que se citan en el documento WO2007080392 o o el documento WO 2004/041862 (Ablynx N.V.). En ciertas realizaciones, la V_{HH} de camélido se une a la albúmina sérica humana y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 80%, o al menos aproximadamente un 85%, o al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 96%, o al menos aproximadamente un 97%, o al menos aproximadamente un 98%, o al menos aproximadamente un 99% con el ALB 1 desvelados en el documento WO2007080392 o cualquiera de las SEC ID N°^{os} 518-534, estos números de secuencia corresponden a los citados en el documento WO2007080392 o el documento WO 2004/041862.

En algunas realizaciones, el ligando o antagonista comprende un dAb anti-seroalbúmina que compite con cualquiera de los dAb anti-seroalbúmina que se desvelan en el presente documento por su unión a la albúmina sérica (por ejemplo, albúmina sérica humana).

En una realización alternativa, el antagonista o ligando comprende un resto de unión específico para el TNFR1 (por ejemplo, un TNFR1 humano), en que el resto comprende secuencias no de inmunoglobulinas como se describe en la solicitud co-pendiente PCT/GB2008/000453 presentada el 8 de febrero de 2008, la divulgación de estos restos de unión, sus procedimientos de producción y selección (por ejemplo, a partir de distintas bibliotecas).

Conjugación a un resto de extensión de la semivida (por ejemplo, albúmina)

En una realización, un (uno o más) restos de extensión de la semivida (por ejemplo, albúmina, transferrina y fragmentos análogos de los mismos) se conjuga o asocia con el polipéptido de unión al TNFR1, dAb o antagonista de la invención. Ejemplos de albúmina, fragmentos de albúmina o variantes de albúmina para su uso en un formato de unión al TNFR1 se describen en el documento WO 2005077042. En particular, se pueden utilizar los siguientes albúmina, fragmentos de albúmina o variantes de albúmina en la presente invención:

- SEC ID N° 1 (como se desvela en el documento WO 2005077042);
- Fragmento o variante de albúmina que comprende o consiste en los aminoácidos 1-387 de la SEC ID N° 1 del documento WO 2005077042;
- Albúmina, o fragmento o variante de la misma, que comprende la secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en: (a) los aminoácidos 54 a 61 de la SEC ID N° 1 del documento WO 2005077042; (b) los aminoácidos 76 a 89 de la SEC ID N° 1 del documento WO 2005077042; (c) los aminoácidos 92 a 100 de la SEC ID N° 1 del documento WO 2005077042; (d) los aminoácidos 170 a 176 de la SEC ID N° 1 del documento WO 2005077042; (e) los aminoácidos 247 a 252 de la SEC ID N° 1 del documento WO 2005077042; (f) los aminoácidos 266 a 277 de la SEC ID N° 1 del documento WO 2005077042; (g) los aminoácidos 280 a 288 de la SEC ID N° 1 del documento WO 2005077042; (h) los aminoácidos 362 a 368 de la SEC ID N° 1 del documento WO 2005077042; (i) los aminoácidos 439 a 447 de la SEC ID N° 1 del documento WO 2005077042; (j) los aminoácidos 462 a 475 de la SEC ID N° 1 del documento WO 2005077042; (k) los aminoácidos 478 a 486 de la SEC ID N° 1 del documento WO 2005077042; y (l) los aminoácidos 560 a 566 de la SEC ID N° 1 del documento WO 2005077042.

Más ejemplos de albúmina, fragmentos y análogos adecuados para su uso en un formato de unión al TNFR1 se describen en el documento WO 03076567. En particular, se pueden utilizar los siguientes albúmina, fragmentos o variantes en la presente invención:

- Albúmina sérica humana como se describe en el documento WO 03076567, por ejemplo, en la figura 3;
- Albúmina sérica humana (HA) que consiste en una cadena sencilla no glucosilada de polipéptido de 585 aminoácidos con una fórmula de peso molecular de 66.500. Véase, Meloun, y col., FEBS Letters 58:136 (1975); Behrens, y col., Fed. Proc. 34:591 (1975); Lawn, y col., Nucleic Acids Research 9:6102-6114 (1981); Minghetti, y col., J. Riol. Chem. 261:6747 (1986));
- Una variante polimórfica o análogo o fragmento de albúmina como se describe en Weitkamp, y col., 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), donde X es cualquier número entre 178 y 199.

Cuando un (uno o más) restos de extensión de la semivida (por ejemplo, albúmina, transferrina y fragmentos y análogos de los mismos) se utilizan para formatear los polipéptidos, dAb y antagonistas de unión al TNFR1 de la invención, se puede conjugar utilizando cualquier procedimiento adecuado, tal como , por fusión directa con el resto

de unión al TNFR1 (por ejemplo, el dAb anti-TNFR1), por ejemplo, utilizando una construcción única de nucleótidos que codifica una proteína de fusión, en que la proteína de fusión se codifica como una cadena sencilla de polipéptido con un resto de extensión de la semivida localizado hacia el extremo N o C del resto de unión al TNFR1. De manera alternativa, la conjugación se puede conseguir utilizando un engarce peptídico entre los restos, por ejemplo un engarce peptídico como se describe en el documento WO 03076567 o el documento WO 2004003019 (estas divulgaciones del engarce pueden proporcionar ejemplos para su uso en la presente invención). Típicamente, un polipéptido que aumenta su semivida en el suero *in vivo* es un polipéptido que se produce naturalmente *in vivo* y que resiste la degradación o retirada por los mecanismos endógenos que eliminan material no deseado del organismo (por ejemplo, humano). Por ejemplo, un polipéptido que aumenta su semivida en el suero *in vivo* se puede seleccionar de entre proteínas de la matriz extracelular, proteínas que se encuentran en la sangre, proteínas que se encuentran en la barrera hematoencefálica o tejido neuronal, proteínas que se localizan en el riñón, hígado, pulmón, corazón, piel o hueso, proteínas de presión, proteínas específicas de enfermedades, o proteínas implicadas en el transporte de Fc.

En realizaciones descritas a lo largo de la presente divulgación, en vez de utilizar un "dAb" anti-TNFR1 en un antagonista o ligando de la invención, se contemplan que el experto a que se dirige puede utilizar un polipéptido o dominio que comprende una o más de las 3 CDR de un dAb de la invención que se unen al TNFR1 (por ejemplo, las CDR injertadas en un armazón o esqueleto de proteína adecuado, por ejemplo, un anticuerpo, un armazón SpA, un dominio del receptor LDL clase A o un dominio EGF). La divulgación como un todo se construye en consecuencia para proporcionar la divulgación de antagonistas que utilizan tales dominios en lugar del dAb. A este respecto, véase el documento PCT/GB2008/000453 presentado el 8 de febrero de 2008.

En una realización, por lo tanto, un antagonista de la invención comprende un dominio variable único de inmunoglobulina o un dominio de anticuerpo (dAb) que tiene una especificidad de unión por el TNFR1 o las regiones determinantes de complementariedad de tal dAb en un formato adecuado. El antagonista puede ser un polipéptido que consiste en tal dAb, o consiste esencialmente en tal dAb. El antagonista puede ser un polipéptido que comprende un dAb (o las CDR de un dAb) en un formato adecuado, tal como un formato de anticuerpo (por ejemplo, un formato tipo IgG, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂), o un ligando específico dual que comprende un dAb que se une al TNFR1 y un segundo dAb que se une a otra proteína antígeno o epítipo diana (por ejemplo, albúmina sérica).

Los polipéptidos, dAb y antagonistas de acuerdo con la invención se puede formatear como una variedad de formatos de anticuerpo adecuados que se conocen en la técnica, tales como, formatos 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 cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpo, fragmentos de unión al antígeno de uno cualquiera de los anteriores (por ejemplo, un fragmento Fv (por ejemplo un Fv de cadena sencilla (scFv), un Fv unido por enlaces disulfuro), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂), un dominio variable único (por ejemplo, V_H, V_L), un dAb, y versiones modificadas de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, que se modifican por unión covalente a polialquilenglicol (por ejemplo, polietilén glicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol) u otro polímero adecuado).

En algunas realizaciones, la invención proporciona un ligando (por ejemplo, un antagonista anti-TNFR1) que tiene un formato tipo IgG. Tales formatos tienen la estructura convencional de cuatro cadenas de una molécula de IgG (dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras), en la que se han remplazado una o más de las regiones variables (V_H y/o V_L) por un dAb de la invención. En una realización, cada una de las regiones variables (2 regiones V_H y 2 regiones V_L) se remplazan por un dAb o dominio variable único, al menos uno de los cuales en un dAb anti-TNFR1 de acuerdo con la invención. Los dAb o los dominios variables únicos que se incluyen en un formato tipo IgG pueden tener la misma especificidad. En algunas realizaciones, el formato tipo IgG es tetravalente y puede tener una (solo anti-TNFR1), dos (por ejemplo, anti-TNFR1 y anti-SA), tres o cuatro especificidades. Por ejemplo, el formato tipo IgG puede ser monoespecífico y contener 4 dAb que tienen la misma especificidad; biespecífico y comprender 3 dAb que tienen la misma especificidad y otro dAb que tiene una especificidad diferente; biespecífico y comprender dos dAb que tienen la misma especificidad y dos dAb 1u3 tienen 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 tercer dAb; o tetraespecífico y comprender cuatro dAb que cada uno tiene una especificidad diferente. Se pueden preparar fragmentos de unión al antígeno de los formatos tipo IgG (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scFv). En una realización, los formatos tipo IgG o fragmentos de unión de los mismos no se unen de manera cruzada con TNFR1, por ejemplo, el formato puede ser monovalente para TNFR1. Si se desea función de citotoxicidad por activación del complemento o celular dependiente de anticuerpo (ADCC), el ligando puede ser un formato tipo IgG1. Si se desea, el formato tipo IgG puede comprender una región constante mutada (variante de la región constante de cadena pesada de IgG) para minimizar la unión a los receptores Fc y/o la capacidad de fijar el complemento. (Véase, por ejemplo, Winter y col., GB 2.209.757 B; Morrison y col., documento WO 89/07142; Morgan y col., WO 94/29351, 22 de diciembre de 1994).

Los ligandos de la invención (polipéptidos, dAb y antagonistas) se pueden formatear como una proteína de fusión que contiene un primer dominio variable único de inmunoglobulina que se fusiona directamente a un segundo dominio variable único de inmunoglobulina. Si se desea, tal formato puede comprender además un resto de extensión de la semivida. Por ejemplo, el ligando puede comprender un primer dominio variable único de inmunoglobulina que se fusiona directamente a un segundo dominio variable único de inmunoglobulina que se

fusiona directamente a un dominio variable único de inmunoglobulina que se une a albúmina sérica.

En general la orientación de los dominios del polipéptido que tienen un sitio de unión que se une específicamente a una diana, y si el ligando comprende un engarce, es un tema de elección de diseño. Sin embargo, algunas orientaciones, con o sin engarces, pueden proporcionar mejores características de unión que otras orientaciones.

- 5 Todas las orientaciones (por ejemplo, dAb-engarce-dAb2; dAb2-engarce-dAb1) que están englobadas en la invención son ligandos que contienen una orientación que proporciona las características de unión deseada que se puede identificar fácilmente por exploración.

- 10 Los polipéptidos y dAb de acuerdo con la invención, incluyendo monómeros, dímeros y trímeros de dAb que se pueden unir 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 utilizar vectores que codifican ligandos unidos como una secuencia de nucleótido sencilla a una región Fc para preparar tales polipéptidos.

La invención proporciona además dímeros, trímeros y polímeros de los monómeros de dAb mencionados anteriormente.

SECUENCIAS CON CODÓN OPTIMIZADO

- 15 Como se ha descrito anteriormente, las realizaciones de la invención proporcionan secuencias de nucleótidos con codón optimizado que codifican polipéptidos y dominios variables de la invención. Como se muestra en la ilustración posterior, se pueden producir secuencias con codón optimizado con una identidad de aproximadamente el 70% que codifican el mismo dominio variable (en este caso la secuencia de aminoácidos del dominio variable es idéntico a DOM1h-131-206). En este caso, las secuencias se optimizaron por expresión en *Pichia pastoris* (secuencias con
- 20 codón optimizado 1-3) o *E. coli* (secuencias con codón optimizado 4 y 5).

- Los inventores llevaron a cabo el cálculo teniendo en cuenta la degeneración del código genético y se maximizó el número de cambios de nucleótido en cada codón degenerado codificado por la secuencia de nucleótidos de DOM1h-131-206 como se muestra en la figura 19 y una secuencia de nucleótidos teórica que sigue codificando un dominio variable que es idéntica a DOM1h-131-206. El cálculo revelaba que la secuencia teórica tiene solamente
- 25 una identidad del 57% con la secuencia de nucleótidos de DOM1h-131-206 como se muestra en la figura 19.

Secuencia con codón optimizado 1

Secuencia de ADN

```
gaggttcaattggttgaatccggtggtggattggttcaacctggtggttctttgagattgtcctgtgctg
cttccggttttactttcgctcaccgagactatggtttgggttagacaggctccaggtaaaggattggaatg
ggtttccacattccaccagatggtcaagatccattctacgctgactccgtaaggaagattcactatc
tccagagacaactccaagaacactttgtacttgcagatgaactccttgagagctgaggatactgctgtt
accactgtgctttgttgccaaagagaggaccttggtttgattactggggacaggaactttggttactgt
ttcttcc
```

- 30 Secuencia de AA correspondiente

```
evqllesggglvqpggsrlrlscaasgftfahetmvwvrrqapgkglewvshipdpdgpdyadsvkgrfti
srdnsntlylqmnsrlraedtavyhcallpkrgpwfdywgqgtlvtvss
```

- Identidad de secuencia de nucleótidos del 74,1% respecto a la secuencia WT

		1	50
Domlh-131-206 con codón optimizado	(1)	ATG TAT GAA TCG T TGA T TCA TTT TTT	
Domlh-131-206 WT	(1)	ATG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG	
Consenso	(1)	GAGGT CA TGTTGA TC GG GG GG TTGST CA CCTGG GG TC	
		51	100
Domlh-131-206 con codón optimizado	(51)	TTT AAT G TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	
Domlh-131-206 WT	(51)	CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT	
Consenso	(51)	TG G T TCTGTGC GC TCGG TT AC TT GC CA GAGAC A	
		101	150
Domlh-131-206 con codón optimizado	(101)	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	
Domlh-131-206 WT	(101)	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	
Consenso	(101)	TGGT TGGGT G CAGGC CCAGG AA GG T GA TGGGT TC CA	
		151	200
Domlh-131-206 con codón optimizado	(151)	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	
Domlh-131-206 WT	(151)	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	
Consenso	(151)	ATTCC CC GATGGTCA GATCC TTCTACGC GACTCCGT AAGGG G	

(continuación)

		201		250
Domlh-131-206 con codón optimizado (201)		A A T T A T T C A A A A C C A A A A T T T G A C T C T G A T		
Domlh-131-206 WT (201)		G A A C A A C C C A A T T C A A A A A G C A A T C A A T		
Consenso (201)		TTCAC ATCTCC G GACAA TCCAAGAACAC T TA TGCA ATGA		
		251		300
Domlh-131-206 con codón optimizado (251)		A C T C T T A C A T T A A G T A C T T T T T C C A T T T T G A		
Domlh-131-206 WT (251)		A A G C C C C T C A A A C A A G A A T A A T G C C T T T		
Consenso (251)		AC C T G G GC GAGGA AC GC GT TA CACTGTGC TG T CC		
		301		350
Domlh-131-206 con codón optimizado (301)		A A A A C A T T T T T C A A A A C A A T T C T T T T		
Domlh-131-206 WT (301)		A A T G G G G T T T T C C A A A T A A A A C C A A C C C		
Consenso (301)		AAGAG GG CTTGGTITGA TACTGGGG CAGGGAAC TGGT AC GT		
		351	363	
Domlh-131-206 con codón optimizado (351)		T T T T C T A A T G A		
Domlh-131-206 WT (351)		C A G A G -----		
Consenso (351)		T C C		

Secuencia con codón optimizado 2

Secuencia de ADN

gagaaaagagaggttcaattgcttgaatctggaggaggtttgggtccagccaggagggtcccttcgactaa
gttgctgctgccagtggtttacgtttgctcatgaaactatggatgggtccgacaggcacctggtaaaagg
tcttgaatgggtttcacatatccctccagacgggtcaagaccattttacgctgattccgtgaaaggcaga
tttacaatttcacgagataattctaaaaacaccttgtaactacaaatgaactcattgagagctgaggaca
ctgcagttttatcagtcgctttactacccaaacgtggaccttggtttgattattggggccaaggtacgtt
aqtgactgttaqttct

5 Secuencia de AA correspondiente

```
ekrevqllesggglvqpqgslrlscaasgftfahetmvwvraqpgkglewvshipdggdpfyadsvkgr
ftisrndskntlylqmnsdraedtavyhcallpkrgpwwfdywqaggtltvss
```

- Identidad de secuencia de nucleótidos del 71.1% respecto a la secuencia WT

Domlh-131-206 WT	(1)	-----G G G C T T G A G T T G G C T A	1	50
Solo dAb de <i>Pichia</i> MFa 206	(1)	GAGAAAAGA T T A T C T A T C A T T C		
Consenso	(1)	GAGGT CA TG T GA TCTGG GGAGG TTGGT CAGCC		
Domlh-131-206 WT	(42)	T G G G T G T C T C C A T C C C G	51	100
Solo dAb de <i>Pichia</i> MFa 206	(51)	A G A G C C T T A A A G T T C A G T G T G T		
Consenso	(51)	GG GGGTCCCT CG CT TGTC GCC GG TT AC TTTC C		
Domlh-131-206 WT	(92)	A G G A G G C A A G G A A G	101	150
Solo dAb de <i>Pichia</i> MFa 206	(101)	A A T A A A A T T A A T A A		
Consenso	(101)	ATGA AC ATGGT TGGGTCCG CAGGCACC GG AA GGICT GA TGG		
Domlh-131-206 WT	(142)	T C A A T T C G G T T A G T C C A C T	151	200
Solo dAb de <i>Pichia</i> MFa 206	(151)	T C A C A C T A C T A C A C A T A T T		
Consenso	(151)	GT TCACATAT CC CC GA GGTCA GA CC TT TACGC GA TCCGT		
Domlh-131-206 WT	(192)	A G C C G C C C C C C C A T C A G A G C A T C	201	250
Solo dAb de <i>Pichia</i> MFa 206	(201)	C T A C A A T A T A A A T A T A C T G C T		
Consenso	(201)	GAA GGC G TT AC AT TC CG GA AATTC AA AACAC T TA		
Domlh-131-206 WT	(242)	G A A A A G C C C T C C A G A A G A T T G	251	300
Solo dAb de <i>Pichia</i> MFa 206	(251)	A A A A A T C A T A A T A A T A T A A C T		
Consenso	(251)	T CAAATGAAC TG G GC GAGGACAC GC GT TATCACTG GC		
Domlh-131-206 WT	(292)	C G T C T A G A G G T T A C A C T G A A C C	301	350
Solo dAb de <i>Pichia</i> MFa 206	(301)	T A A A A C T A A A A T A T A T A T G T		
Consenso	(301)	T CT CC AA G GG CCTTGGTITGA TA TGGGG CA GG AC T		

(continuación)

		351	367
Domlh-131-206 WT	(342)	G T C C C C C A G C -	
Solo dAb de <i>Pichia</i> MFa 206	(351)	A T G A T T - A T T T	
Consenso	(351)	G T A C G T T G C	

Secuencia con codón optimizado 3

Secuencia de ADN

gaagtgcagcttcttgaagtggaggaggctagtgcagccagggggatctttaagattatcatgcgctg
ccagtggatttacttttgcacgagacgagtggtctgggtgagacaagctcctggaaaagggttagagtg
ggtttctcacattccacctgatgggtcaagatcctttctacgcagattccgtcaaaggaagattactatc
tccagagataatagtaaaaaacactttgtacctacagatgaactcacttagagccgaagataccgctgtgt
accactgcgccttggttgccaaagagaggtccttggttcgattactggggtcaggtactctggttacgt
ctcatct

Secuencia de AA correspondiente

evqllesggglvqpggsrlrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewshippdgqdpfyadsvkgrfti
srdnsntlylqmnsrlraedtavyhcallpkrpwwfdywgqgtlvtvss

• Identidad de secuencia de nucleótidos del 72,6% con la secuencia WT

Domlh-131-206 WT	(1)	1	50
Solo dAb <i>Pichia</i> Pre 206	(1)	G A G T T C A A G T G G T C T G T A A T T A G G	
Consenso	(1)	G A G T C A G C T T G A T G G G A G G T G T C A G C C G G G G T C	
Domlh-131-206 WT	(51)	51	100
Solo dAb <i>Pichia</i> Pre 206	(51)	C C G C T C C C T A T C C A C C C T G T A A A	
Consenso	(51)	T T A A A T A A A C C T A A G T A A T T T C T A C A A A A	
Domlh-131-206 WT	(101)	101	150
Solo dAb <i>Pichia</i> Pre 206	(101)	C A G T C C C A G A A A G A G C A A A C A A T	
Consenso	(101)	G C C G A A A A T T A A A A T G G A A A T T A C	
Domlh-131-206 WT	(151)	151	200
Solo dAb <i>Pichia</i> Pre 206	(151)	T T C G C C C G C C C A A A A A C C C G G C C C	
Consenso	(151)	A A T T C A A A T T T T A A T T C A A A A A	
Domlh-131-206 WT	(201)	201	250
Solo dAb <i>Pichia</i> Pre 206	(201)	G C C C C C C C C T C C A G A A G C A A T G A A	
Consenso	(201)	A T T T A	
Domlh-131-206 WT	(251)	251	300
Solo dAb <i>Pichia</i> Pre 206	(251)	A G C G C T A G A C A A G A A T A T G C C T T	
Consenso	(251)	T C A T A A A A A A A A A A A A A A A A A A	
Domlh-131-206 WT	(301)	301	350
Solo dAb <i>Pichia</i> Pre 206	(301)	A A A G G G G G G T A C A A A A A A A A A A A A	
Consenso	(301)	A A G A G G C C T T G G T T G A T A C T G G G T C A G G A C C T G T A C G T	
Domlh-131-206 WT	(351)	351	
Solo dAb <i>Pichia</i> Pre 206	(351)	G G -	
Consenso	(351)	C T C A C	

Secuencia con codón optimizado 4

Secuencia de ADN

gaagtacaactgctggagagcgggtggcggcctggttcaaccgggtggttcctgcgctgtcctgtgcgg
catctggtttcaccttcgcacacgaaaccatggtgtgggttcgccaaagctccgggcaaaggcctggaatg
ggt aagccacattcctccagatggccaggaccattctatgcggattccggttaagggtcgcttaccatt
tctcgtgataactccaaaaacacctgtacctgcagatgaactcctgcgcgccgaggatactgcgggtgt
accattgtgcgctgctgcctaaacgtggcccggtggttcgattactggggtcagggtaactctggtcacctg
aagcagc

Secuencia de AA correspondiente

```
evqlllesggglvqpggslrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewshippdgqdpfyadsvkgrfti  
srdnsntlylqmnsiraedtavyhcallpkrgpwwfdywggqgtltvtvss
```

- Identidad de secuencia de nucleótidos del 76.5% respecto a la secuencia WT

			1	50
Domlh-131-206 WT	(1)		GGG GAG GTT TAA TCT TGG AAT TAA AGT TGG G	
Solo dAb de <i>E. coli</i> Sec 206	(1)		GAATAAACA GCAAT AGC TCG C CTTTAA GTT TT	
Consenso	(1)		GA GT CA CTG TGGAG GG GG GGC TGGT CA CC GG GG TC	
			51	100
Domlh-131-206 WT	(51)		CTCTT CCA TGA C CCAAT TGG TGA GA	
Solo dAb de <i>E. coli</i> Sec 206	(51)		CTCTC GGT TGG AAT TTT TTT CAA CCAAC	
Consenso	(51)		CCTGCG CT TCGTGC GC TC GG TTCACCTT GC CA GA AC A	
			101	150
Domlh-131-206 WT	(101)		CTCTT CCA TGA CCA GAG TTAAG GCTCTCA AT	
Solo dAb de <i>E. coli</i> Sec 206	(101)		CTCTT CCA TGA TGG CCA CCG TAA TAAAGC C	
Consenso	(101)		TGGTGTGGGT CCGCA GC CC GG AA GG CT GA TGGT CA	
			151	200
Domlh-131-206 WT	(151)		ATCTC GGT TTA TCTCTT CCA A CCACTGAG CCA	
Solo dAb de <i>E. coli</i> Sec 206	(151)		ATCTC CCA TGA CCA CCA TCTTGGT TCTCTA CTTT	
Consenso	(151)		ATTC CC GATGG CAGGA CC TTCTA GC GA TCGT AAGG CG	
			201	250
Domlh-131-206 WT	(201)		GCA TCC CCA CCACT TTAGAGAG TAA TTAATTA	
Solo dAb de <i>E. coli</i> Sec 206	(201)		CTCTT TCTT TTTTAC TAA TCA CCG ACCTAGAT	
Consenso	(201)		TT ACCAT TC CG GA AA TCCAA AACAC CT TA CTGCA ATGA	
			251	300
Domlh-131-206 WT	(251)		ATAGT TCTT CCA CCA CCAAT CCA CCACT	
Solo dAb de <i>E. coli</i> Sec 206	(251)		ATCTT TCA CCA CCA TTT TGG CCA TTT CCA CCA	
Consenso	(251)		AC CCTGCG GCCGAGGA AC GCGGT TA CA TGTCGCTGCT CCT	
			301	350
Domlh-131-206 WT	(301)		TAGA GGTGCTTCTTACCTTCTTAACTTCTTCTT	
Solo dAb de <i>E. coli</i> Sec 206	(301)		TACTTCTCCTGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT	
Consenso	(301)		AA G GG CC TGGTT GA TACTGGGGTCAGG AC CTGTACCGGT	
			351	
Domlh-131-206 WT	(351)		CTCG	
Solo dAb de <i>E. coli</i> Sec 206	(351)		AAGC	
Consenso	(351)		AGC	

5

Secuencia con codón optimizado 5

Secuencia de ADN

gaggttcaactgctggaatctggtggtggtctggtacaaccgggtggttccctgcgctctgagctgtgcag
cctctggtttcaccttcgctcatgagaccatggtttgggtacgccagggtccgggtaaaggcctggagt
ggttaagccatatccctcctgatggtcaggaccggttctatgctgattccgtcaaaggcgttttaccatt
tctcgtgacaacagcaaaaaacactctgtacctgcaaataaactccctgcgctgcagaagacacggcgggtt
atcactgtgcactgctgccaaaacgcggcccttgggtcgactactggggccagggtactctggtcactgt
atctct

Secuencia de AA correspondiente

evqllesggglvqpggslrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewshippdgqdpfyadsvkgrfti
srdnskntlylqmnsiraedtavyhcallpkrgpwfdywgqgtltvtss

10

- Identidad de secuencia de nucleótidos del 78,4% con respecto a la secuencia WT

		1	50
Domlh-131-206 WT	(1)	AGG G G G T G G G G G A A C T A G T G G G	
Solo dAb de <i>E. coli</i> IC 206	(1)	AGG T T A A C C T A A T T T T T C T C A T T A A G T T C T T	
Consenso	(1)	GAGGT CA CTG TGGG TCIGG GG GG TGGTACA CC GG GG TC	
		51	100
Domlh-131-206 WT	(51)	CTC T T A A C T T C A A C C C T A G G A G G G A	
Solo dAb de <i>E. coli</i> IC 206	(51)	GAG G G G G G G G G T T T T T C C T T T T T C	
Consenso	(51)	CTGCGTCT CTGTGCAGCCTC GG TTCACCTT GC CATGAGAC A	
		101	150
Domlh-131-206 WT	(101)	T A G G G T C C G G G G A A A A G G T A G G T T A A C C T C A C A	
Solo dAb de <i>E. coli</i> IC 206	(101)	T T T A A A A A A A T G T G T A A A C G G A A A A A G C C	
Consenso	(101)	TGGT TGGGT CGCCAGGC CC GG AA GG CT GAGTGGGT CAT	
		151	200
Domlh-131-206 WT	(151)	T T C C G G G G T A A T C T C C C A A C C C G G G G G	
Solo dAb de <i>E. coli</i> IC 206	(151)	A C C T T T C C G G G G G G G G G T T T T T T T T T T T T T	
Consenso	(151)	AT CC CC GATGGTCAGGA CC TICTA GC GA TCGT AA GGCCG	
		201	250
Domlh-131-206 WT	(201)	G C	
Solo dAb de <i>E. coli</i> IC 206	(201)	T T	
Consenso	(201)	TT ACCAT TC CG GACAA CAA AACAC CT TA CTGCATATGA	
		251	300
Domlh-131-206 WT	(251)	A A G	
Solo dAb de <i>E. coli</i> IC 206	(251)	T T C	
Consenso	(251)	AC CCTGCGTG GA GACAC GCGGT TATCACTGTGC CTGCT CC	
		301	350
Domlh-131-206 WT	(301)	G A G	
Solo dAb de <i>E. coli</i> IC 206	(301)	A A C	
Consenso	(301)	AA G GG CCTTGGTT GACTACTGGGG CAGGG AC CTGGTCAC GT	
		351	
Domlh-131-206 WT	(351)	C G A G C	
Solo dAb de <i>E. coli</i> IC 206	(351)	A T T C T	
Consenso	(351)	TC	

Ejemplificación

Ejemplo A: Selección de candidatos y Caracterización de dominios de anticuerpo contra el TNFR1 humano

- 5 Los dominios de anticuerpo que se generaron se derivaron de bibliotecas de fagos. Tanto las selecciones solubles y ensayos de selección del TNFR1 humano que se absorbe pasivamente se llevaron a cabo de acuerdo con procedimientos de referencia relevantes. El TNFR1 humano se adquirió como una proteína recombinante soluble o bien en R&D Systems (Cat N° 636-R1-025/CF) o en Peprotech (Cat n° 310-07) y, o se utilizó directamente (en el caso de selecciones pasivas) o tras la biotinilación utilizando el acoplamiento por medio aminas primarias seguido por un control de calidad de su actividad en un ensayo biológico y un análisis de su PM y extensión de biotinilación por espectrometría de masas. Típicamente se llevaron a cabo 3 rondas de selección utilizando niveles decrecientes de antígeno en cada nueva ronda.

- 15 Los resultados de las selecciones se exploraron por ELISA de fago en cuanto a la presencia de clones de unión anti-TNFR1. Se aisló el ADN a partir de estas selecciones de fagos y se subclonaron en un vector de expresión para la expresión de fragmentos de dAb solubles. Los fragmentos de dAb solubles se expresaron en placas de 96 pocillos y los sobrenadantes se utilizaron para explorar la presencia de dAb de unión anti-TNFR1, o bien se utilizó un ELISA de unión directo con detección anti-c-myc o BIAcore™ utilizando un chip BIAcore™ TNFR1 biotinilado/estreptavidina y se ordenaron de acuerdo con las tasas de disociación.

- 20 Las moléculas candidatas, que se describen posteriormente, se derivaron del dAb parental, que se designó DOM1h-131 (desvelado en el documento WO2006038027). Esta molécula se seleccionó de la biblioteca de presentación en fagos tras 3 rondas de selección utilizando 60 nM de antígeno biotinilado. Se alternaban perlas Dyna revestidas de estreptavidina o neutravidina como reactivos de captura en cada ronda de selección para evitar la selección de agentes de unión para la estreptavidina o neutravidina. La potencia del candidato DOM1h-131 en este estadio estaba en el intervalo micromolar inferior como se determinaba por el ensayo celular de liberación de fibroblastos MRC-5/IL-8. La cinética de unión que se determinaba por BIAcore™ típicamente presentaba velocidades de asociación/disociación rápidas. Los niveles de expresión en *E. coli* de esta molécula candidata DOM1h-131, como

monómero marcado con myc en el extremo C estaba en la región de los 8 mg/l.

Maduración de afinidad de los candidatos:

El DOM1h-131 se llevó a maduración de afinidad para generar mutantes con potencia más alta y características biofísicas mejoradas (véase la Figura 3 para las secuencias de aminoácidos de los candidatos derivados de DOM1h-131). Tras la generación de una biblioteca propensa a errores (número medio de cambios de 1 aminoácido por secuencia de dAb, tamaño de biblioteca 8×10^7) utilizando una polimerasa PCR propensa a errores (Genemorph II, Stratagene), se llevaron a cabo siete rondas de selección utilizando estas bibliotecas propensas a errores. Esta estrategia daba lugar al aislamiento del clon DOM1h-131-8, una molécula en la que cambios en 4 aminoácidos (uno en el armazón 1 (FR1), uno en la CDR1, uno en la CDR3 y uno en FR4) daba una mejora de la potencia de 100 veces según se mide con un ensayo celular con MRC-5 (~ 4 nM). En este ensayo, las células MRC-5 se incubaron con las muestras de ensayo durante una hora y luego se añadió el TNF- α (200 pg/ml). Después de una noche de incubación se determinó la liberación de IL-8 utilizando un ensayo de detección celular ABI 8200 IL-8 (FMAT). Se incluyó una curva de dosis de TNF- α en cada experimento. La concentración de TNF- α que se utilizó para competir con la unión del dAb al TNFR1, (200 pg/ml) era aproximadamente del 70% de respuesta de TNF- α máxima en este ensayo.

Con el fin de mejorar más la potencia, se diversificaron las posiciones de aminoácidos únicos por mutagénesis dirigida por oligos en las posiciones clave sugeridas por la información del consenso propenso a errores del candidato. Durante este proceso se aisló una versión mejorada del clon DOM1h-131-8, el DOM1h-131-24 (llamado originalmente DOM1h-131-8-2 antes de la corrección) por medio de exploración por BIAcore™ que tenía una mutación de aminoácido única K94R (numeración de aminoácidos de acuerdo con Kabat) y una potencia RBA de 200-300 pM.

Se generaron más bibliotecas propensas a error basándose en este candidato y la biblioteca NNS de la que se derivaba y se sometieron a tres rondas de selecciones por fago utilizando el tratamiento por calor (para el procedimiento, véase Jespers L, y col., Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation. Nat Biotechnol. 2004 Sep;22(9):1161-5). Durante esta selección, las bibliotecas se agruparon y los clones derivados de la ronda dos de la selección produjeron dAb tales como el DOM1h-131-53 que se consideró que era el más estable al calor. Se hizo la hipótesis de que estos clones poseían mejores características biofísicas. Se llevaron a la línea germinal algunas mutaciones del armazón en el clon DOM1h-131-53 para generar el clon DOM1h-131-83. Este clon formaba la base para posterior diversificación por medio de mutagénesis de CDR individual dirigida por oligos o bien utilizando una estrategia de selección por presentación en fagos como se ha descrito anteriormente o utilizando la tecnología de compartimentación *in vitro* utilizando emulsiones. La estrategia de presentación en fagos da lugar al DOM1h-131-117 y DOM 1 h-131-151. La tecnología de compartimentación *in vitro* generó el DOM1h-131-511.

En este estadio se compararon estos tres candidatos en ensayos biofísicos y biológicos y el DOM1h-131-511 era la molécula con las mejores propiedades. Además, estas moléculas se ensayaron en cuanto a su resistencia a la escisión proteolítica en presencia de tripsina o leucosima. La leucosima consiste en un grupo de esputos de pacientes con fibrosis quística y contiene altos niveles de elastasa y otras proteasas y se utilizó como un sustituto de las condiciones *in vivo* en enfermedades pulmonares. Estos datos indicaban que los tres candidatos DOM1h-131-117, DOM1h-131-151 y DOM1h-131-511 se degradaron rápidamente en presencia de tripsina o leucosima. Este hallazgo creaba preocupaciones acerca de la persistencia *in vivo* del DOM1h-131-511 cuando se desarrolló en el paciente una estrategia para seleccionar una resistencia mejorada a la tripsina. Se hizo la hipótesis de que tal resistencia mejorada a la tripsina podría tener un efecto beneficioso sobre otras propiedades biofísicas de la molécula. Esencialmente, el procedimiento de selección por fagos de referencia se modificó para permitir la selección en presencia de proteasas antes de la selección sobre antígeno. En este extremo, se creó un nuevo vector fago en el que se eliminó el marcador c-myc para permitir las selecciones en presencia de tripsina sin escindir el dAb presentado del fago. Se generaron bibliotecas propensas a error basadas en DOM1h-131-511 y se clonaron en el vector pDOM33 (véase la Fig. 50 para el mapa del vector pDOM33). Las reservas de fagos generadas de esta biblioteca se pre-trataron con 0.1 mg/ml o 100 μ g/ml de tripsina a 37 °C durante 24 horas, posteriormente se añadió un inhibidor de proteasa que era el inhibidor de proteasa completo de Roche (2x) para bloquear la actividad de la tripsina antes de la selección sobre el antígeno relevante. Se llevaron a cabo cuatro rondas de selección. Se evaluó el TNFR1 soluble que se expresó unido a dAb utilizando el BIAcore™ en cuanto a su capacidad para unirse al TNFR1 con o sin la presencia de proteasas durante incubaciones de una hora o de una noche a 37 °C en presencia o ausencia de tripsina (a 100 μ g/ml o 1000 μ g/ml de concentración final de tripsina).

Esto dio lugar al aislamiento de dos moléculas candidatas DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 que demostraron una resistencia a proteasas mejorada como se demostraba por experimentos BIAcore™ de unión al antígeno. Es interesante señalar que el DOM1h-131-202 contenía solo una mutación en la CDR2 (V53D), (toda la numeración de aminoácidos son de acuerdo con Kabat) en comparación con el DOM1h-131-511, mientras que el DOM1h-131-206 contenía solo dos mutaciones; la primera mutación es la misma que en DOM1h-131-202 (mutación V53D en CDR2) y la segunda es una mutación Y91H en FR3 (véase la Figura 3). Esta mutación Y91H en FR3 se produce en el gen de la línea germinal 3-20 lo que indica que este resto se encuentra en anticuerpos humanos. Los tres clones DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en la

Figura 3.

La actividad de las moléculas se determinó como posteriormente:

Evaluación BIAcore™ de afinidad de unión de DOM1h-131-202, DOM1h-131-511 y DOM1h-131-206 en cuanto a la unión al TNFR1 humano.

Las afinidades de unión de DOM1h-131-202, DOM1h-131-511 y DOM1h-131-206 de la unión al TNFR1 humano expresado en *E. coli* se evaluó por análisis BIAcore™. El análisis se llevó a cabo utilizando el TNFR1 humano biotinilado. Se revistió con 1400 UR de TNFR1 biotinilado un chip de estreptavidina (SA). La superficie se regeneró para volver a la línea base utilizando condiciones de elución con un ácido débil. El DOM1h-131-202, DOM1h-131-511 y DOM1h-131-206 se pasaron por encima de esta superficie a concentraciones definidas utilizando una velocidad de flujo de 50 µl/min. El trabajo se llevó a cabo en una máquina BIAcore 3000 y los datos se analizaron y ajustaron al modelo de unión 1:1. Los datos de unión se ajustaron bien al modelo 1:1 en todas las moléculas ensayadas. Se calcularon todos los valores de K_D a partir de las tasas k_{on} y k_{off} . Los procesos BIAcore™ se llevaron a cabo a 25 °C.

Los datos posteriores se produjeron a partir de tres experimentos independientes. En cada experimento los resultados se calcularon promediando un número d ajustes utilizando las concentraciones de dAb más altas para k_d y las concentraciones más bajas de k_a . Los datos se presentan como la media y la desviación estándar (entre paréntesis) de los resultados (Tabla 1).

Tabla 1: Datos del BIAcore™ para la unión de DOM1h-131-202, DOM1h-131-511 y DOM1h-131-206 al TNFR1 humano

	k_{on}	k_{off}	K_D (nM)
DOM1H-131-511 (511)	5,03E+05 (1,07E+05)	5,06E-04 (1,01E-04)	1,07 (0,44)
DOM1H-131-202 (202)	1,02E+06 (2,69E+05)	5,42E-04 (3,69E-05)	0,55 (0,11)
DOM1H-131-206 (206)	1,55E+06 (3,57E+05)	7,25E-04 (1,95E-04)	0,47 (0,06)

El DOM1h-131-202, DOM1h-131-511 y DOM1h-131-206 se unen similarmente, y con alta afinidad al TNFR1 humano. El DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 se unen con afinidades medias de 0,55 nM y 0,47 nM respectivamente. Ambos DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 tienen una afinidad ligeramente mejor en comparación con el DOM1h-131-511 que tiene una afinidad media de 1,07 nM.

Ensayo de unión al receptor:

La potencia de los dAb se determinó contra el TNFR1 humano en un ensayo de unión al receptor. Este ensayo mide la unión del TNF- α al TNFR1 y la capacidad del dAb soluble para bloquear esta interacción. La fusión TNFR1-FC se captura en una perla pre-revestida con anti-IgG humana de cabra (H&L). Las perlas revestidas con el receptor se incubaron con TNF-alfa (10 ng/ml), dAb, anti-TNF-alfa conjugada con biotina y estreptavidina Alexa flúor 647 en placas de fondo transparente con caras negras de 384 pocillos. Tras 6 horas la placa se leyó en un sistema de detección celular ABI 8200 y se determinó la fluorescencia asociada a las perlas. Si el dAb bloquea la unión del TNF-alfa al TNFR1 la intensidad de la fluorescencia se reducirá.

Se analizaron los datos utilizando el software de análisis ABI 8200. Los valores de las curvas del efecto de la concentración y la potencia (CE_{50}) se determinaron utilizando el Prism GraphPad y una curva de respuesta a la dosis sigmoidea con pendiente variable. El ensayo se repitió en tres ocasiones por separado. Se incluyó una curva de dosis de TNF-alfa en cada experimento (Figuras 38 y 39). La concentración de TNF-alfa que se utiliza para competir con la unión del dAb al TNFR1 (10 ng/ml) es aproximadamente el 90% de la respuesta máxima de TNF-alfa en este ensayo.

En la figura 39 se muestra un gráfico representativo que muestra la capacidad de los dAb para inhibir la unión del TNF-alfa al TNFR1. En los tres experimentos las muestras de control negativo (HEL4, una lisozima anti-dAb de clara de huevo de gallina y una falsa V_H) inhiben débilmente la interacción entre TNF-alfa y el TNFR1 a altas concentraciones. Los valores de potencia media (EC_{50}) para las muestras de ensayo y los controles positivos (mAb anti-TNFR1 que se obtiene en R&D Systems, mAb225) y Enbrel™ (etanercept; una fusión dimérica que consiste en TNFR2 unido a la parte Fc de IgG1; aprobado para el tratamiento de la artritis reumatoide) como se muestra en el Tabla 2.

Tabla 2: Valores de potencia (CE_{50}) para DOM1H-131-202, DOM1H-131-206 y DOM1H-131-511 en un ensayo de unión al receptor del TNFR1 para tres experimentos repetidos.

Muestra	CE_{50} media (nM)	SEM
DOM1H-131-202	0,11	0,008
DOM1H-131-206	0,07	0,01
DOM1H-131-511	0,19	0,01
Enbrel [™] (Etanercept)	0,20	0,07
Anti-TNFR1 mAb nº mAb225	0,08	0,003

En este ensayo, el DOM1H-131-206 aparece más potente que los otros dos dAb que se ensayan y tiene una potencia similar al mAb anti-TNFR1 disponible comercialmente, el MAB225 (R & D Systems).

La expresión de los clones candidatos a partir de *Pichia pastoris* se llevó a cabo como se describe a continuación: La secuencia de aminoácidos primaria de las tres moléculas candidatas se utilizó para producir genes con codón optimizado para la expresión segregada en *Pichia pastoris*. Hay una identidad de secuencia del 75% entre el DOM1H-131-206. Los tres genes sintéticos se clonaron en el vector de expresión pPIC-Z α (de Invitrogen) y luego se transformaron en dos cepas de *Pichia*, X33 y KM71H. Las células transformadas se colocaron en placas en concentraciones crecientes de Zeocina (100, 300, 600 y 900 μ g/ml) para seleccionar clones con múltiples integrantes. Se seleccionaron aproximadamente 15 clones para cada línea celular y construcción para la exploración de expresión. Como la correlación entre el número alto/bajo de copias del gen y el nivel de expresión no se comprende totalmente en *Pichia pastoris*, se escogieron varios clones a través del intervalo de concentración de Zeocina. Se llevaron a cabo ejecuciones en fermentador de 5 l utilizando clones que no se habían explorado extensamente en cuanto a alta productividad. Esto permitió la producción de cantidades significativas de material para estudios posteriores.

Producción de material para la caracterización de proteínas:

Se han utilizado extensamente resinas de cromatografía basada en Proteína A para purificar mAb V_H a partir de los sobrenadantes de cultivos bacterianos. Aunque esto permite un procedimiento de purificación en una etapa para producir material de alta pureza, habitualmente > 90% en la mayoría de los casos, para algunas moléculas las condiciones de elución con pH bajo puede dar lugar a la formación de agregados. También existe el problema de la limitada capacidad de las resinas de afinidad para los dAb; esto significaría que el uso de cantidades significativas de resina para procesar a partir de los fermentadores. Con el fin de producir un material de alta calidad para la caracterización y más estabilidad y los estudios de nebulizador, se ideó un proceso de purificación corriente abajo utilizando una resina de inducción de carga modal mezclada como la primera etapa de captura seguida por un intercambio aniónico. Sin una optimización significativa, esto permite la recuperación de ~ 70% del dAb que se expresa a una pureza de ~ 95%.

Para la etapa de captura en la resina de inducción de carga modal mezclada, se lleva a cabo la columna de equilibrio, Capti MMC de GE Healthcare, utilizando 50 mM de fosfato sódico pH 6,0 y se carga el sobrenadante sin que necesite dilución o ajuste del pH. Tras lavar la columna, la proteína se eluye con un gradiente de pH utilizando un tampón de elución que es de Tris 50 mM a pH 9,0. El lavado específico y las condiciones de gradiente variarán ligeramente dependiendo del pI de la proteína que se va a eluir.

El pico de eluido se purifica más entonces con un flujo por medio de una etapa que utiliza cromatografía de intercambio aniónico. Esto elimina la contaminación HMW residual tal como la alcohol oxidasa y recude endotoxinas. La resina se equilibra con o bien PBS o tampón fosfato pH 7,4 sin sal. Con la carga del eluido a partir de la Capto MMC en la resina de intercambio aniónico el dAb no se une y se recupera del flujo. Las endotoxinas y otros contaminantes se unen a la resina. La presencia de sal si se utiliza tampón PBS mejora la recuperación de proteína al 91% para esta etapa más que el 86% de recuperación que se consigue sin sal. Sin embargo la presencia de sal reduce la eficacia de la eliminación de endotoxina tal que típicamente se midió un nivel de endotoxina de dAb después de esa etapa con la inclusión de sal como 58 EU/ml en comparación con un nivel de < 1,0 EU/ml que se obtiene cuando no está presente la sal.

Caracterización de Proteínas:

El material producido de las ejecuciones en fermentador de 5 l se caracterizó en cuanto a la identidad utilizando espectrometría de masas con electropulverización, secuenciación del extremo amino y enfoque isoelectrico y en cuanto a la pureza utilizando SDS-PAGE, SEC y el kit de tinción de glucoproteínas Gelcode (Pierce).

Identidad:

El análisis de la secuencia del extremo amino de los primeros cinco restos de cada proteínas, era como se esperaba (EVQLL...). Se llevó a cabo la espectrometría de masas en muestras de las proteínas que habían sido intercambiados con tampón en 50:50 H₂O:acetonitrilo que contenía un 0,1% de ácido acético glacial utilizando C4 Zip-tips (Millipore). La masa medida para cada una de las tres proteínas estaba en 0,5 Da de la masa teórica basándose en la secuencia de aminoácidos primario (calculado utilizando masas medias) cuando se permite una diferencia de masas de -2 a partir de la formación del enlace disulfuro interno. Se utilizó IEF para identificar las proteínas basándose en su pI que era diferente para cada proteína.

Pureza:

Las tres proteínas se cargaron en geles de SDS-PAGE no reductor en cantidades de 1 µg y 10 µg por duplicado. Se observó una sola banda en todos los casos. Se llevó a cabo también una cromatografía de exclusión por tamaño para demostrar los niveles de pureza. Para la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se cargaron 100 µg de cada proteína en una columna TOSOH G2000 SWXL con un flujo de 0,5 ml/min. La fase móvil era PBS/10% de etanol.

Investigación de estabilidad de dAb para la selección de candidatos:

Para la indicación en COPD, sería necesario suministrar el dAb en el pulmón, por ejemplo utilizando un dispositivo nebulizador. Esto significaría que la proteína podría potencialmente experimentar un intervalo de tensión por cizalladura y térmica dependiendo del tipo de nebulizador que se utilice y podría estar sometida a degradación enzimática por las proteasas del ambiente pulmonar. Se determinó si la proteína se podía suministrar utilizando este tipo de dispositivo, formar la distribución correcta de tamaño de la partícula y si permanecía funcional después del suministro con nebulizador. Por lo tanto, se investigó la estabilidad intrínseca de cada molécula en un intervalo de presiones físicas para determinar la línea base de estabilidad y la mayoría de los ensayos sensibles que indican la estabilidad. Como la estabilidad de cada proteína dependerá de la solución tampón en la que se solubiliza, era necesario hacer algún trabajo pre-formulación. Esta información, tal como el tampón, pH, también sería útil para entender la estabilidad de la proteína durante el proceso de purificación corriente abajo y el almacenamiento posterior. Con el fin de caracterizar los cambios en las moléculas durante la exposición a un intervalo de presiones físicas, se utilizó un intervalo de técnicas analíticas tal como la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), SDS-PAGE y enfoque isoeléctrico (IEF).

Evaluación de la estabilidad a la proteasa de DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 y DOM1H-131-206:

La estabilidad a la proteasa de DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 y DOM1H-131-206: se evaluó por el análisis BIAcore™ de la actividad de unión residual tras la pre-incubación durante puntos de tiempo definidos en un exceso de proteasas. Se revistió con aproximadamente 1400 UR de TNFR1 biotinilado un chip de estreptavidina (SA). Se incubaron 250 nM de DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 y DOM1H-131-206 con tampón PBS solo o con 100 µg/ml de tripsina, elastasa o leucozima durante 1, 3, y 24 horas a 30 °C. La reacción se paró por la adición de un cóctel de inhibidores de proteasa. Las mezclas dAb/proteasa se pasaron entonces sobre el chip revestido con TNFR1 utilizando una sustracción celular de referencia. La superficie del chip se regeneró con 10 ul de glicina 0,1 M a pH 2,2 entre cada ciclo de inyección. La fracción de DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 y DOM1H-131-206 unida al TNFR1 humano (a 10 segundos) que se pre-incubaron con proteasas se determinó con respecto a la unión del dAb sin proteasas. Se llevó a cabo las ejecuciones de BIAcore™ a 25 °C.

Los datos se produjeron a partir de tres experimentos independientes. El gráfico de barras indica valores medios y las barras de error indican la desviación estándar de los resultados (para los resultados véase la Figura 24).

Se descubrió que DOM1H-131-202 y DOM1H-131-206 tenían una resistencia mayor a la degradación proteolítica por tripsina, elastasa o leucozima en comparación con el DOM1H-131-511. La diferencia entre DOM1H-131-202 y DOM1H-131-206 en comparación con DOM1H-131-511 es más pronunciada tras 1 hora con tripsina y tras 3 horas con elastasa o leucozima.

Estabilidad térmica según se determina utilizando DSC:

Con el fin de determinar el pH en el que las moléculas tenían la mayor estabilidad, se utilizó un calorímetro de selección diferencial (DSC) para medir las temperaturas de fusión (T_m) de cada dAb en un tampón de Britton-Robinson. Como el Britton-Robinson está compuesto de tres sistemas de componentes tampón (acetato, fosfato o borato), es posible producir un intervalo de pH desde 3 - 10 en la misma solución. Se determinó el pI teórico de la secuencia de aminoácidos primaria de las proteínas. Con el DSC se encontró que el pH al que los dAb tenían sus mayores estabilidades térmicas intrínsecas era con un pH 7 para DOM1H-131-202 (202), pH 7-7,5 para DOM1H-131-206 (206) y pH 7,5 para DOM1H-131-511 (511). Para los posteriores trabajos de presión y estabilidad se utilizaron los siguientes pH para cada dAb; para DOM1H-131-202 (202) y DOM1H-131-206 (206) pH 7,0 y para DOM1H-131-511 (511) pH 7,5 en tampón de Britton-Robinson. Los resultados se resumen en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3: Resumen del pH y T_m de DOM1H-131-202 (202), DOM1H-131-206 (206) y DOM1H-131-511 (511) según se determinan por DSC en tampón de Britton-Robinson a 1 mg/ml

dAb	pH que da la mayor estabilidad térmica intrínseca	T _m (°C) del dAb al pH determinado
DOM1H-131-202 (202)	7,0	68,6
DOM1H-131-206 (206)	7,0-7,5	65,8
DOM1H-131-511 (511)	7,5	58,0

Ensayo de la solubilidad intrínseca:

- 5 Todos los dAb candidatos se concentraron en concentradores Vivaspin por centrifugación (punto de corte 5 K), para determinar su solubilidad máxima y los niveles de recuperación con la concentración. Los experimentos se llevaron a cabo en tampón de Britton-Robinson y el pH más estable. Los volúmenes y concentraciones de la muestra se midieron durante un curso de tiempo y se registró la desviación de la concentración esperada así como el porcentaje de recuperación de la muestra.
- 10 Se descubrió que todas las proteínas se podían concentrar sobre uno 100 mg/ml en tampón Britton-Robinson. Tanto DOM1H-131-511 DOM1H-131-202 (202) y DOM1H-131-206 (206) mostraban recuperaciones menores que las esperadas en comparación con DOM1H-131-511 (511), pero aún con niveles aceptables.

Suministro por nebulizador de los dAb candidatos:

- 15 Ensayando los diferentes nebulizadores y tampones de formulación se demostró que el dAb podría suministrarse eficazmente utilizando una amplia variedad de dispositivos de nebulización. Resulta más importante, que se demostró por primera vez que la nebulización del dAb en el tampón de formulación producía la distribución adecuada de distribución de tamaño de partícula (que se compara utilizando el porcentaje de gotas < 5 µm) para el suministro pulmonar eficaz mientras que se mantiene la funcionalidad de la proteína. Esto se describe más a continuación.
- 20 Comparación de la actuación de varios dispositivos:
- Se ensayó el DOM1H-131-511 (511) en seis dispositivos nebulizadores que comprenden dos dispositivos de cada uno de los tres grupos principales de nebulizadores para formulaciones líquidas, es decir, nebulizadores ultrasónicos, nebulizadores de chorro, y nebulizadores de membrana vibrante. En cada dispositivo el dAb se ensaya a 5 mg/ml con un intervalo de concentraciones de PEG. Para cada muestra se midió el porcentaje de tamaño de gota < 5 µm utilizando el dispositivo Spraytek Malvern (Malvern Instruments Limited, RU) y los resultados se muestran en la Figura 35. La estabilidad de cada muestra después de nebulizarse se evaluó utilizando la SEC para analizar la cantidad de muestra que se ha dimerizado tanto en el material remanente en la cubeta como en el aerosol recolectado. Los resultados se pueden ver en la figura 36 Cuanto menor era la extensión de formación de dímeros mayor era la estabilidad.
- 25 La mayoría de los dispositivos pueden suministrar un 40% o más de formulación líquida en el intervalo correcto de tamaño pero los dispositivos dFlow (un dispositivo de membrana vibrante) y PARI LC (un nebulizador de chorro) actuaban mejor, con el dispositivo PARI LC* (star) que suministra más del 80% cuando se incluyen el PEG en el tampón. Este aumento del suministro con el PEG también se observa en el eFlow y, en una menor extensión, con el PARI LC+.
- 30 De manera importante se encontró que la actividad del mAb se mantenía tras la nebulización (véase los resultados en la Figura 8).

Efectos de los aditivos tampón:

- Debido a la menor estabilidad del DOM1H-131-511 (511), la formulación de tampón fosfato 50 mM contenía tanto PEG 1000 y sacarosa (y tiene una viscosidad que está en el intervalo de se define como aproximadamente igual a la viscosidad de una solución de aproximadamente un 2% a aproximadamente un 10% de PEG 1000 en un tampón fosfato 50 mM que contiene un 1,2% de sacarosa (p/v) para ayudar a proteger el dAb tanto de la presión de cizalladura como térmica. Como ambos DOM1H-131-202 (202) y DOM1H-131-206 (206) tienen T_m más altas y muestran una estabilidad considerablemente mejorada a la presión térmica, todas las moléculas se ensayaron en tanto la formulación original de tampón como en tampón de Britton-Robinson (que tiene una viscosidad menor que el tampón de formulación). Los dAb se ensayaron en ambos dispositivos, el E-flow y PARI LC+ con un tiempo de ejecución de 3,5 minutos con una concentración de proteína de 5 mg/ml y la distribución de tamaño de partícula que se determinó utilizando un dispositivo Spraytek Malvern. Como comparación, se ensayó un fármaco comercializado para fibrosis quística (designado proteína de referencia X) que se suministra utilizando un dispositivo nebulizador, en

su propio tampón de formulación. Los resultados se muestran en la Figura 37. Para el buen suministro y distribución en la profundidad del pulmón, el tamaño ideal de partícula es menor de 6 micras, por ejemplo, $< 5 \mu\text{m}$. Todos los dAb daban tamaños comparables de partícula que eran menores de $5 \mu\text{m}$ en el tampón de Britton-Robinson y tampón de formulación (como se ha descrito anteriormente). Sin embargo, la viscosidad más alta del tampón de formulación podría ser particularmente beneficiosa para producir partículas con el intervalo correcto de tamaño, por ejemplo, partículas $< 5 \mu\text{m}$. La concentración de dAb en la cubeta del dispositivo se determinó por mediciones A_{280} antes y después de la nebulización. Se encontró que la concentración de proteína no cambiaba significativamente lo que indica que ni la proteína ni el vehículo se nebuliza preferencialmente durante el suministro.

Conclusión:

Se ha demostrado como se describe anteriormente que los polipéptidos tales como los dAb se pueden nebulizar en el intervalo de dispositivos nebulizadores disponibles comercialmente y de manera importante que mantienen la estabilidad y la actividad biológica tras la nebulización y no se observa una agregación significativa después de la nebulización. Cuando se añaden excipientes que mejoran la viscosidad, tal como PEG, al tampón de formulación, se pueden mejorar la distribución del tamaño de partícula y el porcentaje de tamaño de gotas menor de $5 \mu\text{m}$, mejorando así potencialmente el suministro de dAb en la profundidad del pulmón.

El suministro de dAb en el pulmón se puede mejorar también aumentando la concentración de dAb por ejemplo una concentración de hasta aproximadamente 40 mg/ml y el tiempo de suministro sin ninguna reducción de la estabilidad o actividad de dAb.

Ejemplo 1

Vector fago pDOM13

Se utilizó un vector de presentación fago filamentoso (fd), pDOM13. Este vector produce proteínas de fusión con la proteína de envoltura III del fago. El sitio de clonación múltiple en el pDOM13 se ilustra en la FIG. 1. Los genes que codifican los dAb se clonaron como fragmentos *SalI/NotI*.

Ejemplo 2

Selecciones de proteasas de ensayo en dominios de anticuerpos (dAb) presentados en fagos con un intervalo de resistencia a la tripsina

Los genes que codifican dAb DOM4-130-54 que se une a IL-1R1, el DOM1H-131-511 que se une al TNFR1, y DOM15-10, DOM15-26 y DOM 15-26-501, que se une al VEGFA, se clonaron en el pDOM13 y los fagos que presentaban estos dAb se produjeron de acuerdo con técnicas de referencia. Los fagos se purificaron por precipitación en PEG, se resuspendieron en PBS y se titularon.

Los dAb anteriores presentaban un intervalo de capacidad para resistir la degradación por tripsina cuando se ensayaban como proteínas aisladas. La resistencia a la degradación se evaluó de la siguiente manera: se incubó el dAb (1 mg/ml) en PBS con tripsina a $40 \mu\text{g/ml}$ a 30°C , dando como resultado una relación molecular de 25:1 dAb:tripsina. Las muestras (30 μl) se tomaron inmediatamente antes de la adición de tripsina, y luego en el $T = 1$ hora, 3 horas, y 24 horas. La actividad de proteasa se neutralizó por adición de inhibidores de proteasa completo de Roche (2x) seguido por la inmersión en nitrógeno líquido y el almacenamiento en hielo seco. Se analizaron posteriormente 15 μg de cada muestra de dAb por electroforesis en un gel Tricina al 10-20% Novex y se tiñeron las proteínas con SureBlue (1-x).

Tanto el DOM15-10 y DOM15-26-501 se digirieron significativamente durante las primeras tres horas. El DOM15-26, DOM4-130-54 y DOM1h-131-511 eran más estables, la digestión de dAb solo era aparente tras 24 horas (FIG. 2).

Los dAb presentados en fagos también se incubaron en presencia de tripsina para evaluar si la resistencia a la tripsina de los dAb presentados en fagos se correlacionaba con los resultados obtenidos con los dAb solubles aislados. Se ensayaron varias concentraciones de tripsina y tiempos de incubación. En todos los casos, tras la neutralización de tripsina con inhibidores de proteasa completo de Roche, los fagos se ensayaron en cuanto a su capacidad para unirse a un ligando genérico: proteína A, que se une a todos los dominios de anticuerpo V_H (por ejemplo, DOM1h-131, DOM15-26, DOM15-26-501) o proteína L, que se une a todos los dominios de anticuerpo V_K (por ejemplo, DOM4-130-54, DOM 15-10). Se ensayaron también los fagos en cuanto a la unión a los antígenos diana. En ambos casos, se asumía que la unión se correlaciona con el mantenimiento de la integridad estructural de dAb por medio de la resistencia a la proteólisis. La actividad de unión se midió o por ELISA (utilizando anticuerpos conjugados contra los fagos) o por elución de los fagos unidos y análisis de titulación después de la infección de células de *E. coli* TG1 en crecimiento exponencial.

Ensayos con DOM15-10, DOM15-26 y DOM15-26-501 en el fago

Cada dAb se trató durante una hora a temperatura ambiente con un intervalo de concentraciones de tripsina (100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 0 $\mu\text{g/ml}$). Se bloqueó la actividad de tripsina con Inhibidor de proteasa Completo de Roche (1x) y

luego se diluyeron los fagos en un 2% de Marvell en PBS, se incubaron con 50 nM de antígeno biotinilado (VEGF recombinante humano (R&D Systems)) durante una hora a temperatura ambiente. Se añadieron perlas revestidas de estreptavidina (Dynabeads M-280 (Invitrogen)) que se había pre-bloqueado durante una hora a temperatura ambiente con un 2% de Marvell en PBS, y la mezcla se incubó entonces durante cinco minutos a temperatura ambiente. Todas las etapas de incubación con las Dynabeads se llevaron a cabo en una rueda rotatoria. Los fagos no unidos se eliminaron, lavando las perlas ocho veces con 1 ml de Tween-20 al 0,1% en PBS. Los fagos unidos se eluyeron con 0,5 ml de Glicina 0,1 M pH 2,2 y se neutralizaron con 100 μ l de 1 M de Tris-HCL a pH 8,0. Los fagos eluidos se utilizaron para infectar células TG1 en crecimiento exponencial (una hora a 37 °C) y se colocaron en placas sobre placas de tetraciclina. Las placas se incubaron una noche a 37 °C y se realizó el recuento de colonias (véase la Tabla 4). Los mejores resultados se observaron con la selección por incubación con 100 μ g/ml de tripsina. Había un aumento de aproximadamente 10 veces en el rendimiento de DOM15-26 en comparación con DOM15-10 y DOM15-26-501.

Se hizo un segundo experimento para confirmar más estos resultados bajo condiciones de incubación más rigurosas. Los fagos que presentan dAb se trataron durante 1 hora o 2 horas a 37 °C con agitado (250 rpm). Los mejores resultados se observaron con las selecciones con las 2 horas de incubación con 100 μ g/ml de tripsina. El rendimiento de DOM15-26 era 200 veces mayor que el rendimiento de DOM15-26-501 y 1000 veces mayor que el rendimiento de DOM15-10.

En un tercer experimento, los fagos que presentan DOM15-26 y DOM15-26-501 se mezclaron 1:1 en el comienzo. Entonces se incubaron o bien con tripsina (1000 μ g/ml) o sin tripsina durante dos horas a 37 °C con agitado (250 rpm), y luego se seleccionaron en cuanto a su unión al antígeno como se ha descrito anteriormente. La secuenciación de diez colonias de cada selección revelaba una población mixta de clones para la selección sin pre-tratamiento con tripsina (DOM15-26: 4/10; DOM 15-26-501: 6/10), mientras que todos los clones de la selección con tripsina codificaban DOM 15-26 como se esperaba.

Estos experimentos indican que se puede obtener una presión de selección añadiendo una proteasa a los fagos que presentan los dAb, tal que los fagos que presentan la mayoría de los dAb proteolíticamente estables se seleccionan preferentemente (después del ensayo de selección sobre un ligando genérico o el antígeno).

Tabla 4

Experimento	Longitud de la incubación	Temp.	Concentración de tripsina	Título de DOM15-26	Título de DOM 15-26-501	Mezcla de títulos 1:1	Título de DOM 15-10
1 Entrada 10 ¹⁰	1 h	Temp. ambiente	100 μ g/ml	1,6 x 10 ⁸	6,3 x 10 ⁷		1,1 x 10 ⁷
	1 h	Temp. ambiente	10 μ g/ml	3 x 10 ⁸	4,4 x 10 ⁸		2,4 x 10 ⁸
	1 h	Temp. ambiente	0 μ g/ml	0,9 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸		0,7 x 10 ⁸
2 entrada 10 ⁹	1 h, 250 rpm	37 °C.	100 μ g/ml	2 x 10 ⁷	1 x 10 ⁶		1 x 10 ⁵
	2 h, 250 rpm	37 °C	100 μ g/ml	1 x 10 ⁷	6 x 10 ⁴		1 x 10 ⁴
	2 h, 250 rpm	37 °C	0 μ g/ml	5,4 x 10 ⁷	4,1 x 10 ⁷		3 x 10 ⁸
3 Entrada 10 ¹⁰	2 h, 250 rpm	37 °C	100 μ g/ml	2,3 x 10 ⁸	8 x 10 ⁵	6,8 x 10 ⁷	
	2 h, 250 rpm	37 °C	0 μ g/ml	3,9 x 10 ⁸	4,4 x 10 ⁸	4,8 x 10 ⁸	

Ensayos con DOM4-130-54 sobre fagos

El DOM4-130-54 se ensayó con un protocolo similar al que se ha descrito anteriormente. Los parámetros que se variaban eran: concentración de tripsina, temperatura y longitud de la incubación. Se hizo un biopanning contra IL-RI-Fc (una fusión de IL-1RI y Fc) a una concentración de 1 nM en PBS. Solo se observaron reducciones en el título de fagos tras la incubación del fago con 100 μ g/ml de tripsina una noche a 37 °C (véase la Tabla 5).

Tabla 5

Longitud de incubación	Temperatura	Concentration de Tripsina	Título
1 h	Temp. ambiente	100 µg/ml	$1,8 \times 10^{10}$
1 h	Temp. ambiente	10 µg/ml	$7,2 \times 10^9$
1 h	Temp. ambiente	0 µg/ml	$6,6 \times 10^9$
Durante una noche	Temp. ambiente	100 µg/ ml	$2,16 \times 10^9$
Durante una noche	Temp. ambiente	10 µg/ml	$7,2 \times 10^9$
Durante una noche	Temp. ambiente	0 µg/ml	$7,8 \times 10^9$
Durante una noche	37 °C	100 µg/ml	$2,04 \times 10^6$
Durante una noche	37 °C	10 µg/ml	$3,84 \times 10^8$
Durante una noche	37 °C	0 µg/ml	$7,2 \times 10^9$

Ensayos con el DOM1h-131 en fagos

- 5 Los fagos con DOM1h-131 (estrechamente relacionado con el DOM1h-131-511 por la secuencia de aminoácidos) se trataron con 0 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml y 1000 µg/ml de tripsina durante una hora a temperatura ambiente. La digestión se inhibió por adición de 25x Inhibidores de proteasa completos (Roche). Se llevaron a cabo diluciones de 2 veces en serie bajo una placa de ELISA revestida con 1 nM de TNFR1, y se detectaron la unión a los fagos con un anti-M13-HRP. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6

DOM1h-131				Entrada de fagos
Concentration Tripsina				
1 mg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	0 µg/ml	
0,284	0,418	0,784	0,016	4,51 E+10
0,229	0,377	0,802	0,944	2,26 E+10
0,183	0,284	0,860	0,940	1,13 E+10
0,133	0,196	0,695	0,962	5,64 E+09
0,114	0,141	0,573	0,046	2,82 E+09
0,089	0,115	0,409	0,850	1,41 E+09
0.084	0.084	0,286	0,705	7,05 E+08
0.080	0.084	0,213	0,577	3,52 E+08

10 Estos experimentos de ensayo muestran claramente que 100 µg/ml de tripsina y una temperatura de 37 °C son apropiados para aplicar una presión de selección en los fagos que presentan dAb de varios grados de resistencia a la proteólisis por tripsina. El tiempo de incubación con la proteasa se puede optimizar para cada dAb que se presenta en un fago, si se desea.

Ejemplo 3Selección por proteasa de repertorios de dominios de anticuerpo presentados en fagos

- Se crearon cuatro repertorios utilizando los siguientes dAb como moléculas parentales: DOM4-130-54, DOM1h-131-511, DOM15-10 y DOM15-26-555. SE introdujeron mutaciones aleatorias en los genes por PCR utilizando el kit de Stratagene Mutazyme II, cebadores biotinilados y 5-50 pg de matriz para 50 µl de reacción. Tras la digestión con *SaI* y *NotI*, se purificaron las inserciones de los productos no digeridos con perlas revestidas de estreptavidina y se unieron en el pDOM13 en los sitios correspondientes. Se transformaron células de *E. coli* TBI con la mezcla de la unión purificada lo que daba como resultado grandes repertorios de clones resistentes a la tetraciclina: $8,5 \times 10^8$ (DOM4-130-54), $1,5 \times 10^9$ (DOM1h-131-511), $6,0 \times 10^8$ (DOM15-10) y 3×10^9 (DOM15-26-555).
- Se prepararon las bibliotecas de fagos por precipitación doble con PEG y se resuspendieron en PBS.
- Las tasas de mutaciones de aminoácidos fueron 2,3 y 4,4 para los repertorios DOM1h-131-511 y DOM4-130-54, respectivamente. La funcionalidad se evaluó ensayando 96 clones en ELISA de fago utilizando pocillos revestidos con proteína A o proteína L (a 1 µg/ml). El 62,5% y 27% de los clones mostraban presentación funcional de dAb en los repertorios DOM1h-131-511 y DOM4-130-54, respectivamente.
- Las tasas de mutaciones de aminoácidos fueron 2,5 y 4,6 para los repertorios DOM15-10 y DOM15-26-555, respectivamente. La funcionalidad se evaluó ensayando 96 clones en ELISA de fago utilizando pocillos revestidos con proteína A o proteína L (a 1 µg/ml). El 31,3% y 10,4% de los clones mostraron presentación funcional de dAb en los repertorios DOM15-10 y DOM15-26-555, respectivamente.

Repertorios DOM4-130-54 y DOM1h-131-511

- Se llevaron a cabo cuatro rondas de selección con estas bibliotecas para seleccionar los dAb con resistencia a proteasa mejorada.
- La primera ronda de selección era por unión al antígeno (1 nM o 10 nM de antígeno) sin tratamiento por proteasa para limpiar la biblioteca al eliminar algunos clones que no se habían unido al antígeno con alta afinidad. Los resultados de la ronda 1 estaban en el intervalo de los 10^8 - 10^{10} (comparado con una entrada de 10^{11} fagos) que indica que la mayoría de la biblioteca se une al antígeno con alta afinidad.

En la ronda 2, se introduce el tratamiento con proteasa con 100 µg/ml y los resultados se muestran a continuación en la Tabla 7:

Tabla 7

Condiciones de incubación de tripsina	biblioteca DOM1h-131-51	biblioteca DOM4-130-54
37 °C una noche	$1,86 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
37 °C 2 h	$4,8 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$
Temperatura ambiente 2 h	$1,2 \times 10^9$	$4,62 \times 10^9$
Sin tripsina	$\sim 1 \times 10^9$	$\sim 4 \times 10^9$
Sin antígeno	$1,8 \times 10^4$	$< 6 \times 10^3$

- Había una selección significativa cuando los dAb se trataban con tripsina a 37 °C durante una noche. Este resultado se tomó para la ronda 3, en la que el fago se trató con 1 mg/ml o 100 µg/ml de tripsina a 37 °C durante 24 horas. Los títulos de fagos tratados con tripsina de la ronda 3 fueron de 10^5 - 10^6 para el repertorio DOM1h-131-511 y de 10^7 - 10^8 para el repertorio DOM4-130-54.
- Todos los resultados de la ronda 3 (DOM1h-131-511 y DOM4-130-54 con 1 mg/ml y 100 µg/ml) se sometieron a una cuarta ronda de selección contra 1 nM de antígeno con 100 µg/ml de tripsina. Los títulos estaban en el intervalo de 10^6 - 10^8 , de manera similar a lo observado en la ronda 3. Se apreció algún enriquecimiento para el repertorio DOM1h-131-511, pero no se observó ningún enriquecimiento con el repertorio DOM4-130-54.

Repertorios DOM15-10 y DOM15-26-555

- La primera ronda de selección se llevó a cabo con una concentración 2 nM de hVEGF biotinilado (factor de crecimiento endotelial vascular humano) y sin tratamiento con proteasa para limpiar la biblioteca y eliminar cualquier clon que no se haya unido al antígeno con alta afinidad. Los resultados de la ronda 1 eran aproximadamente de 10^8 (en comparación con una entrada de fagos de 10^{10} para DOM15-10 y 10^{11} fagos para DOM15-26-555) lo que indica

que la mayoría de la biblioteca se une al antígeno con alta afinidad.

La segunda y tercera rondas de selección se llevaron a cabo con 2 nM de hVEGF biotinilado. Antes del ensayo de selección con hVEGF, se incubaron los fagos en presencia de tripsina (100 µg/ml) a 37 °C en un agitador (250 rpm). El tiempo de incubación era de una hora para el repertorio DOM 15-10 y dos horas para el repertorio DOM 15-26-555.

Los resultados fueron los siguientes: $1,5 \times 10^6$ y 9×10^5 para la segunda y tercera rondas de selección con el repertorio DOM 15-10; $2,2 \times 10^5$ y $3,9 \times 10^9$ para la segunda y tercera rondas de selección con el DOM15-26-555.

Ejemplo 4

Análisis de los resultados de la selección: repertorios DOM4-130-54 y DOM1h-131-511

Todos los resultados de la ronda 3 y la ronda 4 se subclonaron en el vector pDOM5 y se transformaron en células JM83. El vector pDOM5 es un vector basado en el pUC119. La expresión de las proteínas se dirigió por el promotor Plac. Una secuencia directora GAS1 (véase el documento WO 2005/093074) aseguraba la secreción de dAb solubles aislados en el periplasma y el sobrenadante del cultivo de *E. coli* JM83. Se recolectaron aleatoriamente 96 y 72 colonias individuales de la ronda 3 y la ronda 4 para la expresión.

Se secuenciaron 12-24 clones de cada resultado de la ronda 3 y la ronda 4. Se observaron mutaciones de consenso en ambas selecciones y aproximadamente 25 clones que albergaban motivos de consenso se eligieron para posterior caracterización. Las secuencias de aminoácidos de estos clones se muestran en la FIG. 3 (variantes seleccionadas de DOM1h-131-511) y la FIG. 4 (variantes seleccionadas de DOM4-130-54) y se enumeran como secuencias de ADN en las FIG. 19A-19L. Los aminoácidos que se diferencian de la secuencia parental en los clones seleccionados están resaltados (lo que son idénticos están marcados con puntos). Los bucles que corresponden con las CDR1, CDR2 y CDR3 están encuadrados.

Estos clones se expresaban en una cantidad mayor, se purificaron en proteína L (para las variantes DOM4-130-54) y en proteína A (para las variantes DOM1h-131-511) y se ensayaron en cuanto a la unión al antígeno con BIAcore tras una hora o una noche de incubación a 37 °C en presencia o ausencia de tripsina (100 µg/ml o 1000 µg/ml de concentración final).

En general, los resultados de las selecciones de DOM4-130-54 eran más estables con la mayoría de los clones resistentes a la tripsina durante una hora y los mejores clones resistentes durante una noche. En comparación, una pequeña cantidad de las selecciones de DOM1h-131-511 eran resistentes a la tripsina durante una hora, mientras que ninguno era resistente durante una noche.

Ejemplo 5

Análisis del resultado: repertorios DOM15-10 y DOM 15-26-555

La eficacia de la selección con el pre-tratamiento con tripsina se ensayó primero en ELISA de fago monoclonal con y sin digestión con tripsina. Se recolectaron dieciocho colonias de la segunda ronda de selección y 24 colonias de la tercera ronda de selección de cada biblioteca. Se utilizaron los clones DOM 15-10, DOM 15-26-501 y DOM 15-26 como controles. Unos controles adicionales incluían una solución de fagos amplificados y purificados de cada biblioteca después de la segunda y tercera rondas de la selección con tripsina.

Cada muestra de fago se dividió en dos fracciones, la primera se trató con 100 µg/ml de tripsina, la segunda no se trató con tripsina. La incubación de ambas fracciones se llevó cabo durante una hora a 37 °C con agitado (250 rpm) y se bloqueó añadiendo Inhibidor de Proteasa Completo de Roche (1x).

Se llevó a cabo un ELISA de fago utilizando muestras digeridas y no digeridas con tripsina. Los pocillos del ELISA se revistieron con neutravidina en 0,1 M de tampón de bicarbonato a una concentración de 1 µg/ml. Tras las etapas de lavado con PBS y el bloqueo de los pocillos revestidos de antígeno con un 1% de Tween-20 en PBS durante una hora a temperatura ambiente, se revistieron los pocillos con hVEGF biotinilado diluido en un 1% de Tween-20 en PBS a una concentración de 100 ng/ml. Luego se lavaron los pocillos con PBS y se añadieron los sobrenadantes de fagos tratados y no tratados se diluyeron 1:1 con un 1% de Tween-20/PBS. Tras 30 minutos de incubación a 37 °C, se lavaron los pocillos con un 1% de Tween-20/PBS, seguido por una incubación de 30 minutos a 37 °C con conjugado HRP de anti-fago M13 (diluido 1/5000 en un 1% de Tween-20/PBS). Los pocillos se lavaron entonces con PBS y peroxidasa. La reacción se inició con la adición de reactivo SureBlue. Tras aproximadamente diez minutos, la reacción se paró con un volumen equivalente de HCl 1 M y se leyeron los pocillos a una $DO_{450 \text{ nm}}$.

Los resultados de las lecturas del ELISA de los controles inestables DOM15-10 y DOM15-26-501 tratados con tripsina daban una DO_{450} menores de 0,404 y este valor se asumió como un valor límite de un clon inestable. Todas las muestras que daban una DO inferior a 0,404 se consideraban inestables. Todas las muestras superiores a este valor se consideraron estables.

Tabla 8

Biblioteca	Tripsina		Sin tripsina	
	2ª selección	3ª selección	2ª selección	3ª selección
DOM15-10	33%	89%	100%	100%
DOM15-26-555	94,4%	100%	100%	100%

La tabla 8 muestra el porcentaje de clones estables después de la segunda y tercera rondas de selección con tripsina para cada biblioteca. El enriquecimiento de clones resistentes a tripsina es visible en ambas bibliotecas después de la tercera ronda de selección. Los valores de los pocillos de control del ELISA que contenían una mezcla de fagos amplificados purificados después de cada selección eran mucho mayores de 0,404 en cada caso tras la digestión con tripsina. Además, se observó un pequeño aumento en la señal cuando se comparaba los fagos tratados con tripsinas de la tercera ronda de selección con los fagos tratados con tripsina de la segunda ronda de selección. La biblioteca de fagos DOM15-10 mostraba un aumento de aproximadamente un 14% del valor de partida. La biblioteca de fagos DOM15-26-555 mostraba un aumento que representa aproximadamente un 2% del valor de partida.

En total, estos resultados muestran que la selección con pre-tratamiento de tripsina era eficaz para seleccionar clones de fagos resistentes a la tripsina a partir de los repertorios DOM15-10 y DOM15-26-555.

Todos los resultados de la segunda y tercera rondas de selección (DOM15-26-555) y solo de la tercera ronda de selección (DOM15-10) se subclonaron en el vector pDOM5 y se transformaron en células electrocompetentes HB2151. El vector pDOM5 es un vector basado en el pUC119. Las proteínas de expresión se dirigen por un promotor Plac. Una secuencia directora GAS1 aseguraba la secreción de los dAb solubles aislados en el periplasma y sobrenadante de la *E. coli* HB2151. Se recolectaron aleatoriamente 184 colonias individuales de cada ronda de selección (3 y 4) para la expresión en volúmenes de cultivo de 1 ml.

Se diluyeron los sobrenadantes bacteriano en tampón HBS-EP BIAcore (relación de volumen 1:1) y se dividieron por duplicado. Se añadió la tripsina solo a un vial a una concentración final de 20 µg/ml. Se llevó a cabo la incubación durante 40 minutos a 37 °C con agitado (250 rpm). Tras bloquear la reacción con el Inhibidor de Proteasa Completo de Roche (1x), tango los sobrenadantes tratados con tripsina como los no tratados se ensayaron en el BIAcore 3000 en cuanto a la unión con el antígeno (2.000 UR de hVEGF en sensorchip SA).

Los criterios para escoger los clones eran: una disminución de la unión al antígeno de < 15% de dAb tratados con tripsina con respecto a los dAb no tratados (basándose en la UR máx. alcanzada en un punto de tiempo seleccionado), lo que reflejaría la estabilidad de los dAb al tratamiento con proteasa en general; y el descenso de la tasa de disociación de < 40% entre dos puntos de tiempo durante la disociación de un dAb del antígeno. Basándose en estos valores, se secuenciaron 60 clones de ambas rondas de selección, segunda y tercera, de la biblioteca DOM15-26-555 y 17 clones de la tercera ronda de selección de la biblioteca DOM15-10. Se observaron mutaciones de consenso en ambos resultados de las bibliotecas y se escogieron 17 clones que albergaban motivos de consenso de cada biblioteca para su posterior caracterización. Las secuencias de aminoácidos de estos clones se muestran en la FIG. 5 (variantes seleccionadas de DOM15-26-555) y la FIG. 6 (variantes seleccionadas de DOM15-10) y se enumeran como secuencias de ADN en las FIG. 20A-20E. Los aminoácidos que se diferencian de la secuencia parental en los clones seleccionados están resaltados (los que son idénticos se marcan con puntos) los bucles que corresponden a las CDR1, CRD2 y CDR3 están encuadrados.

Estos clones se expresaron en cultivos de expresión de 50 ml, se purificaron en proteína A (para las variantes de DOM15-26-555) y proteína L (para las variantes de DOM15-10) se diluyeron a una concentración de 100 nM en tampón HBS-EP y se ensayaron en cuanto a la unión al antígeno en el BIAcore tras 1,5 horas de incubación a 37 °C con agitado (250 rpm) en presencia o ausencia de tripsina (a una concentración final de 20 µg/ml).

Estos clones se ensayaron también en cuanto a la resistencia a tripsina utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Las proteínas se intercambiaron de tampón a PBS y se concentraron a 1 mg/ml. Se mezclaron 25 µg de proteína con 1 µg de tripsina (Promega) y se incubaron durante 0 horas y 24 horas a 30 °C. Después de este tiempo, se bloqueó la reacción con Inhibidor de Proteasa Completo de Roche (1x) y DTT, así como se añadió un agente de carga. Las muestras se desnaturalizaron durante cinco minutos a 100 °C. Entonces se analizaron por electroforesis 15 µg de cada muestra en geles Tricina Novex al 10-20% y se tiñeron las proteínas con SureBlue (1x).

En general, los resultados de las selecciones en DOM15-26-555 eran más estables; permaneciendo la mayoría de los clones resistentes a la tripsina durante 1,5 horas cuando se ensayaron en BIAcore y una noche cuando se ejecutaba en SDS-PAGE. En comparación, solamente un pequeño número de clones de las selecciones en DOM15-10 eran resistentes a la tripsina durante el tratamiento de una noche cuando se ejecutaba en SDS-PAGE.

Ejemplo 6Identificación de variantes de DOM1h-131-511

Se analizaron con más detalle el DOM1h-131-203, DOM1h-131-204 y DOM1h-131-206. Se compararon en BIAcore a una concentración de 500 nM tras la incubación con diferentes concentraciones de tripsina (que variaban de 0 a 100 µg/ml) durante una noche a 37 °C. Los rastros del BIAcore se muestran en la FIG. 7. Los resultados muestran claramente que las variantes son más resistentes que su parental a la proteólisis a altas concentraciones de tripsina (100 µg/ml). Dos de los dAb, DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206, también se compararon junto con su parental contra una variedad de otras proteasas que incluían leucosima, elastasa y pancreatina bajo las condiciones descritas anteriormente, con una concentración de proteasa de 100 µg/ml. Los dAb mostraban un aumento de resistencia a la proteólisis en comparación con el parental contra todas las proteínas ensayadas. Los rastros de BIAcore para la elastasa y leucosima se muestran en la FIG. 8.

Se trataron 5 µM de cada dAb con 100 µg/ml de tripsina de calidad de secuenciación durante 0, 1, 3 y 25 horas. La reacción se inhibió con 25x de Inhibidor de Proteasa Completo de Roche y las reacciones se ejecutaron sobre gel Bis-Tris Novex al 4-12%. Los geles se muestran en la FIG. 9.

Ejemplo 7Identificación de variantes de DOM4-130-54

Se analizaron con más detalle el DOM4-130-201 y DOM4-130-202. Se compararon en el BIAcore a una concentración de 500 nM tras la incubación con diferentes concentraciones de tripsina (que variaban de 0 a 100 µg/ml) durante una noche a 37 °C. Los rastros del BIAcore se muestran en la FIG. 10. Los resultados mostraban claramente que las variantes eran más resistentes que su parental a la proteólisis a altas concentraciones de tripsina (100 µg/ml). Se compararon también el DOM4-130-201 y DOM4-130-202 con el parental contra una variedad de otras proteasas que incluían leucosima, elastasa y pancreatina bajo las condiciones descritas anteriormente con una concentración de proteasa de 100 µg/ml. Aunque los resultados eran menos aparentes que con las tripsinas, los dAb candidatos mostraban un aumento de la resistencia a la proteólisis en comparación con el parental contra todas las proteasas ensayadas. Los restos de BIAcore para la elastasa y leucosima se muestran en la FIG. 11.

Se trataron 5 µM de cada dAb con 100 µg/ml de tripsina de calidad de secuenciación durante 0,1, 3 y 24 horas. La reacción se inhibió con 25x de Inhibidor de Proteasa Completo de Roche y las reacciones se ejecutaron en gel Bis-Tris Novex 4-12%. Los geles se muestran en la FIG. 9.

Ejemplo 8Caracterización posterior de variantes DOM1h-131-511 y DOM4-130-54

Los dAb se analizaron primero utilizando la Calorimetría de Exploración Diferencial (DSC) para determinar si el aumento de resistencia a la tripsina se correlaciona con un aumento en la temperatura de fusión (T_m). Se correlaciona el aumento de estabilidad a tripsina con un aumento en la T_m (véase Tabla 9)

Tabla 9

Nombre	T _m . °C
DOM1h-131-511	57,9
DOM1h-131-202	67,5
DOM1h-131-203	65,7
DOM1h-131-204	62,3
DOM1h-131-206	64,9
DOM4-130-54	54,1
DOM4-130-201	64,7
DOM4-130-202	64,5

Los dAb derivados de DOM1h-131-511 también se compararon en un ensayo basado en células MRC-5 (véase la Tabla 10). En este ensayo, se midió la capacidad de los dAb para neutralizar la liberación de IL-8 estimulada por el TNF α para determinar si el aumento de estabilidad a la tripsina había dado lugar a una disminución en la eficacia. Sin embargo, la actividad de los dAb resistentes a la tripsina en el ensayo no se afectaba sustancialmente.

Tabla 10

Muestra	DN50 nM
DOM1h-131-511	1,98
DOM1h-131-511	1,71
DOM1h-131-511 (230307CE)	1,89
DOM1h-131-203 (230307CE)	2,28
DOM1h-131-204 (230307CE)	1,89
DOM1h-131-511	1,46
DOM1h-131-206 (230307CE)	0,71

Los dAb derivados del DOM1h-130-54 se ensayaron en un Ensayo de Unión al Receptor para apreciar si todavía tenían la misma capacidad para inhibir la unión de la IL-1 al IL-RI (véase la Tabla 11). La actividad de los dAb resistentes a la tripsina no se estaba afectada según este ensayo.

Tabla 11

dAb	CI50 (nM)
DOM4-130-54	280 pM
DOM4-130-201	257 pM
DOM4-130-202	254 pM

Ejemplo 9

Identificación de variantes de DOM15-26-555

- Se analizaron con más detalle el DOM15-26-588, DOM15-26-589, DOM15-26-591, y DOM15-26-593 junto con su parental y dos dAb adicionales, DOM15-26-594 y DOM 15-26-595, que se crearon por mutagénesis para combinar mutaciones que tendrían el mayor impacto sobre la potencia y estabilidad (E6V y F100S/I).

Las secuencias se muestran en la FIG. 12. Se compararon los clones en el BIAcore por su unión al hVEGF a una concentración de dAb de 100 nM tras la incubación con tripsina a una concentración de 200 µg/ml. La reacción se llevó a cabo durante 3 horas y 24 horas a 37 °C con agitado (250 rpm). Los rastros del BIAcore del mejor clon, DOM15-26-593, y el parental se muestran en la FIG. 13. Otros resultados se presentan como un gráfico en la FIG. 14. Los resultados muestran claramente que todas las variantes son más resistentes que el parental a la proteólisis tras 24 horas de tratamiento con tripsina.

La resistencia a la tripsina del DOM15-26-593 y el parental se examinó también por procesando muestras tratadas y no tratadas en SDS-PAGE. En resumen, las proteínas se intercambiaron de tampón a PBS y se concentraron a 1 mg/ml. Se mezclaron 25 µg de proteína con 1 µg de tripsina de calidad de secuenciación (Promega) y se incubaron durante 0 horas, 1 hora, 3 horas y 24 horas a 30 °C. Tras este tiempo, se bloqueó la reacción con Inhibidor de Proteasa Completo de Roche (1x) y DTT, así como se añadió un agente de carga. Las muestras se desnaturalizaron durante cinco minutos a 100 °C. Se cargaron 15 µg de cada muestra en geles Tricina Novex al 10-20% y se tiñeron las proteínas con SureBlue (1x). Los resultados se muestran en la FIG. 15. El perfil de resistencia a la tripsina del DOM15-26-593 en este experimento variaba del perfil mostrado por el experimento BIAcore sugiriendo que las diferencias en las condiciones de reacción pueden tener influencia en el resultado final de la escisión por la tripsina. Sin embargo, el DOM15-26-593 tiene mejores propiedades biofísicas, así como afinidad, que otros clones seleccionados, como se muestra a continuación. Un sumario de las propiedades de las variantes del DOM15-26-555 también se muestra en la tabla 12 siguiente.

Tabla 12

	Atributo					
	SEC-MALLS		DSC	RBA	BIAcore	Estabilidad a tripsina
dAb	% monómero	Pm est.	Tm °C	nM	KD nM	% unión @ +24 h
15-26	0	37-136	64	10	28,2	30
15-26-501	0-40	18-290	51	1,14	9,1	5
15-26-555	0	28-78	63	11,7	26,1	10
15-26-588	10	33	70	27	59,1	15
15-26-589	90	17	63	1,94	9,6	65
15-26-591	20	21-234	63	16	38	35
15-26-593	80	17	65	0,323	3,2	80
15-26-595	60	17	65	0,828	5	70

Ejemplo 10Identificación de variantes de DOM15-10

- 5 Se analizó en más detalle el DOM15-10-11, junto con su parental el DOM15-10. Las secuencias se muestran en la FIG. 16. Se compararon los dAb en el BIAcore en cuanto a su unión con hVEGF a la concentración de dAb de 100 nM tras la incubación de tripsina a una concentración de 200 µg/ml. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora, 3 horas y 24 horas a 37 °C con agitado (250 rpm). Los rastros BIAcore de estos dAb se muestran en la FIG. 17. El resultado muestra claramente que la variante seleccionada es más resistente que el parental a la proteólisis tras 24 horas de tratamiento con tripsina.

La resistencia a la tripsina del candidato y el parental también se examinó procesando muestras tratadas y sin tratar en SDS-PAGE. En resumen, las proteínas se intercambiaron de tampón a PBS y una concentración de 1 mg/ml. Se mezclaron 25 µg de proteína con 1 µg de tripsina de calidad de secuenciación (Promega) y se incubó durante 0 horas, 1 hora, 3 horas y 24 horas a 30 °C. Tras este tiempo, la reacción se bloquea con el inhibidor de Proteasa completo de Roche (1x) y DTT, así como se añadió agente de carga. Las muestras se desnaturalizaron durante cinco minutos a 100 °C. Se cargaron 15 µg de cada muestra en geles Tricina Novex al 10-20% y se tiñeron las proteínas con SureBlue (1x). Los resultados se presentan en la FIG.18. En este caso, el perfil resistente a la tripsina se correlaciona bien con el ensayo de tripsina BIAcore, mostrando que la actividad refleja directamente la integridad de la proteína.

Ejemplo 11Caracterización posterior de las variantes DOM15-26-555 y DOM15-10

Los dAb se analizaron utilizando Calorimetría de exploración diferencial (DSC) para determinar si el aumento en la resistencia a la tripsina se correlacionaba con un aumento en la Tm. Los resultados se muestran en la Tabla 13. Hay una correlación entre la resistencia a la tripsina de las variantes DOM15-26-555 y la temperatura de fusión. El candidato DOM15-26-588 y DOM15-26-593 presentaban una Tm mejorada, pero los otros clones no. Hay que señalar que tanto las moléculas parentales DOM15-26-555 y DOM15-10 tienen una Tm mucho mayor al inicio (63,3-63,7 °C) que las moléculas parentales DOM4-130-54 y DOM1h-131-511 (Tm al inicio: 57,9-54,1 °C), pero el total de clones resistentes a la proteasa alcanzan una Tm en un intervalo similar (media de Tm de 65,1 °C para las variantes de DOM1h-131-511/DOM4-130-54 y una Tm media de 64,9 °C para las variantes DOM15-26-55/DOM15-10).

Tabla 13

Nombre	Tm °C
DOM15-26-555	63,3
DOM15-26-588	70,1
DOM15-26-589	63
DOM15-26-591	63

(continuación)

Nombre	T _m °C
DOM15-26-593	65
DOM15-10	63,7
DOM15-10-11	63,3

5 Los dAb se compararon también en un ensayo de unión al receptor y se midieron las cinéticas del BIAcore para determinar si el aumento en estabilidad a la tripsina había dado lugar a un descenso de la eficacia. Sin embargo, la actividad de los dAb en el ensayo no se afectaba sustancialmente o incluso había mejorado. Los resultados se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14

ID Clon	CE ₅₀ (nM)	K _D (nM)
DOM15-26-555	11,7	26,1
DOM15-26-588	27	59,1
DOM15-26-589	1,94	9,6
DOM15-26-591	16	38
DOM15-26-593	0,323	3,2
DOM15-26-594	4,09	15,1
DOM15-26-595	0,828	5
DOM15-10	10,23	23,6
DOM15-10-11	3,58	14,6

Ventajas de un aumento de la T_m

10 La mayoría de las proteínas - incluyendo los dominios de anticuerpo - existe en dos estados: un estado plegado (que da lugar a una molécula biológicamente activa) y estado sin plegar (que no presenta actividad funcional). Estos dos estados co-existen a todas las temperaturas y la proporción relativa de cada estado se determina habitualmente por una constante K que es una función de las constantes cinéticas de plegamiento y no plegamiento. La temperatura de fusión se define habitualmente como la temperatura al que K = 1, es decir, la temperatura a la que la fracción de proteína plegada es igual a la fracción de proteína no plegada. La constante K se determina por interacciones de estabilización y desestabilización molecular de una proteína y por lo tanto se determina primariamente por la secuencia de aminoácidos de la proteína. Los parámetros extrínsecos tales como temperatura, pH, composición del tampón, presión tienen influencia sobre la K y por lo tanto sobre la temperatura de fusión.

15 Las proteínas no plegadas son dianas fáciles para los mecanismos de degradación: (i) por exposición de los enlaces disulfuro que aumenta el riesgo de oxidación o reducción dependiendo de las circunstancias, (ii) por aumento de la flexibilidad del armazón lo que favorece las reacciones auto-proteolíticas, (iii) por la exposición de segmentos peptídicos que ofrecen dianas a las proteasas *in vivo*, a proteasas durante los procesos de producción y a portar proteasas durante el proceso corriente abajo y el almacenamiento a largo plazo, y (iv) por exposición de segmentos propensos a la agregación que da lugar a una agregación molecular de Winter y precipitación de las proteínas. En todos los casos, se produce una pérdida de la integridad proteica, contenido proteico y actividad proteica, que por lo tanto comprometen los esfuerzos para (i) asegurar la reproducibilidad de un lote, (ii) asegurar la estabilidad a largo plazo en el almacén, y (iii) la eficacia *in vivo*.

20 En la naturaleza, las proteínas se han diseñado por evolución para actuar adecuadamente a temperatura corporal y para ser remplazadas fácilmente por los mecanismos homeostáticos. Las proteínas terapéuticas fabricadas por medio de procesos biotecnológicos hacen frente a un ambiente diferente: frecuentemente se producen por tecnología de ADN recombinante en un huésped ajeno, se expresan en altas cantidades en grandes matraces, se someten a cambios muy importantes de pH o de composición tampón a lo largo de los procesos corriente abajo y finalmente se almacenan a altas concentraciones en tampones no fisiológicos durante un periodo de tiempo prolongado. Las nuevas técnicas de suministro (por ejemplo, inhalación, parche sc, nanopartículas de suministro lento) también se añaden a la presión sufrida por las proteínas terapéuticas. Debido a que la mayoría de técnicas de

modificación están basadas en técnicas *in vitro* con el objetivo de alterar o crear nuevas secuencias de aminoácidos, no tienen lugar los procesos de evolución que han mejorado gradualmente las proteínas biológicas, dando como resultado, por lo tanto, proteínas de actuaciones sub-óptimas con respecto a la resistencia a las presiones.

- La técnica de la presente invención tiene como objetivo reproducir una de las condiciones afrontadas por las proteínas a lo largo de la evolución Darwiniana. Los péptidos y polipéptidos, por ejemplo, los dominios variables únicos de inmunoglobulina se infunden con proteasas que tienen un papel principal en la remodelación de tejidos y en la homeostasis proteica. Cualquier mutación particular que puede dar como resultado una proteína con un ajuste mejorado a su función se ensaya también en cuanto a su capacidad para ajustarse en el ambiente y su actuación en él. Este proceso se reproduce en una realización de la presente invención: se crea un repertorio de variantes de péptido o polipéptido y se expone a una proteasa. En una segunda etapa, el repertorio de variantes se pone en contacto con una diana específica. Solo las variantes de proteína que tienen una degradación sostenida por la proteasa serán capaces de relacionarse con la diana y por lo tanto recuperarse, por ejemplo, por un simple proceso de purificación llamado "biopanning". El sistema ofrece varias ventajas en comparación con los procesos *in vivo*: el repertorio de proteínas puede hacer frente a un amplio intervalo de condiciones, por ejemplo una variedad de proteasas, a altas concentraciones, durante tiempos más largos, en tampones o pH diferentes y a diferentes temperaturas. Por lo tanto, esta tecnología *in vitro*, ofrece un medio para diseñar proteínas que pueden actuar y permanecer estables en un intervalo de medios más amplio que en el que se originaron. Claramente esto ofrece múltiples ventajas para la industria biotecnológica y en el área de las proteínas terapéuticas en particular.

Ejemplo 12: Correlación de datos de PK para candidatos resistentes a proteasa

- El dAb parental y un dAb resistente a proteasas en cada una de los cuatro linajes de dAb, se evaluaron más *in vivo* (véase la Tabla 15 a continuación para la lista y los detalles).

Tabla 15

Linaje	ID dAb	Resistencia a tripsina	Tm (°C)	Actividad (nM)	ID como fusión Fc
DOM4-130	DOM4-130-54	Buena	54	0,128*	DMS1541
	DOM4-130-202	Muy alta	64	0,160*	DMS1542
DOM1h-131	DOM1h-131-511	Buena	57	0,048†	DMS1543
	DOM1h-131-206	Muy alta	64	0,047†	DMS1544
DOM15-10	DOM15-10	Baja	64	0,913†	DMS1546
	DOM15-10-11	Alta	63	0,577†	DMS1531
DOM15-26	DOM15-26-501(*)	Baja	52	0,330†	DMS1545
	DOM 15-26-593	Alta	65	0,033†	DMS1529

*: como se determina por un bioensayo MRC5/IL-a; †: como se determina por ensayo RBA

Nota: DOM15-26-501 es una versión parental del DOM15-26-555 ejemplificada anteriormente en la presente solicitud. DOM15-26-555 tiene una mutación de aminoácidos de la línea germinal en CDR1 (I34M). DOM15-26-501 tiene una temperatura de fusión más baja que DOM15-26-555 (52 °C v 63,3 °C) y un aumento de susceptibilidad a la digestión con tripsina. DOM15-26-501 se escogió sobre el DOM15-26-555 para el estudio farmacocinético que es el más representativo de baja estabilidad en comparación con DOM15-26-593.

Se puede traducir la resistencia de la siguiente manera:

- 1 es baja
2 es moderada
3 es buena
4 es alta
5 es muy alta

- Entonces esto significa que la resistencia a la tripsina de la molécula parental es:

DOM4-130-54	es	Buena
DOM1h-131-511	es	Buena
DOM15-10	es	Baja
DOM15-26-501	es	Baja

Y para los candidatos seleccionados:

DOM4-130-202	es	Muy alta
DOM1h-131-206	es	Muy alta
DOM15-10-11	es	Alta
DOM 15-26-593	es	Alta

Debido a que los dominios de anticuerpo son de pequeño tamaño (12-15 kDa) se aclaran rápidamente de la circulación con la inyección iv o sc. Además de que el límite de la filtración glomerular renal es por encima de 50 kDa y por lo tanto las pequeñas proteínas tales como los dAb no se retienen en la circulación cuando pasan a través de los riñones. Por lo tanto, con el fin de evaluar los efectos a largo plazo de la resistencia a las proteasas *in vivo*, lo inventores marcaron los dominios de anticuerpo con un resto para aumentar su residencia sistémica. Se han comunicado en la bibliografía varias estrategias (por ejemplo, PEG, fusiones con Fc, fusiones con albúmina, etc.) con el objetivo de extender la semivida. En esta solicitud los dominios de anticuerpo se han marcado (o formateado) con la porción Fc del anticuerpo IgG1 humano. Este formato ofrece dos ventajas: (i) el tamaño molecular del dAb-Fc resultante es ~ 75 kDa que es lo suficientemente grande para asegurar su retención en la circulación, (ii) el resto Fc de anticuerpo se une al receptor FcRn (también conocido como receptor "Brambell"). Este receptor se localiza en las células epiteliales, células endoteliales y hepatocitos y está implicado en la prolongación del periodo de vida de anticuerpos y albúmina: además con la pinocitosis de los anticuerpos y otras proteínas del suero, las proteínas se dirigen al endosoma ácido en donde el receptor FcRn intercepta los anticuerpos (por medio de la unión a la porción Fc) antes del tránsito al endosoma y la vuelta de estas a la circulación. Por lo tanto, marcando la porción Fc del dAb, se asegura que los dAb estarán expuestos durante un largo periodo a al menos dos compartimentos - el suero y los compartimentos pre-endosómicos, cada uno de los cuales contienen un grupo específico de enzimas proteolíticas. Además, el receptor FcRn media en la transcitosis de manera que las proteínas que llevan Fc migran de y hacia el espacio extravascular.

El formateo con Fc se conseguía fusionando el gen que codifica la VH y VK de dAb al gen que codifica el Fc de IgG1 humano, por medio de un engarce peptídico interventor corto (en negrita):

Para un dAb VH (subrayado):

EVQ.....GQGT^{LVTVSSASTHTCPPCPAPELLG}GP...(hlgG1Fc).. PGK*

Para un dAb VK (subrayado):

DIQ..... GQGTKVEIKRTVAAP**STHTCPPCPAPELLG**GP..**(hlgG1Fc)....PGK***

El material se produjo por transfección transitoria de células HEK293/6E utilizando 293-fectin (Invitrogen) de acuerdo con protocolos de referencia. Estas células se diseñaron para expresión transitoria de alto nivel cuando se utilizan en conjunción con la serie de vectores pTT (Durocher y col 2002). Por lo tanto los genes dAb se clonaron en un vector pTT5 modificado (pDOM38) para generar el vector de expresión de fusión Fc (véase la Figura 21). Se recolectó el sobrenadante de las células transfectadas a los 5 días tras la transfección, se clarificó por centrifugación y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. Las proteínas de fusión dAb-Fc se purificaron por captura en una resina de corriente sin turbulencia de proteína A. Se eluyó la proteína de la columna en 10 mM de citrato sódico pH 3, seguido por la adición de citrato sódico 1 M pH 6, para conseguir una composición final de 100 mM de citrato sódico pH 6.

Las moléculas dAb-Fc se ensayaron en cuanto a la semivida *in vivo* en la rata a una dosis diana de 5 mg/kg en ratas Sprague-Dawley hembras (n = 3 por grupo). Se debería señalar que la dosis diana excede mucho la concentración diana en ratas, por lo que se espera que las diferencias en afinidad entre los dAb parentales y los dAb resistentes a la tripsina (véase el ejemplo 11) no tendrán impacto sobre el destino de las moléculas *in vivo*. Por lo tanto las diferencias en los perfiles PK entre dAb se espera que reflejen un proceso de eliminación independiente del antígeno.

Se tomaron muestras de sangre tras 0,03, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 y 168 horas tras la administración. Tras la formación del coágulo, se retiró el suero y se ensayó luego en ensayo de captura con antígeno hIL-1R1, TNFR1 o VEGF:

Ensayos de captura con antígeno hIL-1R1:

Revestimiento con 4 µg/ml de anti-hIL-1R1
Bloqueo
Adición de 500 ng/ml shIL-1R1
Adición de muestras
Detección con anti-Fc humano HRP @ 1:10.000

Ensayos de captura con antígeno TNFR1:

Revestimiento con 0,1 ug/ml de sTNFR1
 Bloqueo
 Adición de muestras
 Detección con anti-Fc humano HRP @ 1:10.000

5 Ensayos de captura con antígeno VEGF:

Revestimiento con 0,25 ug/ml de VEGF
 Bloqueo
 Adición de muestras
 Detección con anti-Fc humano HARP @ 1:10.000

- 10 Los datos brutos de los ensayos se convirtieron en concentraciones de fármacos en cada muestra de suero. Los valores de la media en $\mu\text{g/ml}$ en cada punto de tiempo se analizaron entonces en WinNonLin utilizando un análisis no compartimental (NCA). Los perfiles PK de cada par dAb-Fc se muestran en la Tabla 16 que resume los parámetros PK determinados.

Tabla 16

ID	dAb	Semivida (h)	AUC/D (0-inf) ($\text{h} \cdot \text{mg/ml}$)/(mg/kg)	% AUC Extrapolada
DMS 1541	4-130-54	93,2	691,5	22,7
DMS1542	4-130-202	176,8	710,1	49
DMS1543	1h-131-511	140,8	1807,5	40
DMS1544	1h-131-206	158,6	2173,0	43,6
DMS1546	15-10	43,2	324,6	3,8
DMS1531	15-10-11	56,6	770,5	n.d.
DMS1545	15-26-501	12,9	89	5,1
DMS1529	15-26-593	86,2	804,7	21,0

- 15 Los resultados indican claramente que -mientras que los perfiles PK de los pares dAb-Fc 4-130-54 a 1h-131-206 casi se superponen - los perfiles varían ampliamente con otros pares. Los efectos se ven sobre todo cuando se considera el AUC/D: el AUC/D de 15-10 es solamente del 42% del de 15-10-11. El AUC/D de 15-26-501 es solo el 11% del de 15-26-593. Estas importantes diferencias también tienen un impacto (aunque en menor extensión) sobre las semividas: de 43,2 h frente a 56,6 h para el 15-10 y 15-10-11, respectivamente. Una diferencia mayor se aprecia con el linaje de DOM15-26: de 12,9 h frente a 86,2 h para el 15-26-501 y 15-26-593, respectivamente. Además para un buen análisis PK utilizando un análisis no compartimental, se deberían utilizar al menos 4 puntos de datos para ajustar la pendiente de regresión lineal y el periodo de tiempo durante el que se estima la semivida debería ser de al menos 3 veces el de la semivida calculada.

- 25 A la luz de las propiedades biofísicas descritas en los ejemplos del presente documento, parece que la capacidad de algunos dAb determinados para resistir la degradación por tripsina se correlaciona con la capacidad de la fusión dAb-Fc para circular durante un periodo más largo en el suero de la rata. Además como se muestra en los ejemplos, tales como en el ejemplo 10, DOM15-10 y DOM15-26-501 son los dAb más degradables: la incubación de 25 μg de dAb en presencia de 1 μg de tripsina a 30 °C durante ~ 3 h daba como resultado una degradación completa. Todos los demás dAb de este estudio (tanto si se han seleccionado con tripsina (es decir, DOM15-10-11, DOM15-26-593, DOM4-130-202 y DOM1h-131-206) como si ya tenían alguna resistencia a la tripsina como moléculas parentales (DOM4-130-54 y DOM1h-131-511)) tienen un perfil PK comparable en ratas cuando se re-formatean en moléculas dAb-Fc. Por lo tanto el presente estudio PK sugiere que la susceptibilidad a la proteólisis tiene su mayor impacto en la estabilidad *in vivo* de los dAb cuando los dAb tienen una resistencia muy baja a la proteólisis. También se muestra que - a partir de un cierto nivel - no se añaden significativamente aumentos en la resistencia a la degradación por la tripsina (por ejemplo en DOM4-130-206 y DOM4-130-54) en la capacidad de la molécula dAb-Fc de eliminación más lenta *in vivo*.

- 40 En tres casos, la selección en presencia de tripsina da como resultado nuevas moléculas con un aumento de la estabilidad térmica (que se define por la temperatura de fusión): DOM4-130-202, DOM1h-131-206 y DOM15-26-593. El estudio PK indica que - en el grupo de datos presente - la temperatura de fusión no es un parámetro adecuado para racionalizar los perfiles PK observados: de hecho el DOM15-10 tiene una T_m que DOM15-10-11 y sin embargo se aclara más rápidamente que DOM15-10-11 de la circulación. Por otro lado, los dos dAb del linaje DOM4-130 tienen una T_m marcadamente diferentes (aproximadamente 10 °C) y sin embargo muestran una estabilidad *in vivo* casi idéntica cuando se formatean como moléculas dAb-Fc. Se debería señalar que la temperatura de fusión no se

excluye per se como un parámetro clave para predecir la estabilidad *in vivo*. Lo que pasa es solo que con el grupo de datos presente, grandes diferencias en la T_m (de 54 °C y mayores) no tienen un impacto significativo en el destino de los dAb *in vivo*. Esto no excluye la posibilidad de que a una temperatura de fusión por debajo de 54 °C, la estabilidad *in vivo* pueda correlacionarse con la estabilidad térmica, o quizá incluso con la estabilidad térmica y la resistencia a las proteasas en conjunto.

Ejemplo 13

Selecciones con tripsina en DOM10-53-474

Estabilidad en tripsina del DOM10-53-474 purificado:

El DOM10-53-474 es un dominio de anticuerpo que se une a la IL-13 con alta potencia. Para evaluar la estabilidad de este dAb en presencia de tripsina, se digirió el dAb purificado con tripsina durante puntos de tiempo más largos y se ejecutó sobre un gel para examinar cualquier posible degradación. Se incubaron 25 µl de DOM10-53-474 purificado a 1 mg/ml con 1 µl de tripsina de calidad de secuenciación a 1 mg/ml a 30 °C, que daba como resultado una relación molecular de 25:1 dAb:tripsina. Se incubó el dAb con tripsina durante 1 h, 4 h y 24 h y se neutralizó la actividad de la proteasa por adición de 4 µl de inhibidor de proteasa completo de Roche seguido por incubación en hielo. La muestra de tiempo 0 se hizo añadiendo los inhibidores de proteasa al dAb sin añadir tripsina. Se analizaron posteriormente 2 µl de la muestra por electroforesis utilizando un Labchip de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La figura 22 muestra el progreso en gel con DOM10-53-474 incubado con tripsina durante puntos de tiempo más largos. Para comparar, se ejecutó al lado uno de los dAb estables en tripsina, DOM15-26-593 que también se trató con tripsina como se ha explicado anteriormente. Como se muestra en la figura, el DOM15-26-593 parece estable incluso tras 24 h de incubación con tripsina. Sin embargo, el DOM10-53-474 se degrada en cierto grado tras 24 h, pero que se aprecia estable en los puntos de tiempo de 1 h y 4 h. Estos datos sugieren que el DOM10-53-474 es resistente a la degradación por tripsina hasta cierto punto, pero no es tan estable como uno de los dAb más estables en tripsina el DOM10-53-593.

Estabilidad en tripsina del DOM10-53-474 presentado en fago

Para evaluar la estabilidad en tripsina del DOM10-53-474 presentado en fago, se clonó el gen que codifica el DOM10-53-474 en los sitios *Sal/Not* de pDOM33 (Fig. 50) y el fago se produjo de acuerdo con las técnicas de referencia. Se purificó el fago por precipitación en PEG, se resuspendió en PBS y se tituló.

Los dAb presentados en fagos se incubaron en tripsina durante puntos de tiempo diferentes para evaluar la resistencia a la tripsina. Después de la incubación con tripsina, se midió la estabilidad por análisis de títulos tras la infección de células *E. coli* TG1 en crecimiento exponencial

Se incubaron 100 µg/ml de tripsina durante 1 h, 2 h, 4 h y una noche a 37 °C, en una incubadora con agitado. Se bloqueó la actividad de la tripsina con inhibidor de proteasa completo de Roche (x2) y luego se diluyó en un 2% de marvel en PBS, se incubó con 10 nM de IL-13 biotinilada durante una hora a temperatura ambiente. Se añadieron perlas revestidas de estreptavidina (Dynabeads M-280 (Invitrogen)) que habían sido pre-bloqueadas durante una hora a temperatura ambiente con un 2% de marvel en PBS, y la mezcla se incubó entonces durante 5 minutos a temperatura ambiente. Todas las etapas de incubación con Dynabeads se llevaron a cabo en una rueda rotatoria. Los fagos no unidos se lavaron lavando las perlas ocho veces con 1 ml de 0,1% de Tween-20 en PBS. Los fagos unidos se eluyeron con 0,5 ml de Glicina 0,1 M pH 2,2 y se neutralizaron con 100 µl de Tris-HCl 1 M pH 8,0. El fago eluido se utilizó para infectar TG1 en crecimiento exponencial (1 h a 37 °C) y se colocaron en placas de tetraciclina. Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche y se hizo el recuento de las colonias. Los títulos de los fagos resultantes tras la digestión con tripsina se resume en la Tabla 17. Los títulos de fagos disminuían cuando se incubaban con tripsina durante puntos de tiempo prologando. Tras 24 h de incubación todos los fagos estaban digeridos.

Tabla 17

Longitud de incubación en tripsina	Concentración de tripsina	Título
Control sin tripsina	-	3×10^7
1h	100 mg/ml	1×10^7
2h	100 mg/ml	7×10^6
4h	100 mg/ml	5×10^6
Una noche	100 mg/ml	0

Selección de dAb más resistentes a la tripsina:

Con el fin de seleccionar los dAb que son más resistentes a la degradación por la tripsina, se introdujeron mutaciones aleatorias en el gen que codifica el DOM10-53-474 por PCR utilizando el kit Mutazyme 11 de Stratagene, cebadores biotinilados y 5-50 pg de matriz para 50 µl de reacción. Tras la digestión con *Sa*I y *Not*I, se purificaron las inserciones de productos no digeridos con perlas revestidas de estreptavidina y se ligaron en el pDOM33 en los sitios correspondientes. Se transformaron las células de *E. coli* TB1 con la mezcla de unión purificada que daba como resultado una biblioteca propensa a error de DOM10-53-474. El tamaño de la biblioteca era de $1,9 \times 10^9$ y la tasa de mutación de aminoácidos era de 1,3.

Se llevaron a cabo tres rondas de selección con esta biblioteca para seleccionar dAb con una resistencia a la proteasas mejorada. La primera ronda de selección se llevó a cabo solo con el antígeno sin tratamiento con tripsina para limpiar la biblioteca para eliminar cualquiera de los clones que no se unieron al antígeno con alta afinidad. La selección se llevó a cabo a 10 nM de IL-13. Los resultados de la ronda uno eran de 2×10^9 en comparación con los fagos de entrada de 6×10^{10} indicando que la mayoría de la biblioteca se unía al antígeno con alta afinidad.

La segunda y tercera rondas de selección se llevaron a cabo con 1 nM de IL-13 biotinilada. Antes del ensayo de selección en IL-13, se incubaron los fagos con 100 µg/ml de tripsina a 37 °C en un agitador (250 rpm). Para la segunda ronda de selección, la incubación en tripsina se llevó a cabo durante 1 h o bien a temperatura ambiente o a 37 °C. Los resultados de la ronda 2 de selección se muestran en la Tabla 18:

Tabla 18. Resultado de los títulos de fagos después de la segunda ronda de selección

Tratamiento con tripsina	Título
Sin tratamiento	1×10^8
1 h a temperatura ambiente	5×10^7
1 h a 37°C	2×10^7

Los resultados de los fagos de la ronda 2 de selección con tratamiento con tripsina durante 1 h a 37 °C se utilizaron como entrada de la 3ª ronda de selección. Para la 3ª ronda de selección, se trataron los fagos con 100 µg/ml de tripsina pero por puntos de tiempo más largos: 2 h a 37 °C, 4 h a 37 °C, una noche a temperatura ambiente o una noche a 37 °C. Los títulos de fagos de la 3ª ronda de selección se resumen en la Tabla 19:

Tabla 19: Resultados de títulos de fagos después de la tercera ronda de selección

Tratamiento con tripsina	Título
Sin tripsina	$1,3 \times 10^8$
2 h at 37 °C	$1,9 \times 10^7$
4 h at 37 °C	2×10^6
Una noche a temperatura ambiente	4×10^7
Una noche a 37 °C	$2,1 \times 10^6$

Se secuenciaron varios clones de cada resultado de las rondas 1, 2 y 3 para evaluar la diversidad de secuencias. Después de la primera ronda de selección sin tratamiento con tripsina, el 50% de los resultados de selección tenían la secuencia parental DOM10-53-474. Tras la 2ª ronda de selección, el porcentaje del parental aumentaba al 70%. Tras la 3ª ronda de selección, el porcentaje del parental aumentó hasta un 80%.

Estos datos indican que el DOM10-53-474 ya es resistente a la degradación con tripsina y no se seleccionaron muchos nuevos clones de estas selecciones con tripsina. La Figura 22 mostraba que mientras la proteína purificada se digiere con tripsina, el DOM10-53-474 no se digería completamente incluso tras un tratamiento con tripsina durante una noche. Sin embargo, para ver si hay algunos nuevos clones que son más resistentes a la tripsina que el DOM10-53-474 en los resultados de la selección, el resultado de la selección 3 en la que el fago se trataba durante una noche con tripsina a 37 °C se subclonó en DOM5. Se secuenciaron entonces cien clones para buscar cualquier clon resistente a la tripsina. De los cien clones analizados, solamente 26 clones tenían nuevas secuencias, sin embargo, ninguno de estos clones tenían mutaciones en los sitios de escisión de la tripsina (lisina o arginina) sugiriendo que estos clones no eran más resistentes a la tripsina que el DOM10-53-474.

Ejemplo 14

Almacenamiento y mejoras biofísicas introducidas en los dAb candidatos DO0101 (anti-TNFR1) por selecciones de fagos en presencia de tripsina:

Para mejorar la resistencia a la proteasa de la molécula candidata DOM1h-131-511, se llevaron a cabo selecciones de fagos en presencia de tripsina como se ha descrito anteriormente. El procedimiento producía una variedad de clones con estabilidad en tripsina mejorada en comparación con la molécula parental DOM1h-131-511. Se seleccionaron dos clones, DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 para posterior caracterización ya que mostraban la mejoría más significativa a la acción de la tripsina. Otras operaciones que se perfilan posteriormente muestran que con la resistencia mejorada a la acción de la tripsina hay otros efectos beneficiosos, primariamente en la estabilidad de las moléculas a la presión por cizalladura y térmica. Estos dos parámetros son centrales para aumentar la estabilidad de almacenamiento y la vida de almacén de los productos biofarmacéuticos.

Producción de dAb del candidato DOM0101 en *Pichia pastoris*:

Los genes que codifican la secuencia de aminoácidos primaria de las tres moléculas candidatas se utilizaron para producir la proteína segregada en *Pichia pastoris*. Los tres genes sintéticos (DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206) se clonaron en el vector de expresión pPIC-Z α y luego se transformaron en dos cepas de *Pichia*, X33 y KM71H. Las células transformadas se colocaron en placas en concentraciones crecientes de Zeocina (100, 300, 600, y 900 μ g/ml) para seleccionar clones con múltiples integrantes. Se segregaban entonces varios clones en matraces de 2 l para identificar las líneas celulares de alta expresión. Los mejores clones de expresión se utilizaron entonces para producir material en fermentadores a una escala de 5 l.

Purificación de proteínas y caracterización del material:

Con el fin de producir un material de alta calidad para estudios posteriores de caracterización y estabilidad, se pensó en un proceso de purificación corriente abajo utilizando una resina de inducción de carga modal mezclada (Capto MMC) como primera etapa de captura seguida por un intercambio aniónico (Sepharaose Q). Sin una optimización significativa, esto permitió la recuperación de ~ 70% de dAb expresado con una pureza de ~ 95%. El material se caracterizó en cuanto a la identidad utilizando espectrometría de masas con electropulverización, secuenciación del extremo amino y enfoque isoelectrico y en cuanto a la pureza utilizando SDS-PAGE y SEC (cromatografía de exclusión por tamaño).

Identidad de las proteínas:

El análisis de la secuencia del extremo amino de los cinco primeros restos de cada proteínas, era como se esperaba (EVQLL...). Se llevó a cabo la espectrometría de masas en las muestras de proteína que habían sido intercambiados de tampón en 50:50 H₂O:acetonitrilo que contiene un 0,1% de ácido acético glacial utilizando puntas C4 Zip (Millipore). La masa medida de cada una de las tres proteínas era de 0,5 Da de la masa teórica basada en la secuencia de aminoácidos primaria (calculado utilizando las masas medias) cuando se permite una diferencia de masas de -2 por la formación de enlaces disulfuro internos. Se utilizó el IEF para identificar las proteínas basándose en su pI que era diferente en cada proteína.

Pureza proteica:

Se cargaron las tres proteínas en geles de SDS-PAGE sin reducción en cantidades de 1 μ g y 10 μ g por duplicado. Se observó una banda sencilla en todos los casos.

Se llevó a cabo también la cromatografía de exclusión por tamaño para demostrar los niveles de pureza. Para la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se cargaron 100 μ g de cada proteína en una columna G2000 SWXL TOSOH con un flujo de 0,5 ml/min. La fase móvil era PBS/10% de etanol. El porcentaje de monómeros se midió basándose en el área bajo la curva (véase la Fig. 23).

Comparación de la estabilidad de DOM1h-131-511, -202 y -206

Evaluación de la estabilidad en proteasa:

Se evaluó la estabilidad en proteasa de DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 por análisis BIAcore™ de la actividad de unión residual tras la pre-incubación durante puntos de tiempo definidos en exceso de proteasas. Se revistió con aproximadamente 1400 UR de TNFR1 biotinilado un chip de estreptavidina (SA). Se incubaron 250 nM de DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 con PBS solo o con 100 μ g/ml de tripsina, elastasa o leucocima durante 1, 3, y 24 horas a 30 °C. La reacción se paró con la adición de un cóctel de inhibidores de proteasa. Las mezclas dAb/proteasa se pasaron entonces sobre el chip revestido de TNFR1 utilizando una sustracción celular de referencia. La superficie del chip se regeneró con 10 μ l de glicina 0,1 M a pH 2,2 entre cada ciclo de inyección. La fracción de DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 que se une al TNFR1 (a los 10 seg) pre-incubada con proteasas se determinó con respecto a los experimentos de unión de dAb sin proteasas. Las ejecuciones con el BIAcore™ se llevaron a cabo a 25 °C. Los datos posteriores se produjeron de tres

experimentos independientes. El gráfico de barras indica los valores medios y las barras de error indican la desviación estándar de los resultados (Figura 24).

Se encontró que el DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 mostraban tener una resistencia mayor a la degradación proteolítica de la tripsina, elastasa o leucosima en comparación con el DOM1h-131-511. La diferencia entre DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 en comparación con el DOM1h-131-511 es más pronunciada tras 1 h con tripsina y tras 3 h con elastasa o leucosima. Hay una tendencia que el DOM1h-131-206 es ligeramente más estable en comparación con el DOM1h-131-202 en la mayoría de las condiciones ensayadas.

Estabilidad térmica de los dAb según se determina utilizando DSC:

Con el fin de determinar a qué pH tienen mayor estabilidad las moléculas candidatas, se utilizó una calorimetría de exploración diferencial (DSC) para medir las temperaturas de fusión (T_m) de cada dAb en tampón de Britton-Robinson. Como el Britton-Robinson está compuesto por tres sistemas de componentes tampón (40 mM de cada uno de los ácidos acético, fosfórico y bórico), es posible producir un intervalo de pH de 3 - 10 en la misma solución. Se determinó el pl teórico a partir de las secuencias de aminoácidos de las proteínas. A partir del DSC, el pH al que los dAb tienen su estabilidad térmica intrínseca mayor se encontró que era a pH 7 para el DOM1h-131-202, pH 7-7,5 para el DOM1h-131-206 y un pH de 7,5 para el DOM1h-131-511. Para todos los trabajos de estabilidad y presión posteriores se utilizaron los siguientes pH para cada dAb: para DOM1h-131-202 y GSK1995057A DOM1h-131-206 un pH de 7,0 y para DOM1h-131-511 un pH de 7,5 en tampón de Britton-Robinson. Los resultados se resumen en la Tabla 20.

Tabla 20: Resumen del pH y T_m de DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 y DOM1h-131-511 según se determina por DSC en tampón de Britton-Robinson a 1 mg/ml. La temperatura se inclina a 180 °C/hora.

dAb	pH que da la mayor estabilidad térmica intrínseca	T_m (°C) del dAb al pH determinado
DOM1h-131-202	7,0	68,6
DOM1h-131-206	7,0-7,5	65,8
DOM1h-131-511	7,5	58,0

Ensayo de la estabilidad térmica de dos semanas

La capacidad de una proteína para resistir periodos prolongados de tiempo a temperaturas elevadas es una buena indicación de su estabilidad. Bajo estas condiciones, la proteínas se puede someter a varios procesos físicos como agregación o modificación química. Los sAb (a 1 mg/ml) se incubaron a 37 y 50 °C durante 14 días en tampón Britton-Robinson. Se utilizó la SEC para determinar cuánto monómero permaneció en solución durante el periodo de 14 días (Figura 25).

En la Figura 25 se puede ver que tanto DOM1h-131-202 como DOM1h-131-206 son significativamente más estables que el DOM1h-131-511 a la presión térmica. La exposición de las proteínas a temperaturas elevadas, tal como 37 y 50 °C, se utilizan de manera rutinaria para dar una indicación de la vida en almacén a largo plazo de un fármaco. Estas altas temperaturas se utilizan para acelerar el proceso asociado con el almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente tal como la desamidación, oxidación o agregación. El nivel de formación de agregación en solución se puede controlar utilizando SEC (Figura 26A a I). Tras 14 días a 37 °C, la pérdida de DOM1h-131-511 de la solución se puede atribuir tanto a precipitación como a la formación de agregados de orden mayor como se determina por SEC (Figura 26B). Una pérdida de proteína significativamente menor se ve también en DOM1h-131-202 y GSK1995057A DOM1h-131-206 a 37 °C tras 14 días con muy poco o ningún aumento en la formación de agregado, especialmente en el caso de DOM1h-131-206 (Figura 26H). A 50 °C, la diferencia entre las moléculas es incluso más pronunciada, en que el DOM1h-131-206 muestra una estabilidad mejor a la temperatura más alta que el DOM1h-131-202 después de 14 días, mostrando una formación significativamente reducida de agregados de alto peso molecular (Figura 26). Con respecto al tiempo $t = 0$, el DOM1h-131-206 muestra solo un pequeño aumento de la formación de agregados tras 14 días (Figura 26I), mientras que el DOM1h-131-511 tiene toda la solución precipitada (Figura 26C).

Esto muestra que los cambios introducidos en el dAb por las selecciones con tripsina, por ejemplo, la estabilidad térmica mejorada, mejora significativamente la estabilidad de almacenamiento de la proteína a 37 y 50 °C. Tanto DOM1h-131-202 y más significativamente el DOM1h-131-206, claramente tienen una estabilidad de la solución y menor tendencia a formar agregados a temperaturas elevadas que pueden traducirse directamente en una mejor estabilidad de almacenamiento a largo plazo a temperaturas más relevantes como a +4 °C y temperatura ambiente.

Las muestras de los puntos de tiempo de 24 h, 48 h, 7 días y 14 días del experimento de presión térmica se analizaron entonces por IEF para ver si las proteínas habían sufrido cualquiera de los cambios biofísicos que afecten a la carga total de la proteína (Figura 27).

De nuevo, ambos DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 no muestran cambios significativos a 37 °C en comparación con el DOM1h-131-511. Con el DOM1h-131-511 aparece una segunda banda borrosa a 37 °C tras 24 h. Se cree que esta banda extra se debe a la dimerización de la proteína, enmascarando de esta forma la carga y produciendo dos poblaciones de moléculas. A 50 °C la diferencia entre las moléculas es más pronunciada, el DOM1h-131-206 claramente no muestra cambios significativos a temperatura elevada mientras que el DOM1h-131-202 muestra algún signo de modificación tras 24 h. La mayoría del DOM1h-131-511 se pierde por precipitación tras 48 h en Britton-Robinson.

Los puntos de tiempo T = 0, 7 y 14 días a 50 °C se analizaron por TNFR-1 RBA para determinar la funcionalidad de la proteína tras la expresión a altas temperaturas (Figura 28). El ensayo actualmente no es tan sensible como la SEC o IEF para detectar cambios sutiles en la molécula debido a la presión, pero se puede utilizar para mostrar que el dAb se sigue uniendo al antígeno.

El cambio en la curva hacia la izquierda en el DOM1h-131-511 refleja el hecho que la mayoría del dAb se perdió debido a precipitación. El material que queda en solución aún es capaz de unirse al antígeno. Como se muestra en la figura 25, la mayoría de tanto DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 son capaces de mantenerse en solución incluso después de 14 días. El RBA muestra que toda la proteína soluble aún es funcional y capaz de unirse al TNFR1.

Ensayo de estabilidad en almacenamiento a altas concentraciones de proteína:

Se llevaron a cabo experimentos para investigar la estabilidad de almacenamiento a +4 °C a concentraciones de proteínas muy altas para ver cómo actúa la molécula bajo estas condiciones. Todos los dAb candidatos se concentraron en concentradores centrífugos Vivaspin (corte a 5 K) en tampón Britton-Robinson a su pH más estable, hasta ~ 100 mg/ml. Las muestras a ~ 100 mg/ml se dejaron entonces a +4 °C durante 7 días y luego se analizaron por SEC para ver si habían ocurrido en la muestra cualquier otro cambio físico durante el almacenamiento a altas concentraciones (Figura 29). Las muestras se diluyeron a ~ 1 mg/ml antes de procesarse sobre la columna SEC en 1x PBS 10% de etanol (v/v).

A partir de los rastros de la SEC se puede ver que ni DOM1h-131-202 ni DOM1h-131-206 muestran ningún aumento en la formación de agregados tras 7 días, mientras que hay ~ 2% de reducción en la concentración de monómeros en el DOM1h-131-511.

Suministro por nebulizador de los dAb candidatos:

En los primeros estadios de los trabajos toxicológicos y clínicos, los dAb se formularán como un líquido y se suministrará por medio de un dispositivo de nebulización. Dependiendo del dispositivo (por ejemplo, ultrasónico, chorro, o membrana vibrante), el dAb experimentará un grado de presión de cizalladura y térmica cuando se nebuliza para formar un aerosol de un tamaño de partícula determinado. Como tanto DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 tienen las T_m más altas y muestran una estabilidad considerablemente mejor a la presión térmica en comparación con DOM1h-131-511, todos los dAb se ensayaron en dos dispositivos nebulizadores para ver cómo responden a la presión de cizalladura/térmica inducida durante la nebulización. Se analizaron entonces tanto la proteína del aerosol nebulizado como el dAb que permanecía en el dispositivo (es decir, en la cubeta) por SEC para determinar la cantidad de agregación que se generaba durante el proceso.

Todas las moléculas se ensayaron en tampón Britton-Robinson a su pH más estable. Los dAb se ensayaron en el E-flow Rapid (de membrana vibrante) y en Pari LC+ (nebulizador de chorro) con un tiempo de ejecución de 3,5 minutos a una concentración de 5 mg/ml y la distribución de tamaño de partícula que se determina utilizando el Spraytek de Malvern. Los resultados se muestran en la Figura 30. Para un buen suministro y distribución en la profundidad del pulmón, el tamaño de partícula ideal es < 5 µm. Todos los dAb tenían niveles comparables de tamaño de partícula que eran menores de < 5 µm en tampón Britton-Robinson. La concentración del dAb en la cubeta del dispositivo se determinó por mediciones A₂₈₀ antes y después de la nebulización (datos no mostrados). Se descubrió que la concentración de proteína no cambiaba significativamente indicando que ni la proteína ni el vehículo se han nebulizado preferentemente durante el suministro.

Las muestras de los dAb nebulizados en tampón Britton-Robinson se procesaron en la SEC para determinar si durante el suministro la proteína ha sufrido algún cambio físico. La Figura 31 muestra el porcentaje de cambio relativo en o bien la cubeta o en el aerosol según se determina por SEC. Se puede ver que tanto DOM1h-131-202 como DOM1h-131-206 sufren cambios relativamente pequeños en concentración de monómeros con respecto a DOM1h-131-511. Esto demuestra que tanto DOM1h-131-202 como DOM1h-131-206 con su T_m mejorada tienen menos propensión a agregarse durante la nebulización.

La Figura 32 muestra los rastros de la presente SEC para DOM1h-131-202 y DOM1h-131-511 en tampón Britton-Robinson tras la nebulización y demuestra que la pérdida relativa de monómeros (Figura 31) es debida a la formación de dímeros. Esto proporciona de nuevo más pruebas que apoyan la teoría de que la mayor estabilidad térmica que muestran DOM1h-131-202 y DOM1h-131-206 puede evitar una agregación significativa incluso en un tampón de formulación no optimizado.

En los trabajos de evaluación de la toxicología y seguridad, es necesario suministrar el dAb a niveles significativamente mayores en el animal que las dosis terapéuticas que se dan a los pacientes. Estos se puede conseguir solo utilizando concentraciones de proteína significativamente mayores y/o suministrando el dAb durante un periodo de tiempo muy prolongado. Como ya se ha demostrado que el DOM1h-131-511 forma agregados en la nebulización a 5 mg/ml durante 3,5 min, se ensayó el DOM1h-131-206 a 40 mg/ml en PBS y se nebulizó utilizando el Pari LC+ durante hasta 1 hora. Se tomaron muestras de la cubeta y el aerosol en puntos de tiempo a lo largo del proceso para ver si la nebulización prolongada producía que los dAb se agregaran debido a presión de cizalladura o térmica según se determinaba por SEC y la concentración de proteína (mediciones A280 nm). La tabla 21 muestra la concentración de proteína del dAb tanto en la cubeta como en el aerosol según se determina por A280.

- 10 Tabla 21: Concentración medida de proteína de DOM1h-131-206 como se determina por lecturas de absorbancia A280 tanto de la cubeta como del aerosol durante la nebulización del dAb a ~ 40 mg/ml utilizando el Pari LC+. Permitiendo los errores de dilución y el error del instrumental la concentración de la muestra no cambia tras la nebulización del dAb durante 1 h.

Tiempo (min)	Muestra de la cubeta (mg/ml)	Muestra del Aerosol (mg/ml)
1	43,8	43,4
29	44,5	43,5
59	44,6	44,1

- 15 En la Tabla 21 se puede ver que la concentración de proteína no cambia durante el proceso, lo que demuestra que no hay una pérdida significativa de la proteína debido a agregación. La Figura 33 muestra que durante el periodo de nebulización de 1 h, el DOM1h-131-206 no forma agregados de orden mayor tal como dímeros según se determinaba por SEC. Esto demuestra claramente que las propiedades biofísicas mejoradas, como se presentan en la molécula por selecciones con tripsina, aumenta significativamente la resistencia de los dAb a la presión de cizalladura y térmica y que esto se correlaciona directamente con la mejora de la vida de almacenamiento en el almacén y la capacidad para nebulizar la proteína ya que no se forman agregados de mayor orden.

Estado en solución de los dAb candidatos:

- 25 Como la vía de degradación más importante para los tres dAb candidatos parece ser la auto-asociación que da lugar inicialmente a la dimerización seguida por más agregación y en último término la precipitación, se investigaron las tres moléculas candidatas por Ultra-Centrifugación Analítica (AUC) para determinar el grado de auto-asociación. Las proteínas se investigaron por dos procedimientos, equilibrio de sedimentación y velocidad de sedimentación.

- 30 Para el procedimiento de equilibrio de sedimentación las tres muestras se procesaron en tres concentraciones diferentes que variaban entre 0,5 mg/ml a 5 mg/ml con efectos de centrifugación utilizando tres velocidades de rotor diferentes. Por este procedimiento se determinó que el DOM1h-131-511. Es un dímero estable (de 26,1-34,4 kDa), el DOM1h-131-202 tiene un equilibrio monómero/dímero (22,7-27,8 kDa) con un estado dimérico relativamente estable a las concentraciones medidas con una $K_d = 1,3 \mu\text{M}$ y el DOM1h-131-206 es predominantemente monomérico (15,4-17,9 kDa) con una K_d para el monómero a asociación en dímero de 360 μM .

- 35 Por el procedimiento de la velocidad de sedimentación todas las muestras mostraban algún grado de disociación en solución. De los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura 34, se observó un coeficiente de sedimentación para DOM1h-131-511 que es indicativo de agregados de mayor orden y el pico de cambio en la solución es una indicación de la disociación de estos agregados. La agregación de proteínas y la disociación se cancelan una a otra lo cual da la impresión de ser un dímero estable cuando se observa por equilibrio de sedimentación. Los coeficientes de sedimentación que se observan en DOM1h-131-202 indican un equilibrio dinámico rápido y por lo tanto no se podían separar los picos de monómero y dímero uno del otro, dando el único pico con un coeficiente de sedimentación más alto que el que es apropiado para la masa de la muestra. Este resultado se corresponde con el resultado obtenido por el procedimiento de equilibrio de sedimentación y la constante de disociación que se midió era de 1 μM . Se determinó que el DOM1h-131-206 era más monomérico que las otras dos muestras, que tenía un coeficiente de sedimentación de 1,9 s en comparación con el de 2,5 s para las otras dos muestras. Estos datos corresponden bien con los datos de equilibrio de sedimentación. A las concentraciones medidas, ~ 10 veces por debajo de una K_d de 360 μM , la muestra es predominantemente monomérica.

Ejemplo 15

Aumento de la potencia del dAb DOM15-26-593:

Un ejemplo del aumento de la potencia en un Ensayo de Unión al Receptor VEGFR2 del dAb DOM15-26-593 sobre el DOM 15-26 se muestra en la Figura 40. En este ensayo, la capacidad de un inhibidor potencial de la unión VEGF

a VEGFR2 se mide en un ensayo basado en una placa. En este ensayo se reviste un placa ELISA de 96 pocillos con el VEGFR2-Fc quimérico, y a esta se añade una cantidad predeterminada de VEGF que se había pre-incubado con una serie de diluciones del dAb de ensayo. Después de lavar la proteína no unida, se detecta la cantidad de VEGF unido al receptor con un anticuerpo anti-VEGF, cuyo nivel se determina colorimétricamente. Se representa un efecto de respuesta a la dosis como el porcentaje de inhibición de unión de VEGF en función de la concentración de la sustancia de ensayo. Un inhibidor eficaz es, por lo tanto, el que demuestra un bloqueo sustancial de unión al ligando a bajas concentraciones.

Potencia y semivida de las fusiones con Fc:

El potencial terapéutico del bloqueo de VEGF en el tratamiento de tumores se ha conocido desde hace más de 30 años. La naturaleza crónica del cáncer dicta que los biofarmacéuticos necesiten una semivida en el suero larga para mediar sus efectos, y esto no es consistente con el rápido aclaramiento de los dAb libres de la circulación por la filtración renal. Para evaluar la utilidad de los dAb VEGF como anti-angiogénicos para el tratamiento del cáncer, los dominios de anticuerpo candidatos se formatearon como fusiones con el Fc de IgG1 humana de tipo silvestre por medio de un engarce híbrido de manera que se forma una molécula bivalente con una semivida en el suero extendida por el uso de las rutas silvestres de anticuerpo mediadas por FcRn.

En este formato de fusión con Fc, la potencia del dAb candidato seleccionado con tripsina, DOM15-26-593 se comparó con dAb parental inicial (DOM 15-26) y el dAb lábil a tripsina (DOM15-26-501) utilizando el ensayo descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 22 a continuación:

Tabla 22. Potencia (RBA) y semivida características de candidatos DOM 15-26 en formato de fusión con Fc

dAb	Fc	Potencia (nM)	T1/2b (h)
DOM15-26	hIgG1	0,506	ND
DORM15-26-501	hIgG1	0,323	12,9
DOM 15-26-593	hIgG1	0,033	84,6

Se puede ver a partir de estos resultados que en el formato dimérico de fusión con Fc, la afinidad y la potencia están aumentadas con respecto a los dAb libres debido al efecto de avidéz. Está claro que el aumento de potencia que se obtiene en el DOM15-26-593 promedio de selección con tripsina se mantiene e incluso es más pronunciada en este formato con Fc. Además, las mejoras en estabilidad térmica y a la proteasa se traduce en cambios profundos en el comportamiento farmacocinético *in vivo* de las moléculas. La mejora en la semivida de eliminación (véase la Figura 41) de DOM15-26-593 en comparación con el DOM15-26-501 es probable que sea una consecuencia directa del aumento de estabilidad del dAb, haciéndole más resistente a los procesos de degradación que se producen en el compartimento endosómico. También se espera, por lo tanto, que los dAb con un aumento de la estabilidad a la proteasa son capaces de persistir durante más tiempo en otros compartimentos biológicos tales como el suero, superficies mucosas y varios compartimentos tisulares en donde la proteólisis es un proceso activo implicado en la pérdida de moléculas biológicas.

Perfiles farmacocinéticos de aclaramiento:

Los perfiles farmacocinéticos de aclaramiento de DOM15-26-593 y DOM15-26-501 se midieron tras la administración i.v. de DOM15-26-593 y DOM15-26-501 a 3 ratas a concentraciones de 5 mg/kg. Se midieron entonces los niveles de DOM15-26-593 y DOM15-26-501 en el suero utilizando un ensayo ELISA de referencia de unión directa al VEGF y un anticuerpo anti-Fc humano, por lo tanto solo se detectaban el fármaco intacto en las muestras de suero. El perfil farmacocinético completo se muestra en la Tabla 23 a continuación:

Tabla 23. Resumen de los parámetros farmacocinéticos de fusiones de DOM 15-26 y DOM15-26-593 con Fc en la rata

dAb	Semivida (h)	Cmax (µg/ml)	AUC (0-inf) (h*mg/ml)	Aclaramiento (ml/h/kg)
DOM 15-26-501	12,9	91,4	445,1	11,8
DOM15-26-593	84,6	101,8	3810	1,3

Se puede ver a partir de estos resultados que el DOM15-26-593 tiene un perfil farmacocinético significativamente mejorado con por ejemplo, una semivida extendida y una tasa de aclaramiento reducida.

La potencia y propiedades farmacocinéticas significativamente mejoradas del DOM15-26-593 deba como resultado el análisis del compuesto en cuanto a otros atributos biofísicos.

Propiedades en estado de solución: Análisis por SEC-MALL y AUC:

Se hicieron experimentos con el DOM15-26-593 de la siguiente manera:

5 El DOM15-26-593 se comportaba como un monómero en solución a concentraciones de hasta 2,5 mg/ml con una masa molecular calculada de 78-81 kDa, que corresponde con la masa molecular intacta calculada de aproximadamente 76 kDa (Figura 42a y 42b).

Propiedades de fusión térmica: Análisis por DSC

Se hicieron experimentos con el DOM15-26-593 de la siguiente manera:

10 El aumento de la estabilidad térmica del dAb seleccionado con tripsina (65 °C, Figura 43 panel del medio) se mantiene en la fusión con Fc (64,5 °C, Figura 43 panel superior). La curva de Tm del dAb DOM15-26-501 (52 °C, Figura 43 panel inferior) se muestran como comparación.

Estabilidad a la congelación-descongelación, presión térmica y componentes del suero

Se hicieron experimentos con el DOM15-26-593 de la siguiente manera:

15 La estabilidad de las propiedades del dAb DOM15-26-593 significa que el dAb DOM15-26-593 se puede someter a presiones físicas y biológicas con efectos mínimos en su capacidad de unirse al VEGF (Figuras 44-47 (a y b)). Por ejemplo, la molécula se puede congelar y descongelar repetidamente desde nitrógeno líquido (-196 °C) a la temperatura corporal (37 °C) durante 10 ciclos sin pérdida de actividad de unión según se determina por ELISA (Figura 44). Este tratamiento también daba como resultado en que no había alteraciones obvias del estado de agregación de la molécula, como se evaluó por cromatografía de exclusión por tamaño (Figura 45). Más ensayos demostraron que la molécula se puede colocar en un intervalo de diferentes temperaturas desde -80 °C a 55 °C con solamente una caída menor en la actividad de unión al antígeno tras 168 horas a solo la temperatura más alta de incubación (Figura 46). Además, la incubación con suero de seres humanos o monos Cynomolgus a 37 °C durante 14 días no producía pérdida de capacidad de unión al antígeno (Figura 47a y 47b), como se determina por ELISA de unión al VEGF.

Potencia en el ensayo de unión al receptor VEGFR2 y ensayo celular HUVEC:

25 Los ensayos de unión al receptor descritos anteriormente se llevaron a cabo de la siguiente manera:

30 El ensayo de unión al receptor descrito anteriormente se utilizó para evaluar la potencia de las fusiones con Fc (Figura 48). Se encontró que el dAb DOM15-26-593 tiene un aumento de potencia en este ensayo, que establece la capacidad del dAb para bloquear la unión del VEGF al VEGFR2 *in vitro*. La potencia del DMS159 también se demostró en un ensayo HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana), en el que se mide la capacidad de los antagonistas del VEGF para bloquear la proliferación de células HUVE estimulada por el VEGF. El número de células se determina al final de un periodo de incubación fijado con una cantidad pre-determinada de VEGF y una cantidad variable del artículo de ensayo. Cuanto más potente sea el antagonista, más baja proliferación celular se observará (Figura 49).

La secuencia de nucleótidos de DOM1h-131-511 se expone en este párrafo.

35 Secuencia de nucleótidos de DOM1h-131-511:

40 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC GCTGGGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCG CATGAGACGA TGGTGTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCACAT ATTCCCCCGG TTGGTCAGGA TCCCTTCTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTATAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACAGCGGTAT ATTACTGTGC GCTGCTTCCT
AAGAGGGGGC CTTGGTTTGA CTACTGGGGT CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCGAGC

REIVINDICACIONES

1. Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-receptor $\text{TNF}\alpha$ tipo 1 que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMWWVRQAPGKGLEWV
SHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCAL
LPKRGPWFDYWGGQGLTVSS

2. Un dominio variable único de inmunoglobulina anti-receptor $\text{TNF}\alpha$ tipo 1 de acuerdo con la reivindicación 1, codificado por una secuencia que es idéntica a la secuencia de nucleótidos del DOMIh-131-206, mostrado en la figura 19.

10 3. Un antagonista del receptor $\text{TNF}\alpha$ tipo 1 que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina anti-TNFR1 de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.

4. El antagonista de la reivindicación 3, que comprende un primero y segundo dominios variables únicos de inmunoglobulina, en el que cada dominio variable está de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2.

15 5. El antagonista de la reivindicación 3 o 4, en el que el antagonista comprende un monómero de dicho dominio variable único o un homodímero de dicho dominio variable único, en el que dicho dominio variable es idéntico a la secuencia de aminoácidos del DOMIh-131-206.

6. El antagonista del TNFR1 de las reivindicaciones 3 - 5 para su uso en medicina, en el que es administrado por vía oral, a través del tracto GI, o por medio de suministro pulmonar.

20 7. El antagonista del TNFR1 de las reivindicaciones 3 - 5 para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de una afección inflamatoria.

8. El antagonista del TNFR1 de la reivindicación 7, en el que dicha afección inflamatoria es seleccionada entre: una enfermedad pulmonar, psoriasis, artritis, enfermedad inflamatoria del intestino.

9. El antagonista del TNFR1 de las reivindicaciones 3 - 5 para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad respiratoria en un sujeto humano.

25 10. El antagonista del TNFR1 de la reivindicación 9, en que dicha enfermedad respiratoria es seleccionada entre: inflamación del pulmón, EPOC, Asma, Neumonía, enfermedad de fibrosis quística intersticial pulmonar, alergia, inflamación pulmonar.

11. Un ligando de doble especificidad que comprende un dominio variable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2.

30 12. Un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2.

13. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 12.

14. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 12, o el vector de la reivindicación 13.

35 15. Una composición farmacéutica que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o un antagonista de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

16. El dominio variable único de inmunoglobulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o un antagonista de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende un dominio constante de anticuerpo.

Fig.1.

GAS directora

M L F K S L S K L A T A A A 5101
TA ATG TTA TTT AAA TCA TTA TCA AAA TTA GCA ACC GCA GCA GCA

SITIO DE CLONACIÓN MÚLTIPLE

F F A G V A T A A A A
TTT TTT GCA GGC GTG GCA ACA GCG TCG ACA CA CTGCAG GAG GCG GCC GCA
SalI PstI NotI

Sec. Genética III

E T V E S -
GAA ACT GTT GAA CGT - - -

Fig.2.

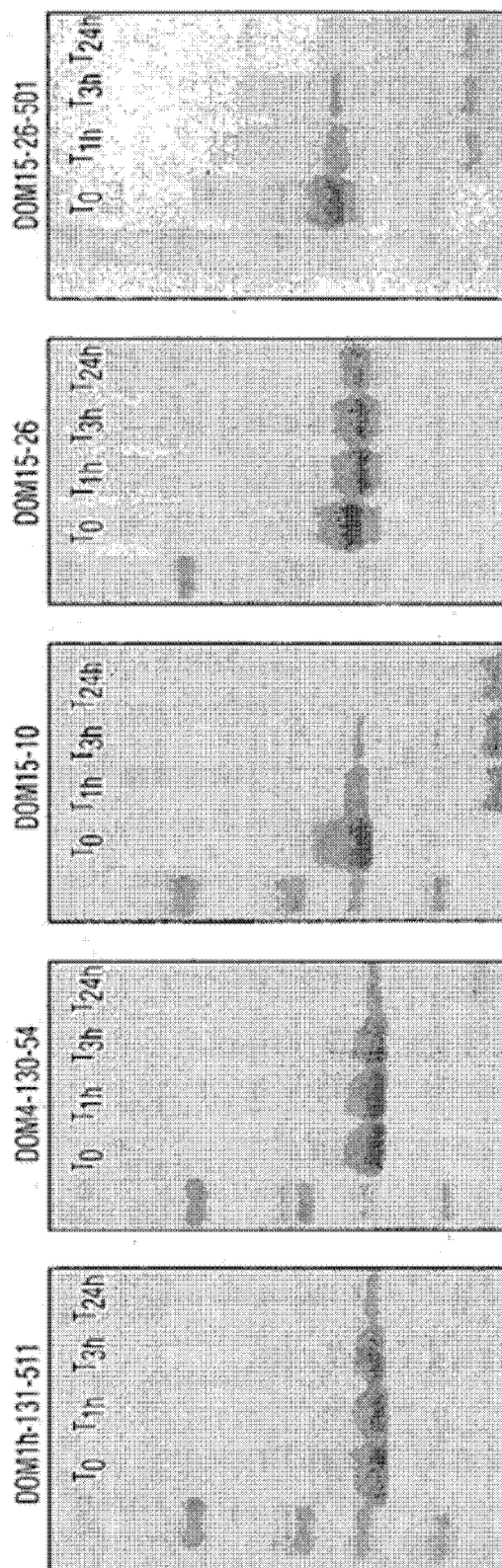
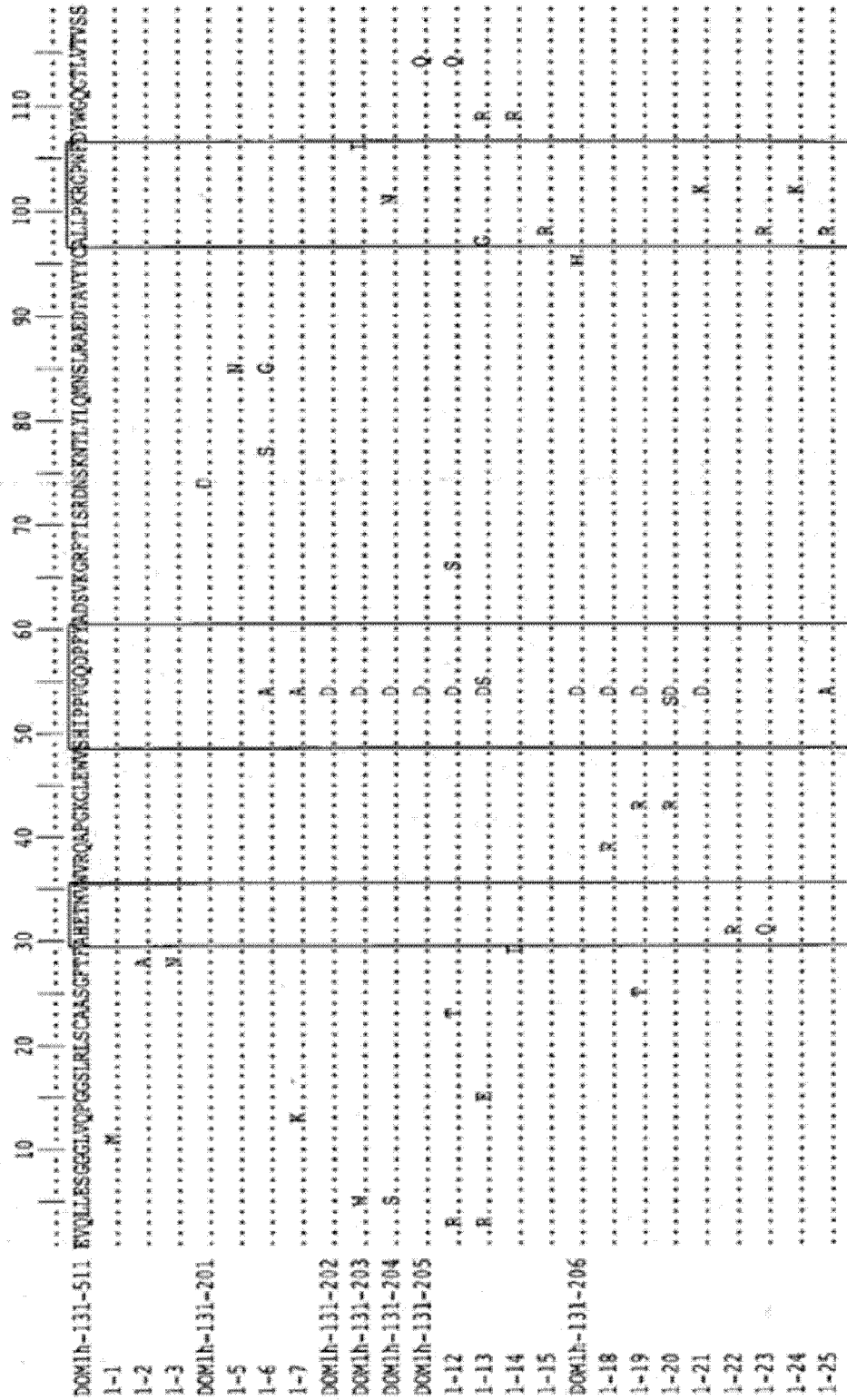


Fig.3.



[illegible]

Fig.5.

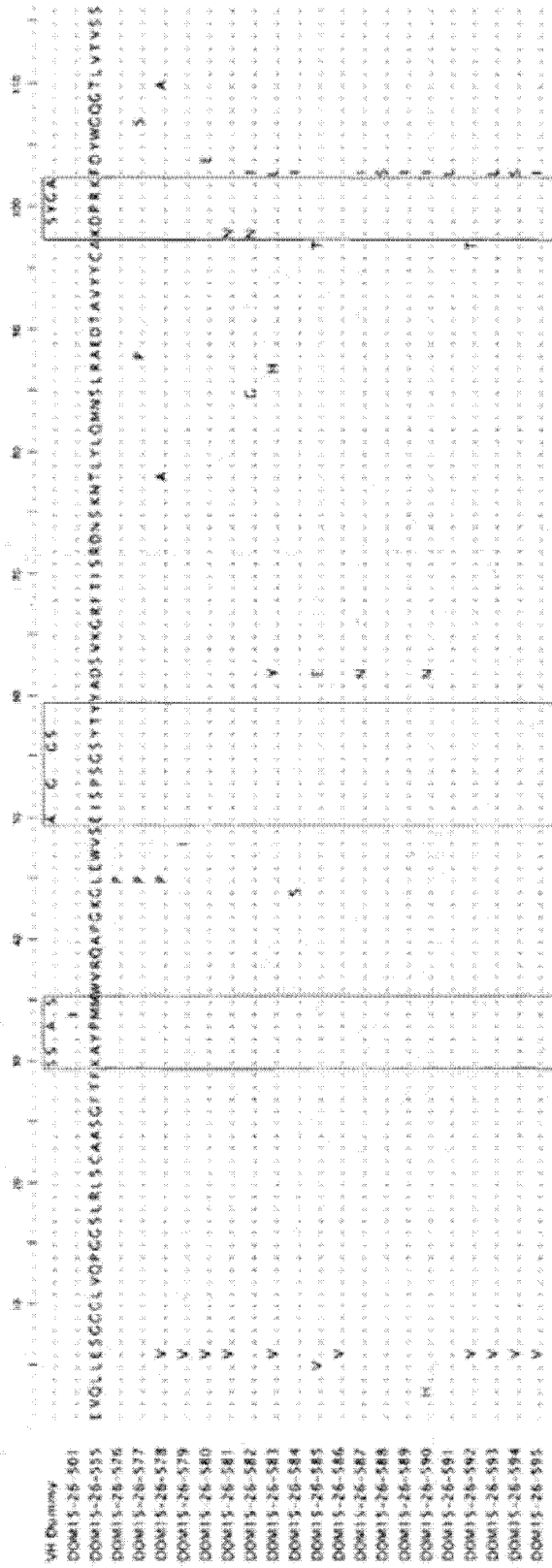


Fig. 6.

[illegible]

Fig.7A.

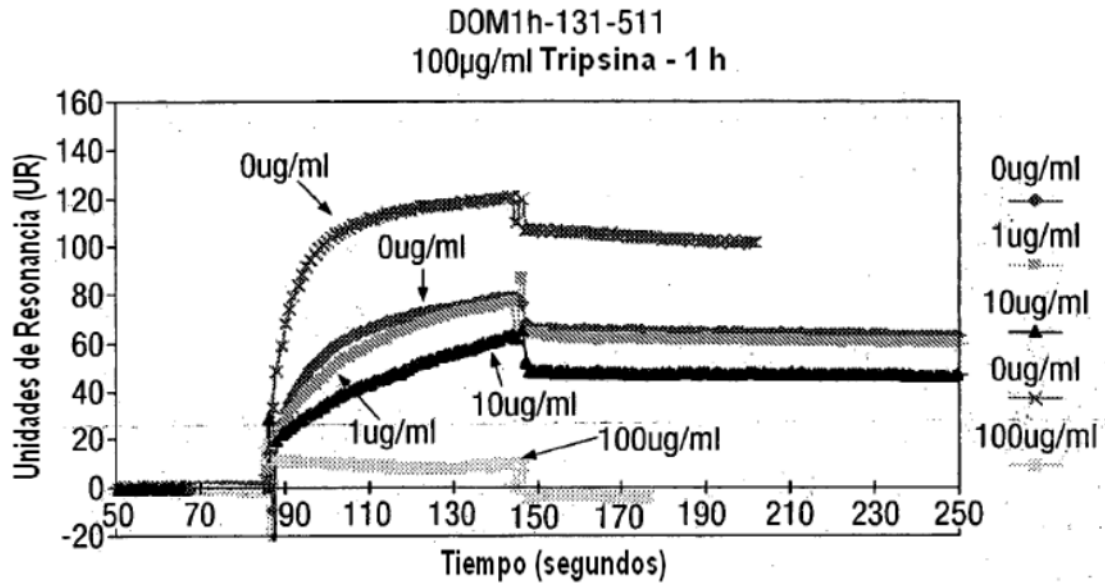


Fig.7B.

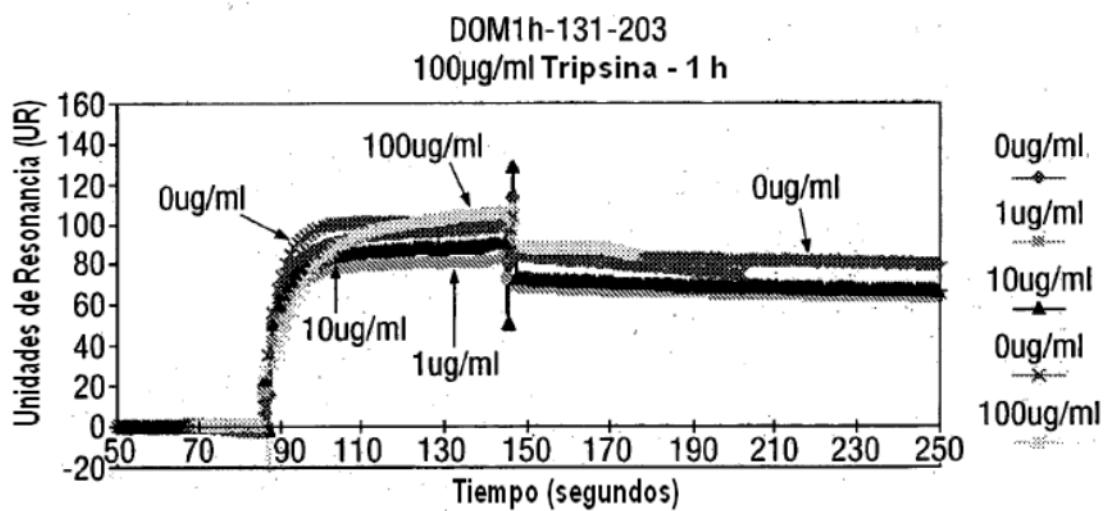


Fig.7C.

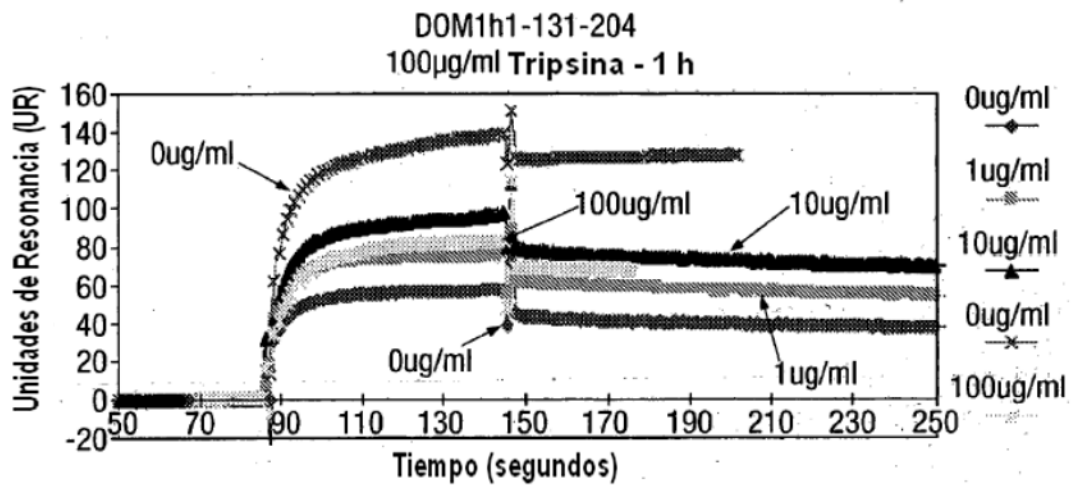


Fig.7D.

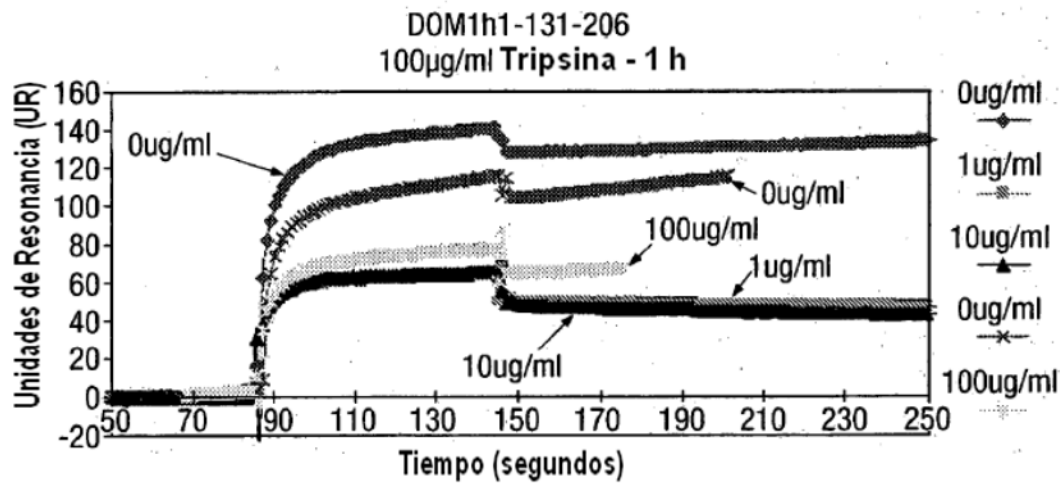


Fig.8A.

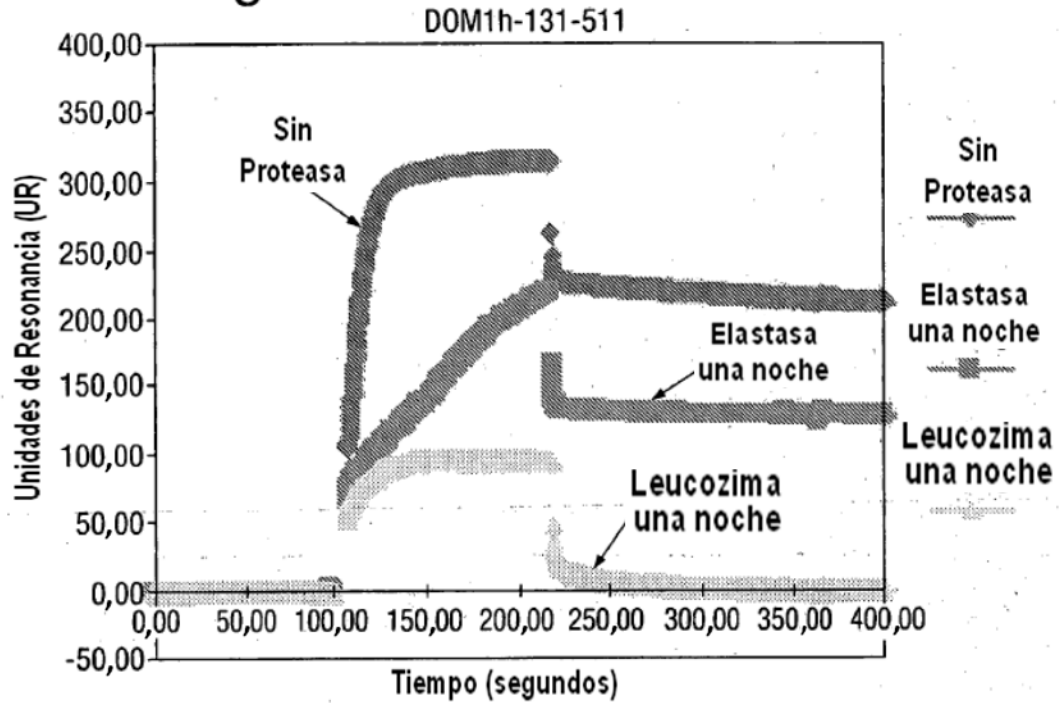


Fig.8B.

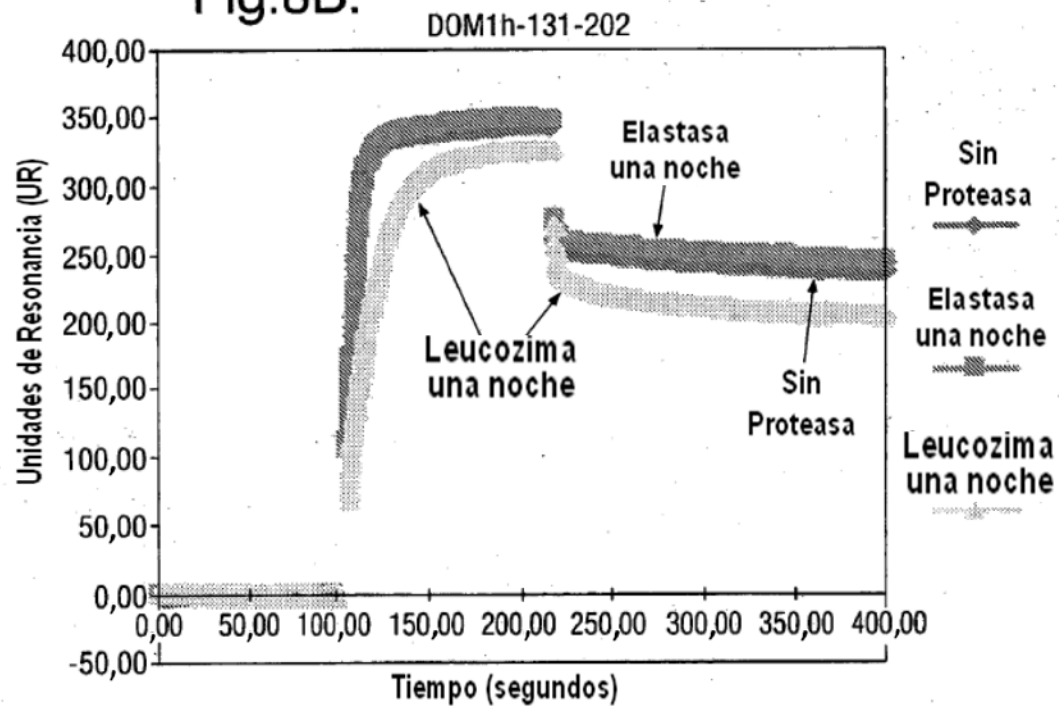
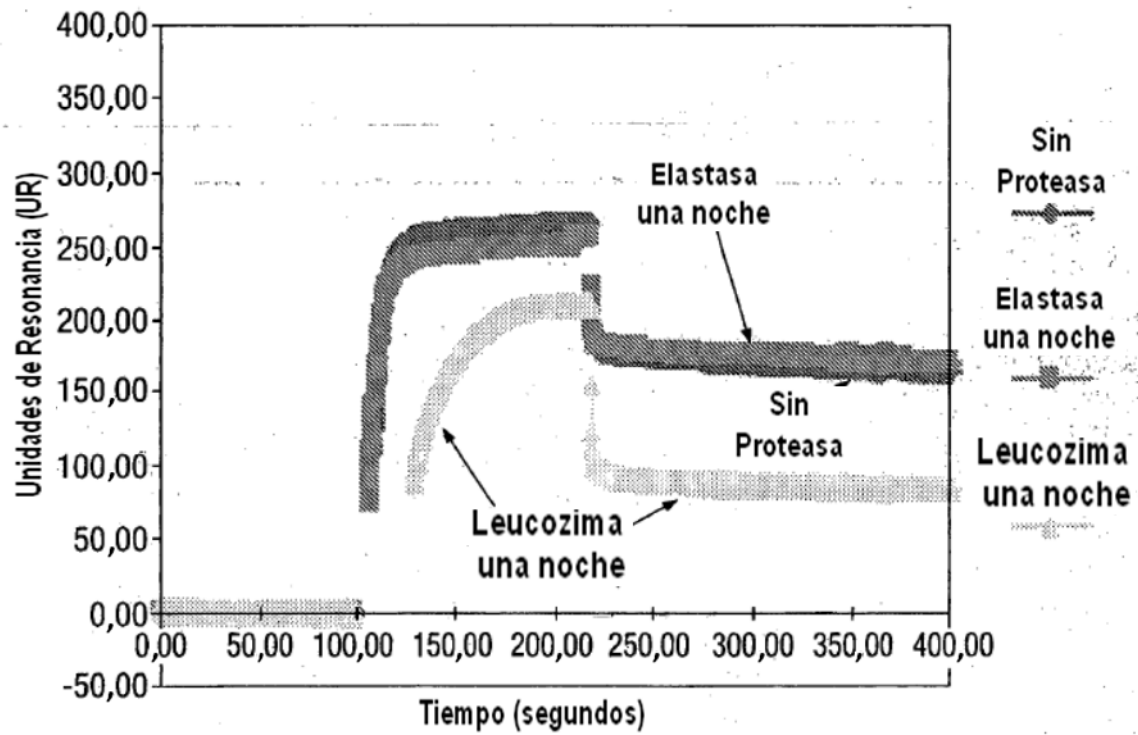


Fig.8C.

DOM1h-131-206



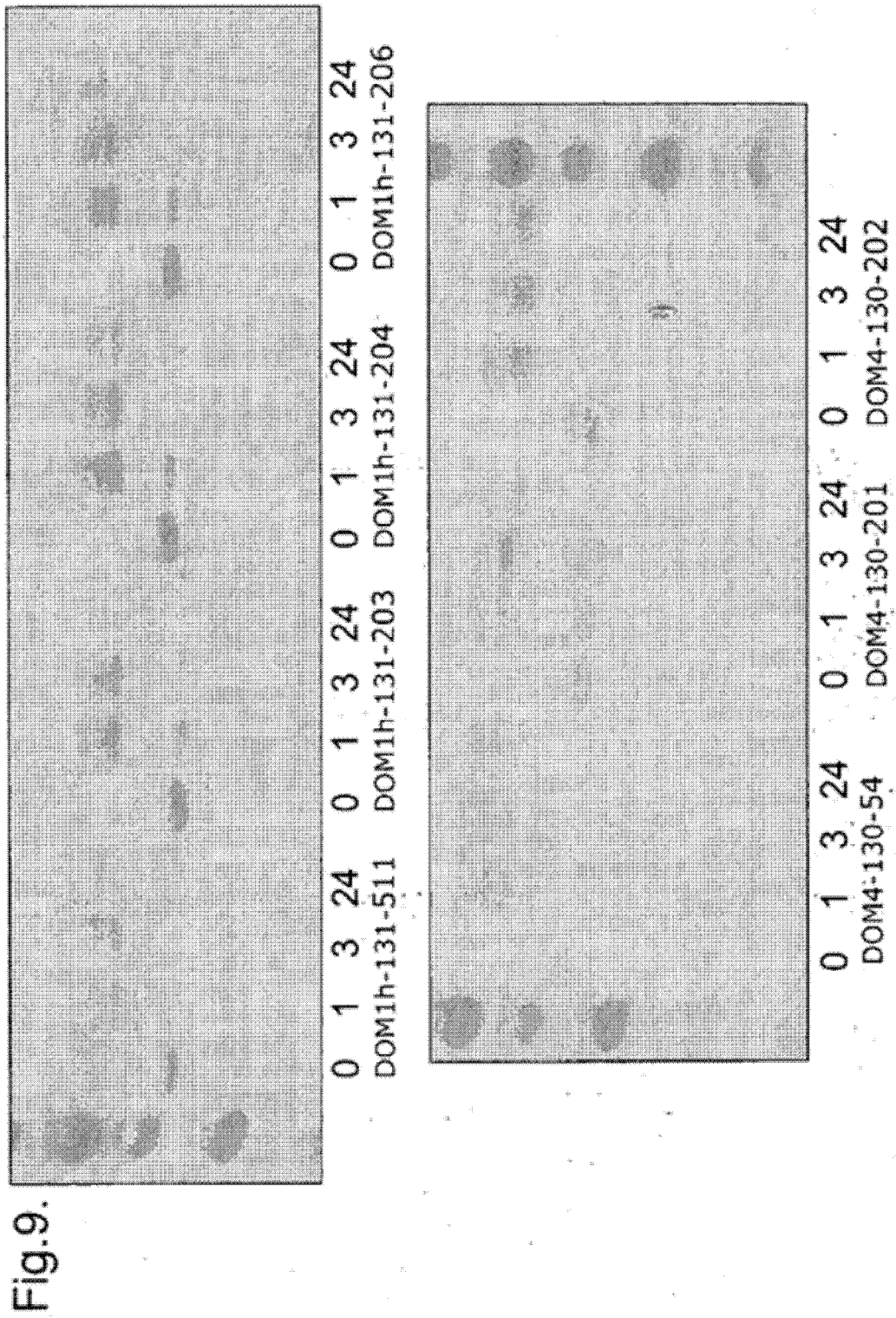


Fig.10A.

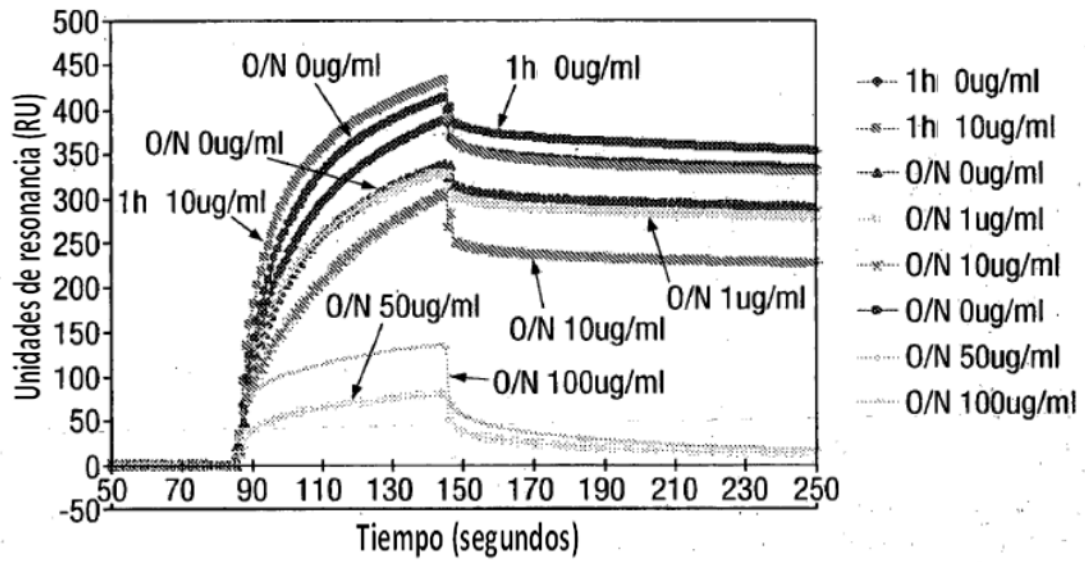


Fig.10B.

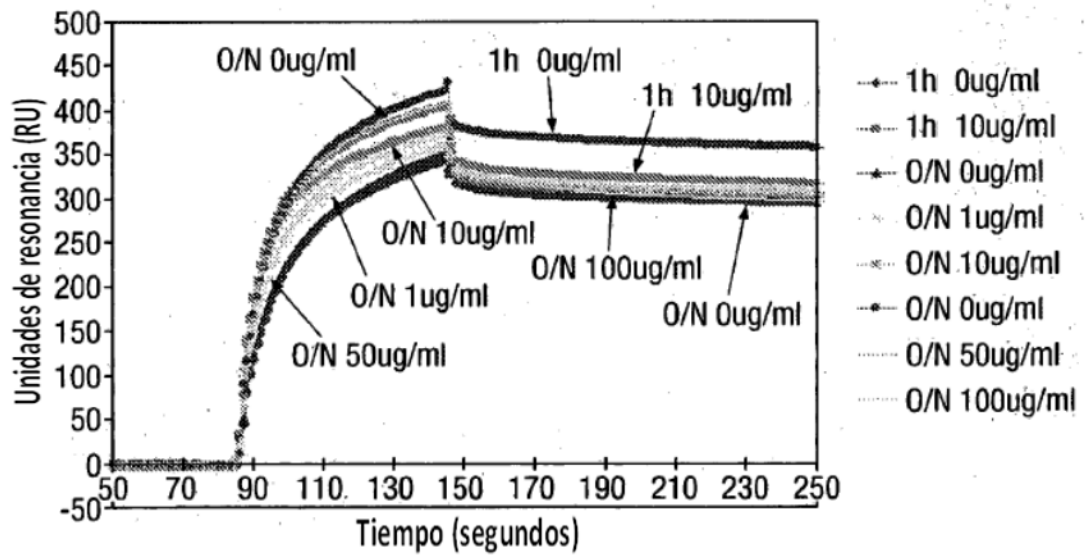


Fig.10C.

DOM4-130-202

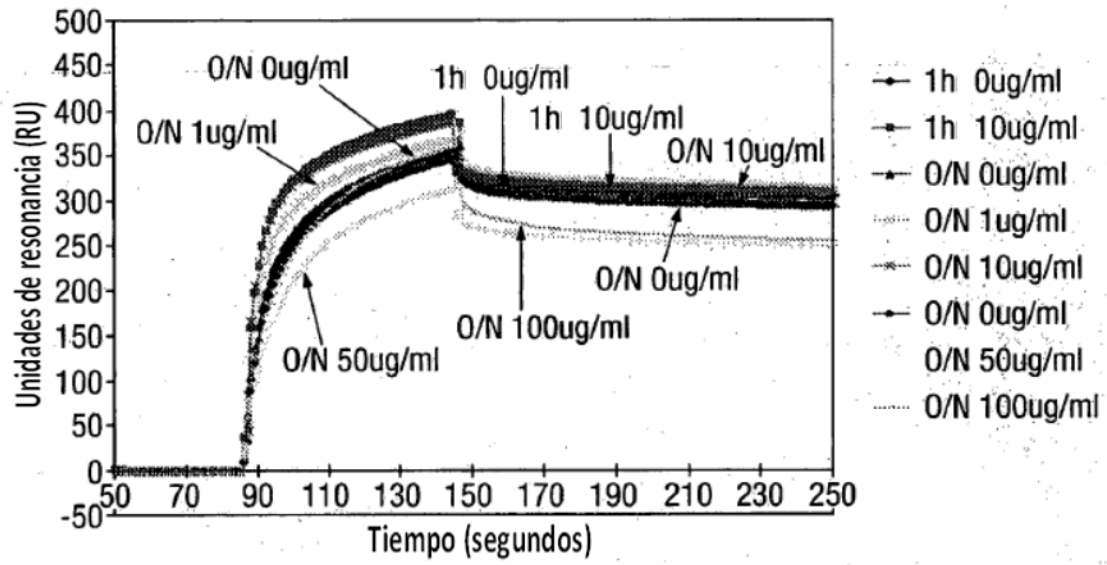


Fig.11A.

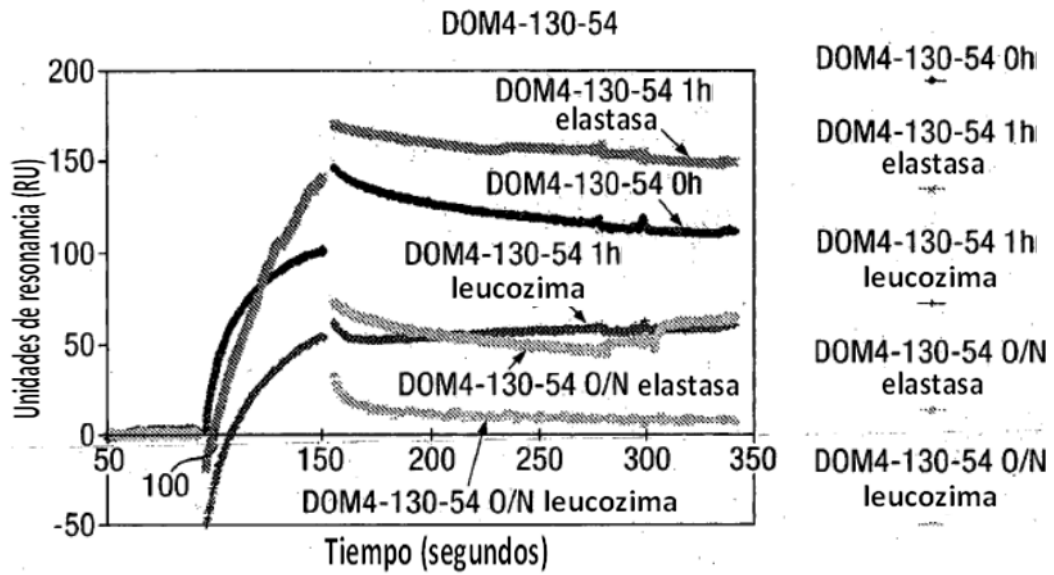


Fig.11B.

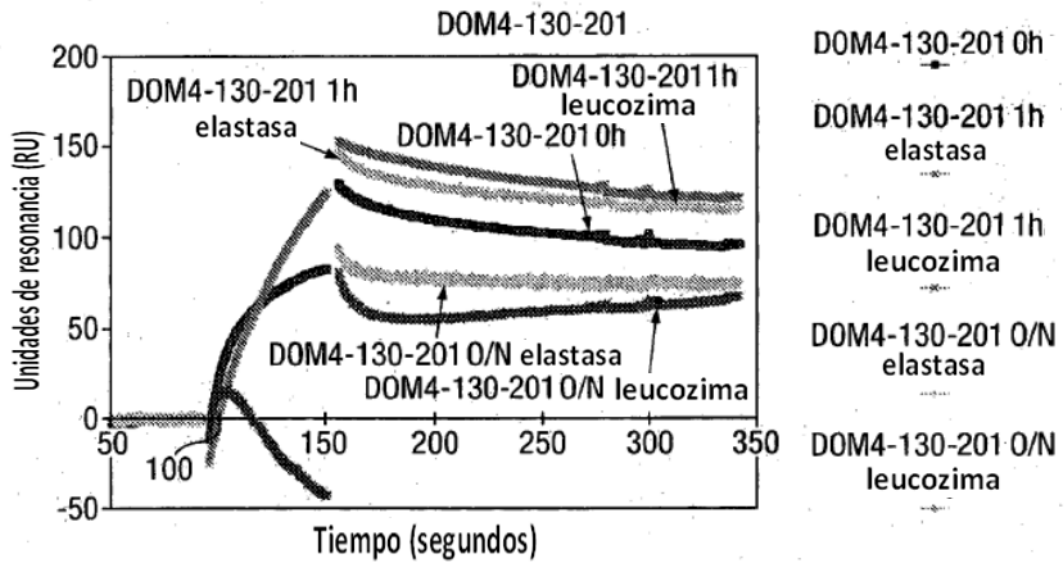


Fig.11C.

DOM4-130-202

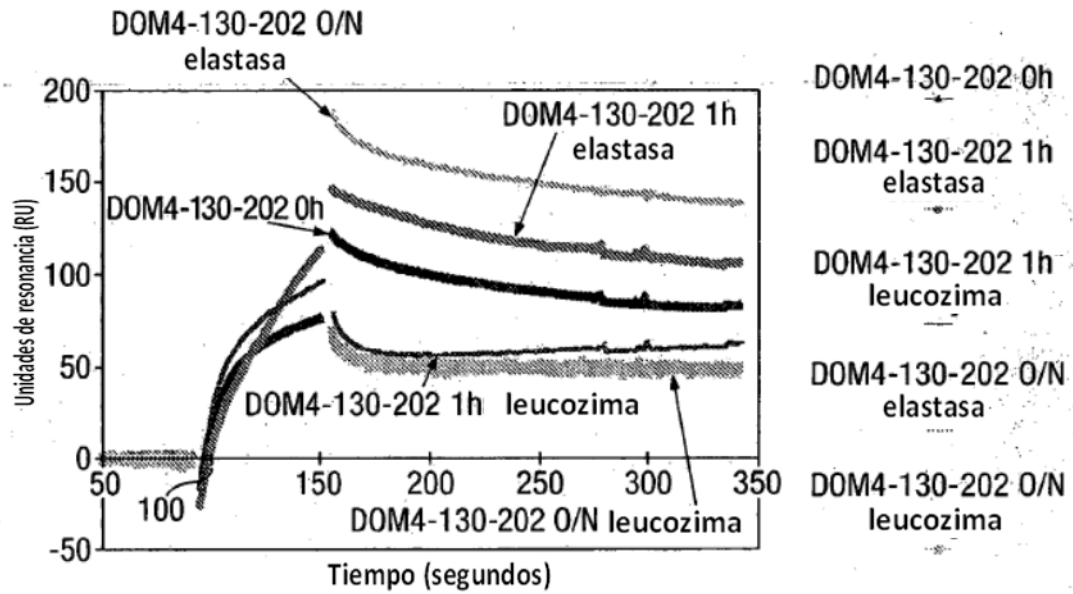


Fig. 12.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Fig.13A.

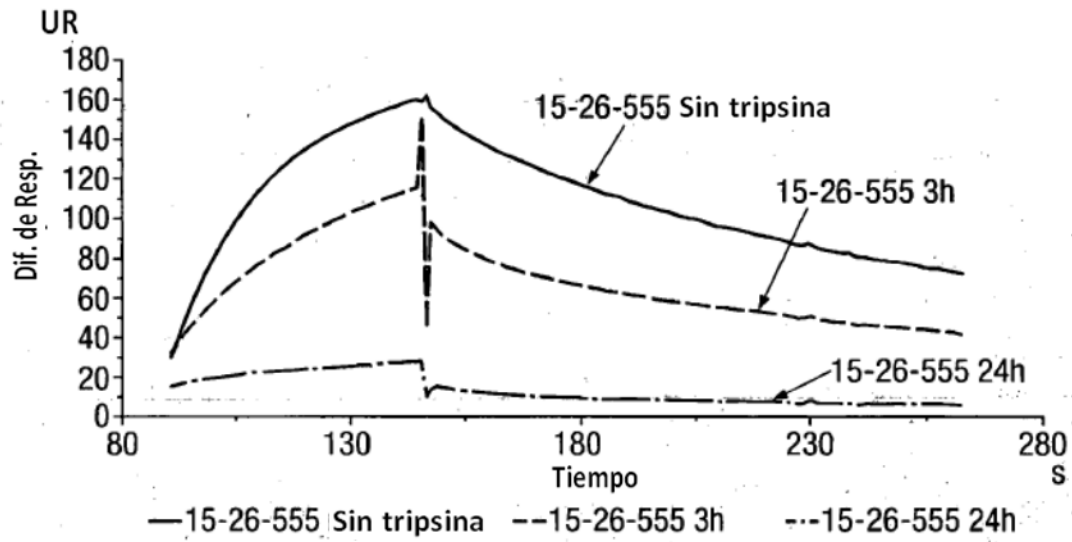


Fig.13B.

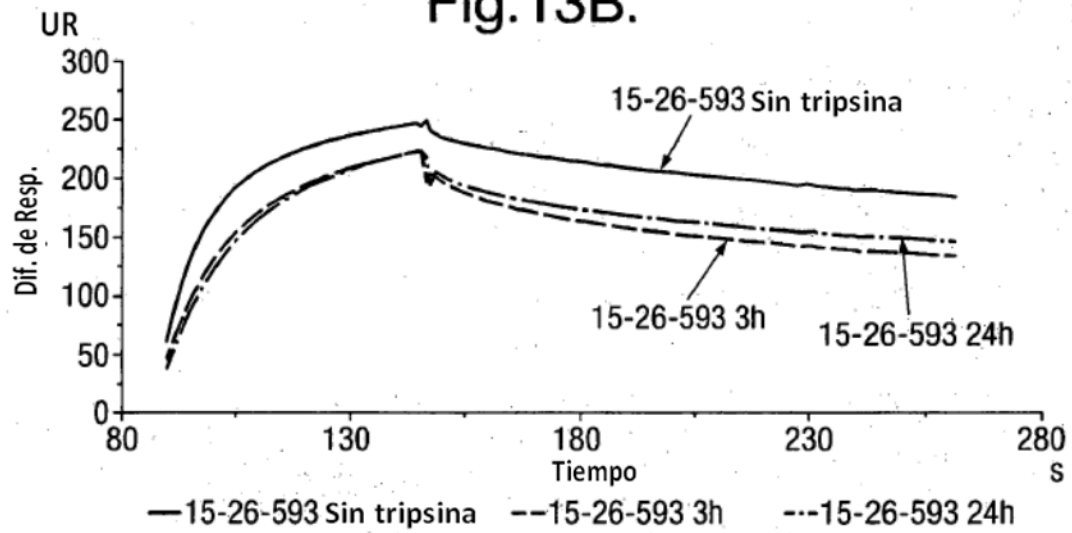


Fig.14.

Influencia del tratamiento de tripsina en la unión de hVEGF
por variantes del candidato DOM15-26-555

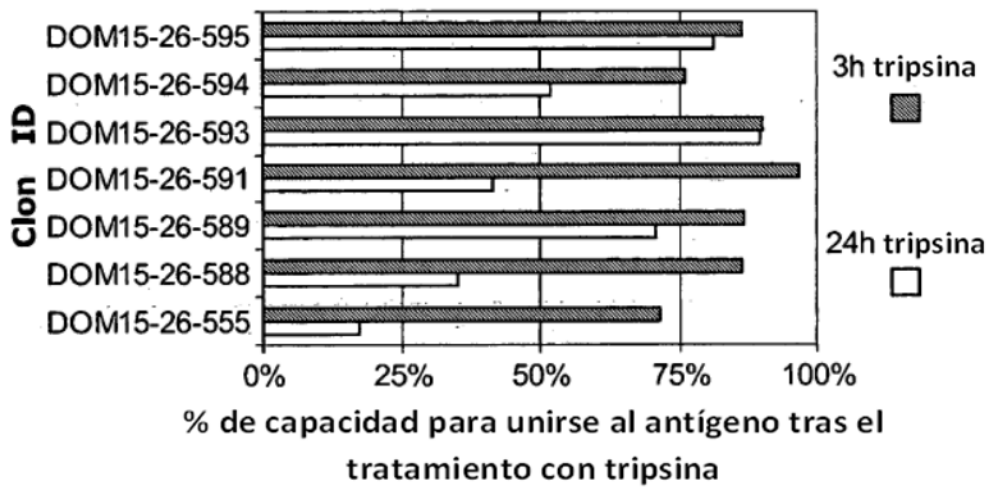


Fig.15.

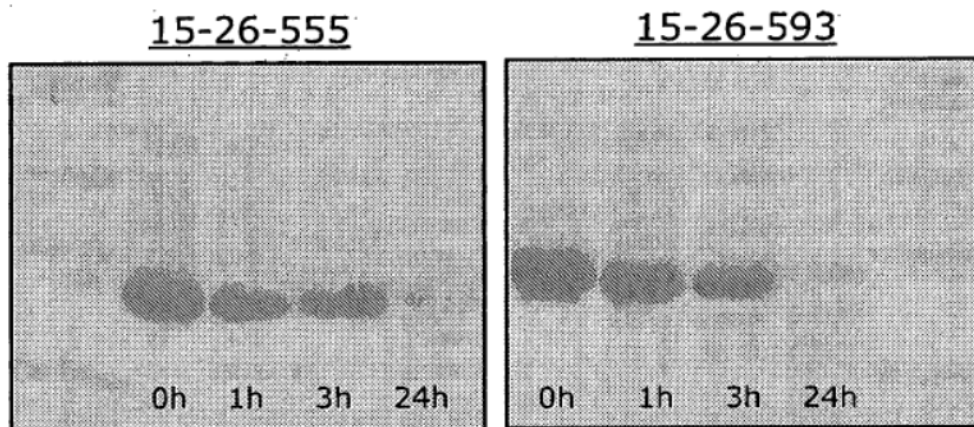


Fig.16.

VK simulado
 DOM15-10 4G
 DOM15-10-11

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....
S.SY.N.....AA.S.....SYST.N.....K.
 DIQMTQSPSLSASVQDRVTTCRASQWIGPELSWYQKPGKAPKLLIYHTSIQLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAIYCCQYMFQRTFGQTKVEIR
R.....M.....G

Fig.17A.

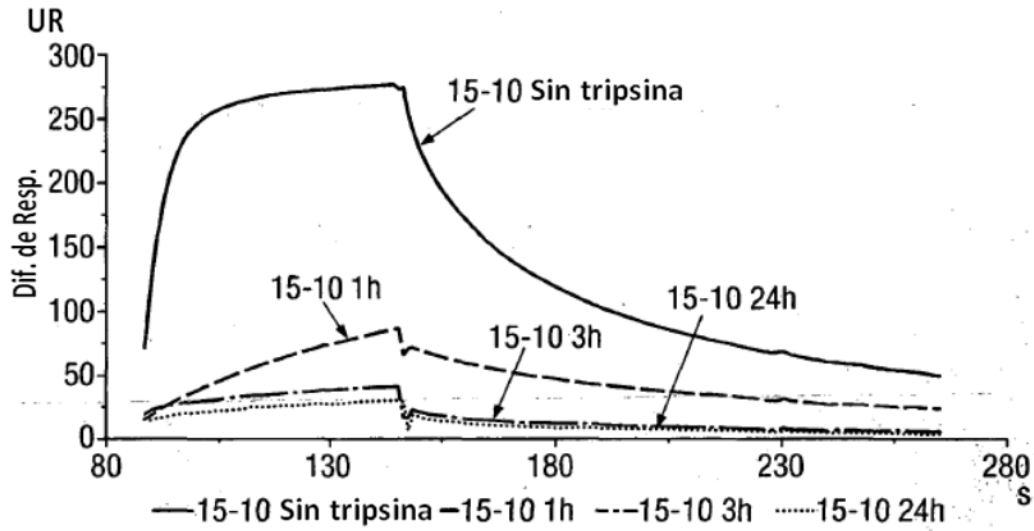


Fig.17B.

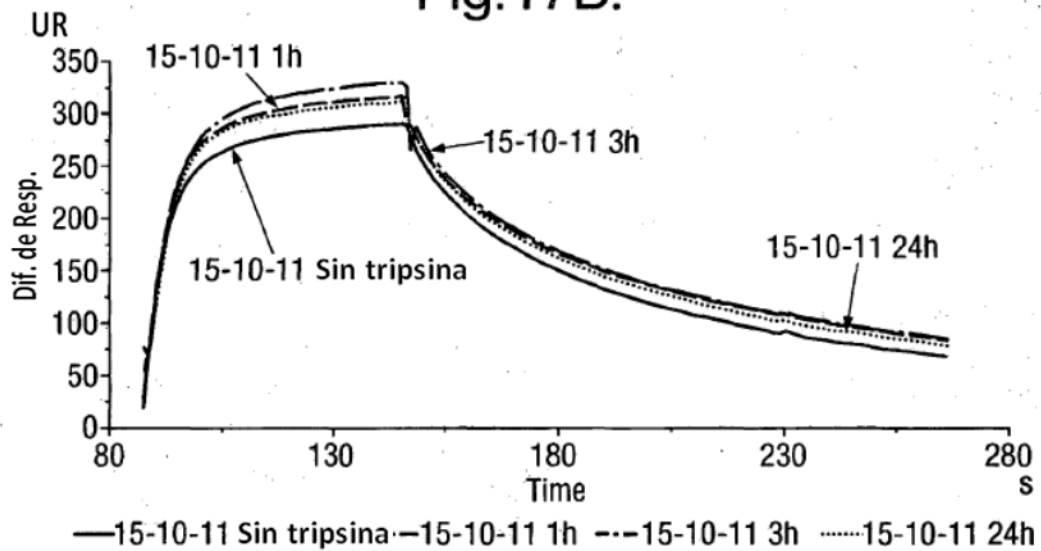


Fig.18.

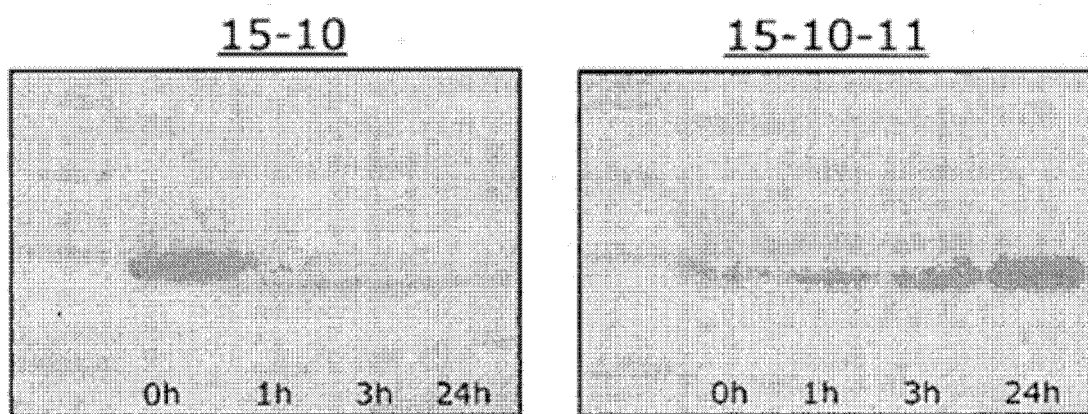


Fig.19A.

DOM1h-131-511 secuencias derivadas

>1-1

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCATGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-2

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTGCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGAGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-3

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-201

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACGATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

Fig. 19B.

>1-5

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTTCCCCGGTGGTTCAGGATCCCTTCTATGCAGACTCCGTG
 AAGGGCCCGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAACCT
 GCGCGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTGAC
 TACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-6

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGG
 AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTTCCCCGGTGGTTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
 TGAAGGGCCCGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAGCACGCTATATCTGCAAATGAACGG
 CCTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTT
 GACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-7

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTTCCCCGGTGGTTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCCGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-202

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGG
 AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTTCCCCGGACGGTCAAGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
 TGAAGGGCCCGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

Fig.19C.

>DOM1h-131-203

GAGGTGCAGCTGTGGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGATTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-204

GAGGTGCAGCTGTGGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCAGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAATAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-205

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCAGGTACCGTCTCGAGCG

>1-12

GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTACAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGAGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAGATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTGTATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGAGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCAGGTACCGTCTCGAGCG

Fig.19D.

>1-13

GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGAGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATAGCCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGGGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACAGGGGTGAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-14

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCATTTGCGCATGAAACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACCGGGGTGAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-15

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCTCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGTG
 AAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGCCT
 GCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCGGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTGAC
 TACTGGGGGTGAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-206

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCACCAGGG
 AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
 TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATCACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGGTGAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Fig.19E.

>1-18

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCGGGCTCCAGGG
 AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
 TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-19

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCACCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
 AGGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
 TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-20

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 GGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCTCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-21

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAAGGGGGCCTTGTTTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Fig.19F.

>1-22

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCGTGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-23

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCAAGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAAGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCGGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-24

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCTTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAAGGGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-25

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCGGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Fig.19G.

DOM4-130-54 secuencias derivadas

>4-1

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCCCT
AAGCTCCTGATCAATCTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGA
TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTCGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-2

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCCCT
AAGCTCCTGATCAATTTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGCGGA
TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-3

GACATCCAGACGACCCAGTCTCCGTCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-4

GACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAACTTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-5

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCCCT
AAGCTCCTGATCAATTTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGA
TACGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATATCGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGGGG

Fig.19H.

>4-6

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCTGAAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGAATTCACCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-7

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCGTCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTTCCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-8

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGGATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTTCCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-9

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAGTFTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTACACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>DOM4-130-201

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAAATTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATCTGCAACCTGAAGATTTCCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAATGGG

Fig.19l.

>4-11

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
 TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
 TAAGCTCCTGATCAATTTATGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCACCACGTTTCAGTGGCAGTGG
 ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCCGCTACGTACTACTG
 TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-12

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
 TGCCGGGCAAGTCAGGATATATACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
 TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCACCACGTTTCAGTGGCAGTGG
 ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACTACTG
 TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAGG

>4-13

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
 TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
 TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
 ATATGGGACAGATTTTCGCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCCGCTACGTACTACTG
 TCAACCGTCTTTTTACTTCCCATATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAGG

>4-14

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACTATCACTT
 GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
 AAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
 TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTCGCTACGTACTACTGT
 CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-15

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
 TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
 TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
 ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTCGCTACGTACTACTG
 TCAACCGTCTTTTTACTTCCCATATACGTTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAGG

Fig. 19J.

>4-16

GACATCCAAATGGCCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTGGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCCGCTACGTACT
 ACTGTCAGCCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAG
 G

>4-17

GACATCCAGATGACCCAGTCACCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGACATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACT
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG
 G

>4-18

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCGTCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACT
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACG

>4-19

GACATCCAGATAACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACT
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACCG

>4-20

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACT
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAG

Fig.19K.

>DOM4-130-202

GACATCCAGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCTC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTTCCTTCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTCCGCTACGTACT
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>4-22

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACT
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>4-23

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGAGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCCGCTACGTACT
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAATCGG

>4-24

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATATGTAGGAGACCGTGTCAACCATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGGTACGTACT
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>4-25

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCAC
 TTGTCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGGTACGTACT
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

Fig.19L.

>4-26

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCGTCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCTTGTACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTAGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGT

>4-27

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATCTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

Fig.20A.

>DOM15-26-555

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-576

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-578

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACGCGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAGCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-579

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGATCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-580

GAGGTGCAGCTGCTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAT
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGAAATACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-581

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
 GCGGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAATGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-582

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACATTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACGGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAGATCCT
 CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

Fig.20B.

>DOM15-26-583

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCCGCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCATACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-584

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCTGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGAGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCCGCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACAATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-585

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCCGCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAGAGTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTACGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-586

GAGGTGCAGTTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCCGCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATTTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-587

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCCGCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAAACCTCCGTGAAGGGTCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-588

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCCGCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTCTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-589

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATCTCGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Fig.20C.

>DOM15-26-590

GAGGTGCATCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAAACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-591

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-592

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTACGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-593

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTTCAGAGATTTTCGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-10

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACTGTCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG

>DOM15-10-1

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATCATTCGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTGAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG

>DOM15-10-2

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCC
 ATCACTTGTCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACTGTCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG

Fig.20D.

>DOM15-10-3

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGCACCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTAGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAAGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGATGG

>DOM15-10-4

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGAGTTAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTTTTACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCCA
 GGGACCAAGGTGGAAATTAGACGG

>DOM15-10-5

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCGAAGTGGGGTCCCATCT
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGATGG

>DOM15-10-6

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATCATACGTCCATTTTACAGAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GCAGATTTTGCAACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG

>DOM15-10-7

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTGGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAA

>DOM15-10-8

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACTT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCTGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGAGGG

>DOM15-10-9

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGTTCCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGTCTGCAACCT
 GGAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG

Fig.20E.

>DOM15-10-10

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTATCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG

>DOM15-10-11

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGAGGG

>DOM15-10-12

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAAGCT
 GAAGATTTCTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAACCAGACGG

>DOM15-10-13

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGAAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 CGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG

>DOM15-10-14

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTACGTTGGTACCAGCATAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCTCCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTCTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGATGG

>DOM15-10-15

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCAAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAGGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAGGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTGGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG

>DOM15-10-16

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTACGTTGGTACCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
 CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTTCAGCCTATGACGTTTCGGCCAA

Fig.21.

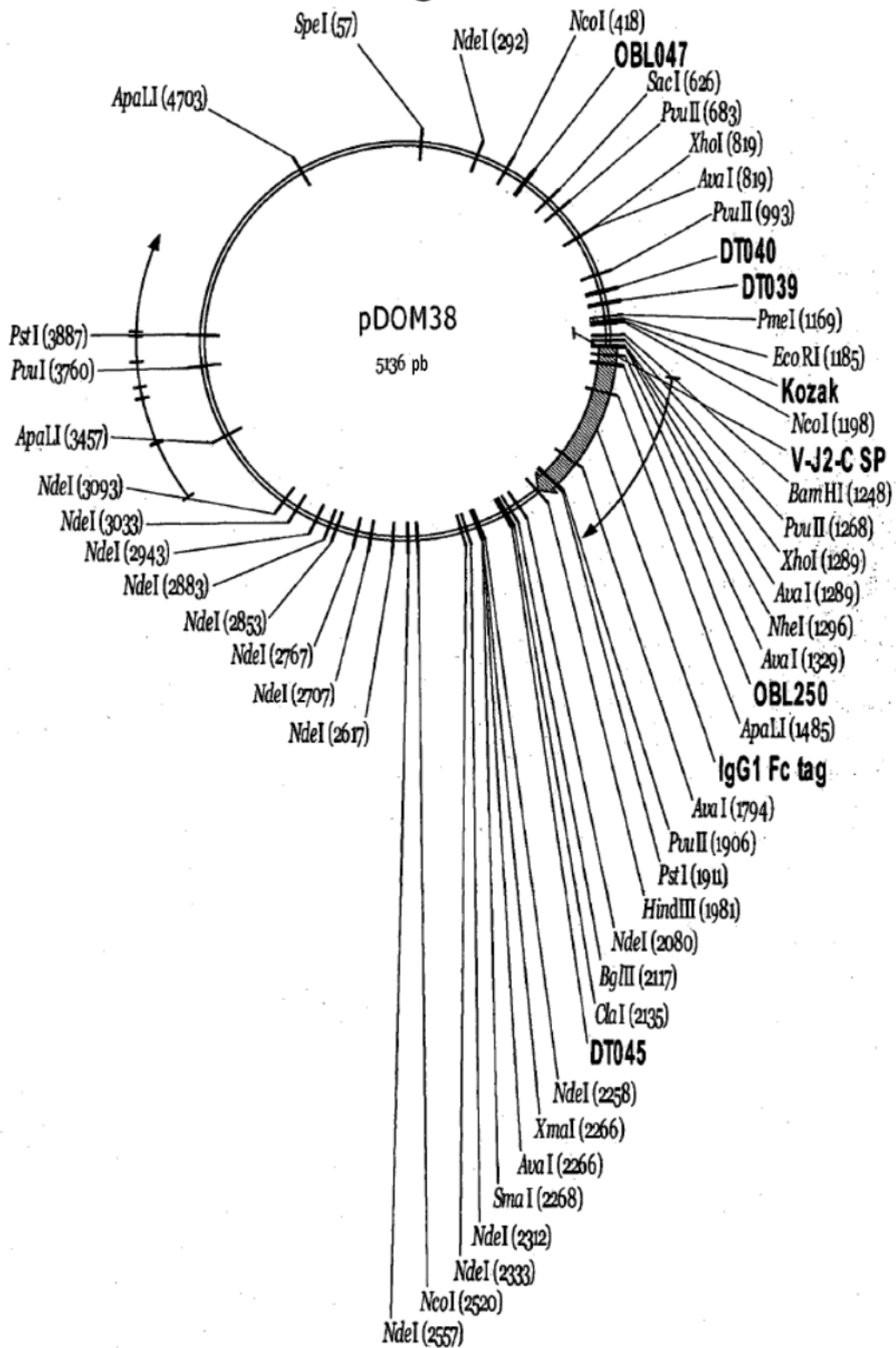


Fig.22.

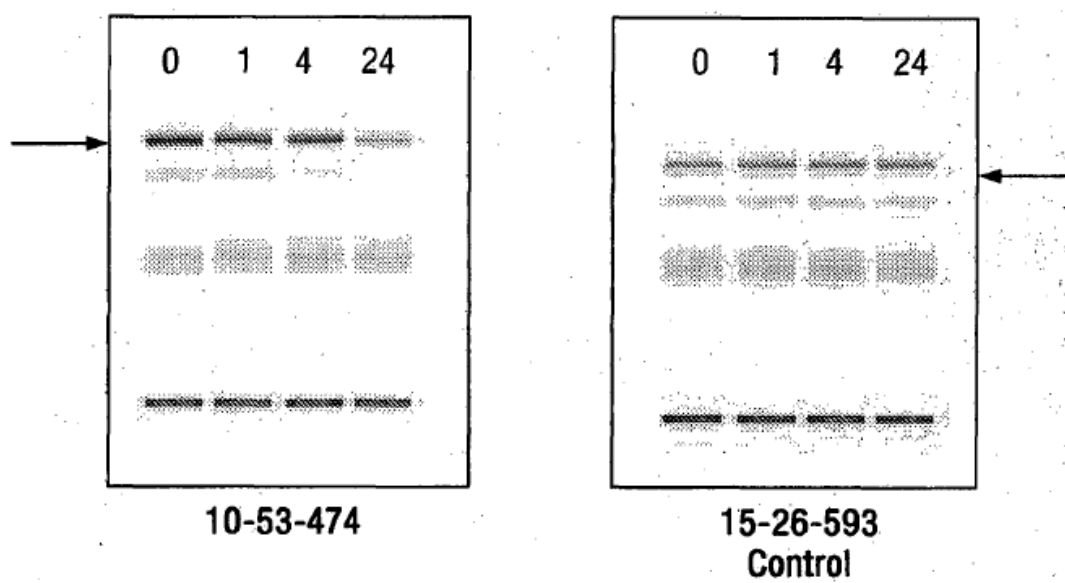


Fig.23.

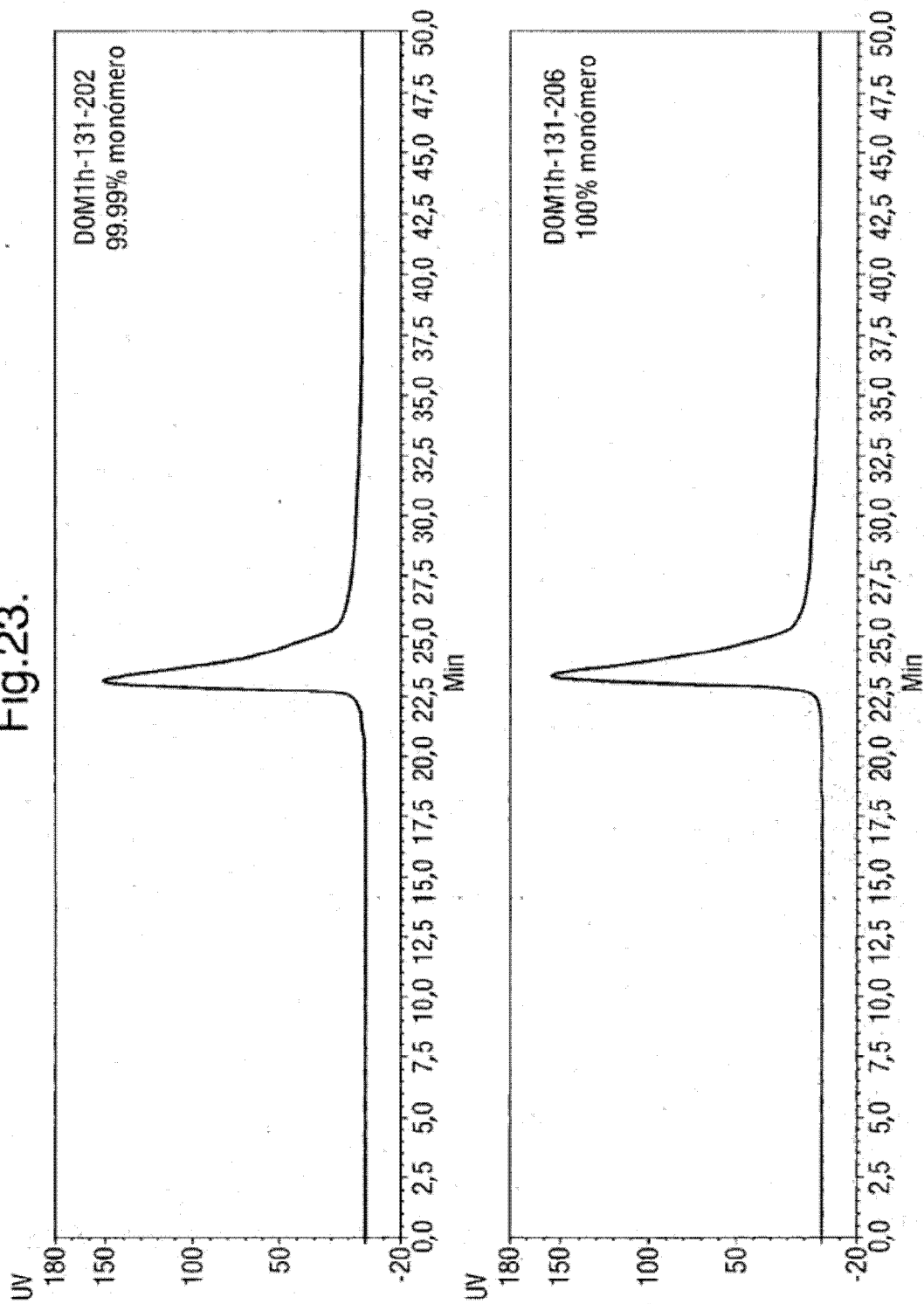


Fig.23 (Cont).

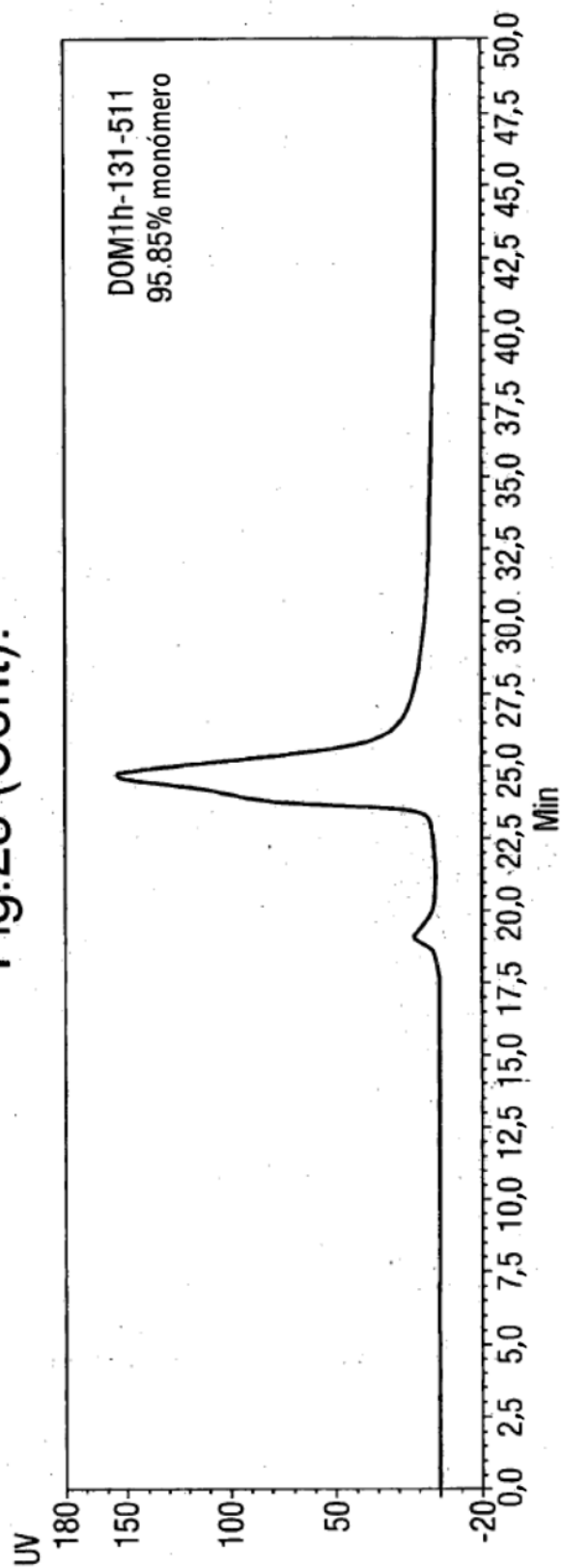


Fig.24.

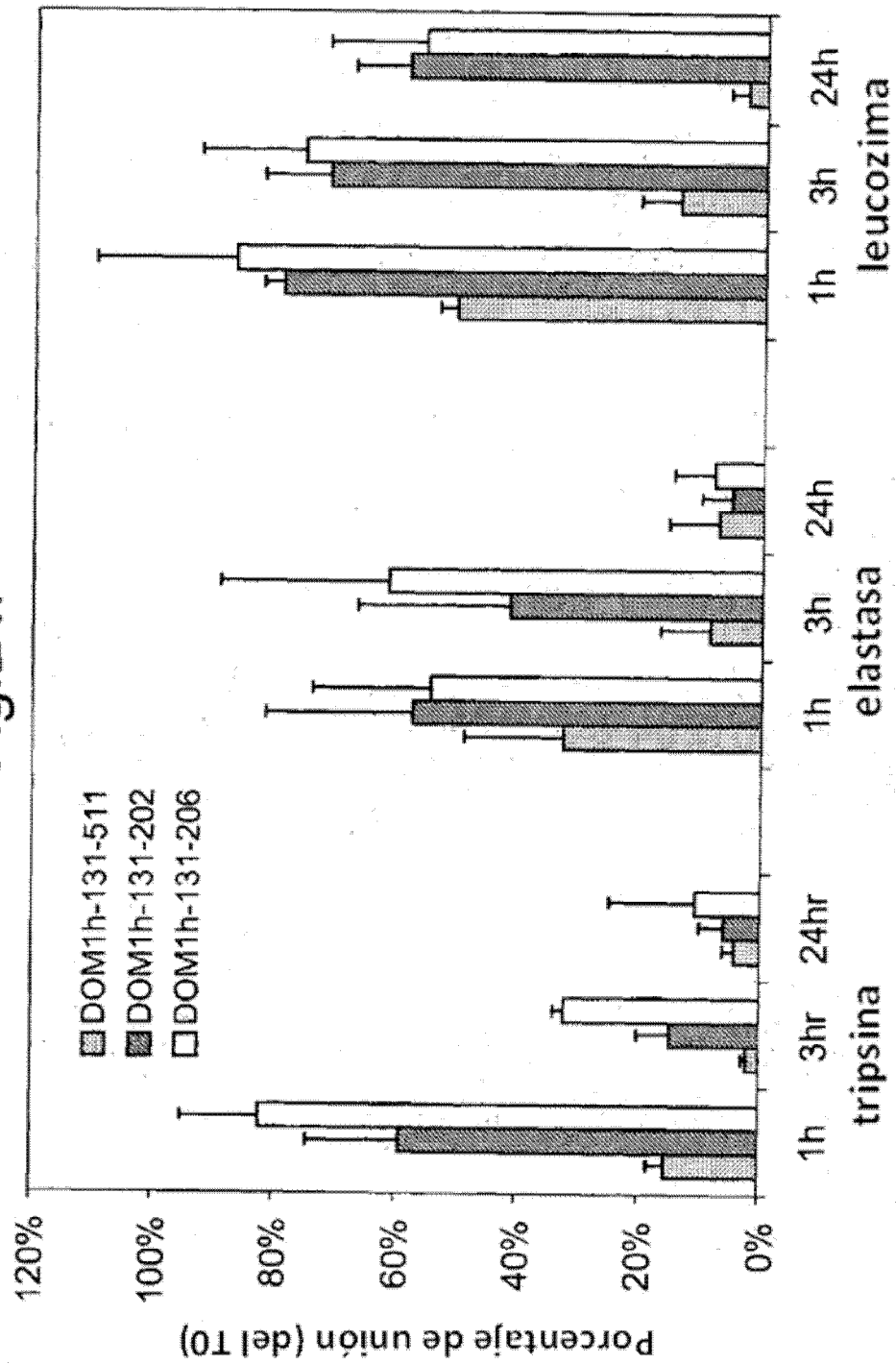


Fig.25.

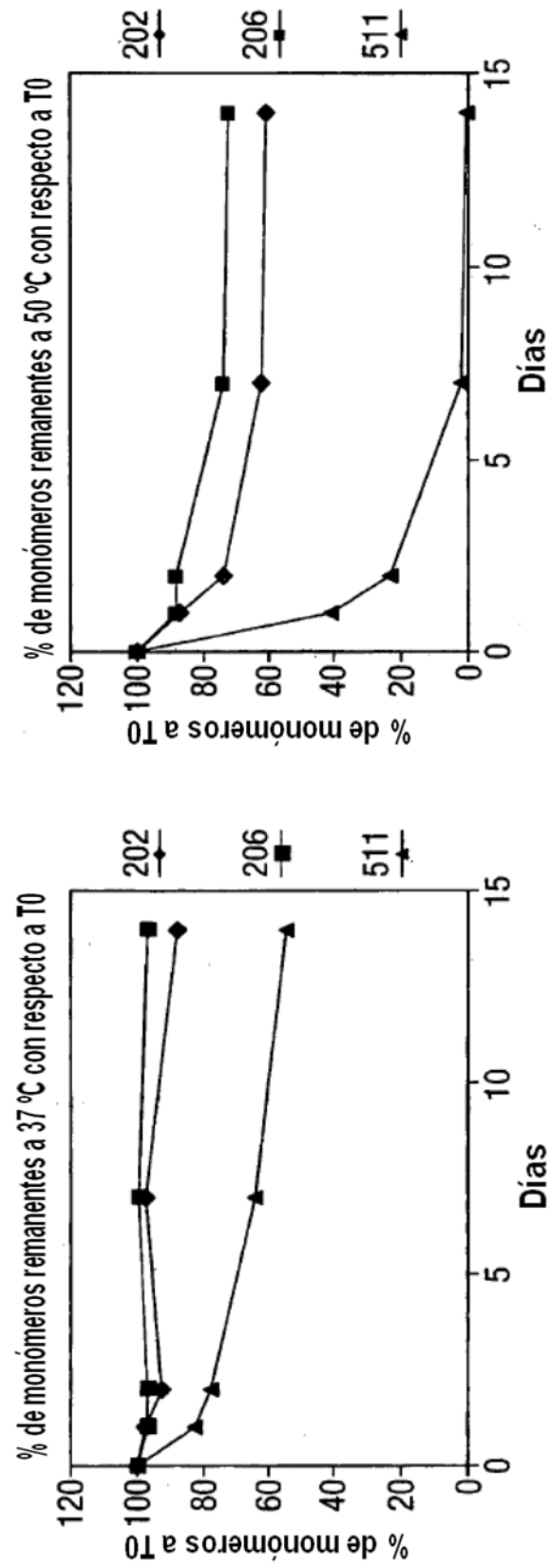


Fig.26.

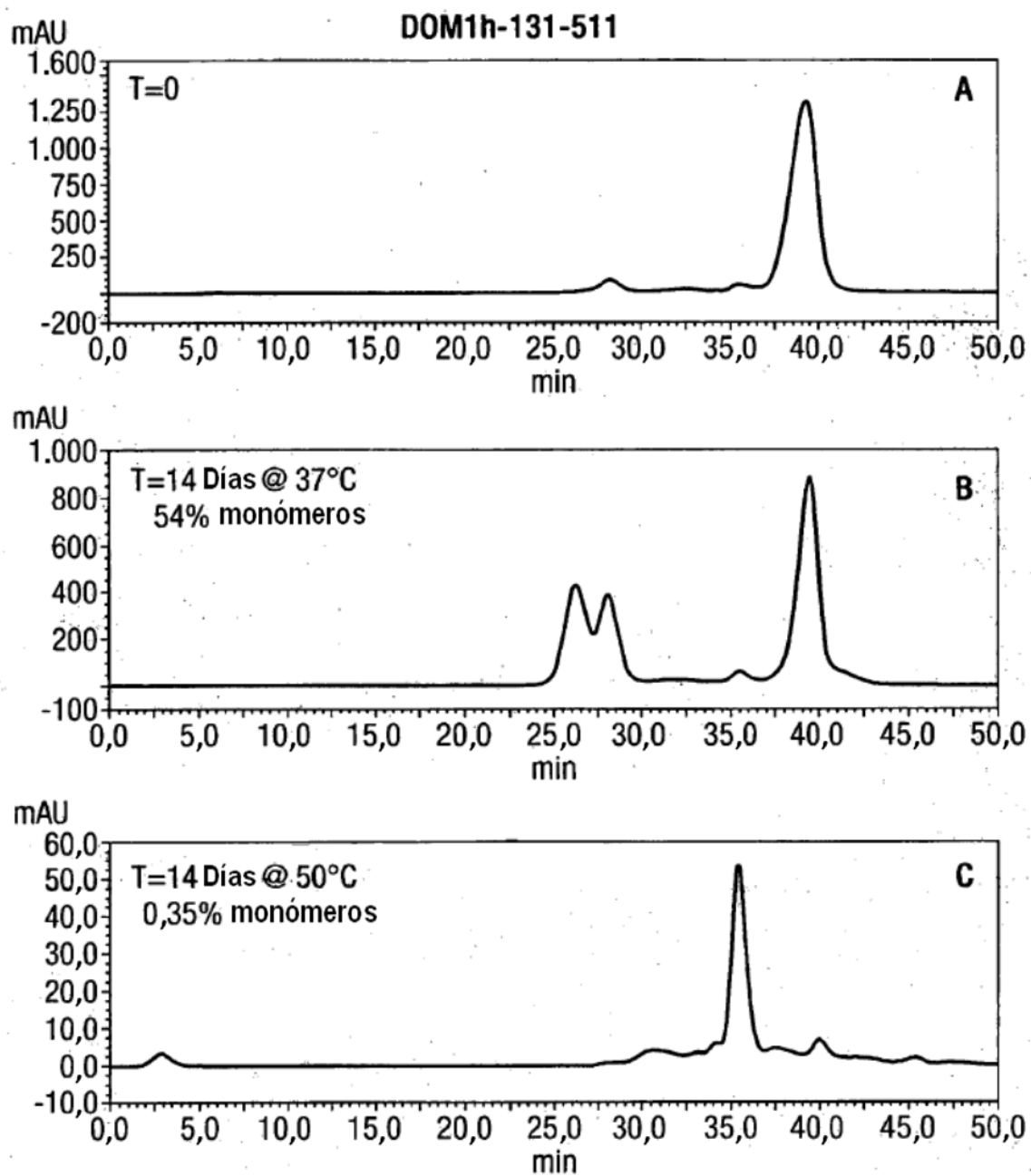


Fig.26 (Cont I).

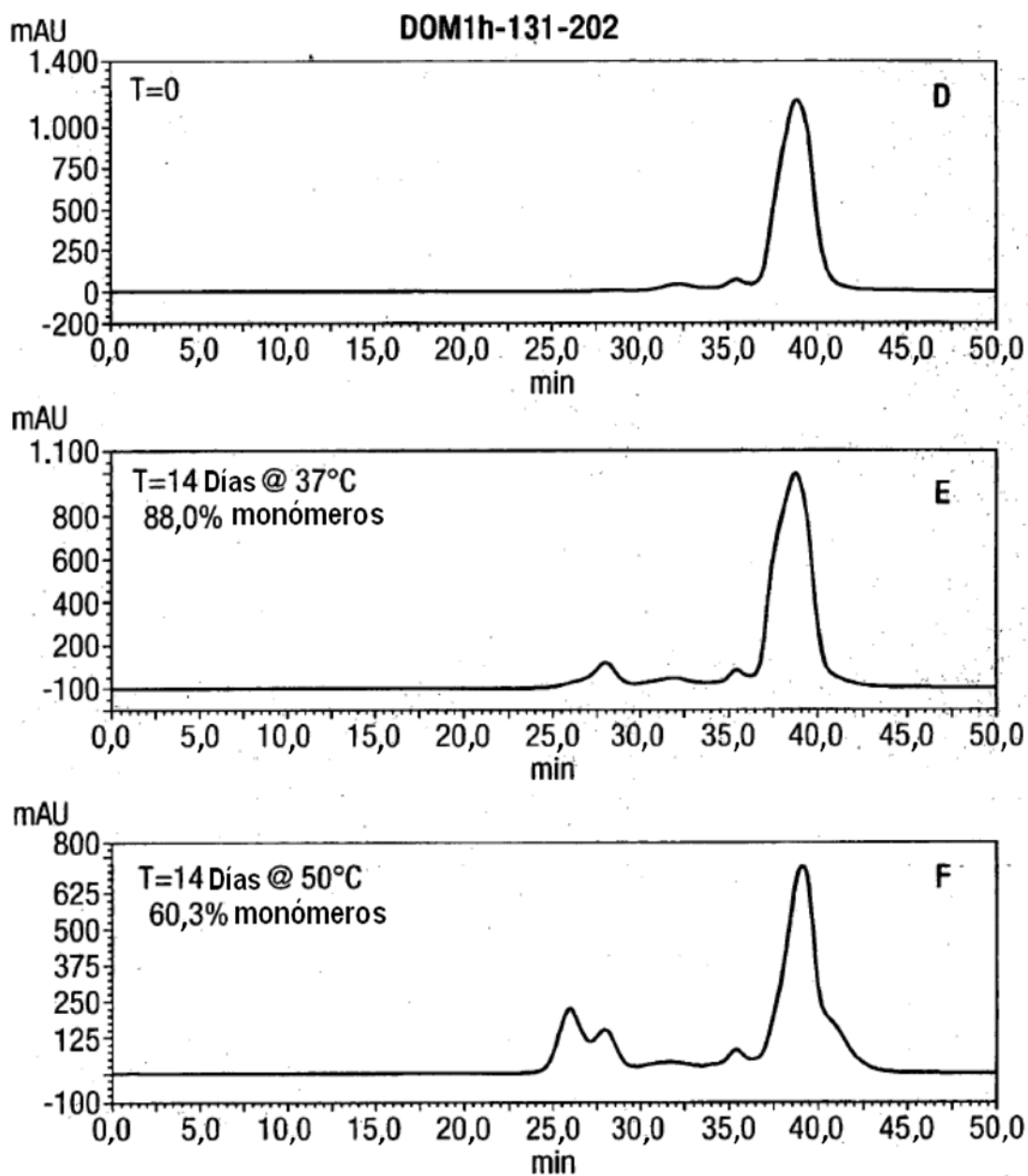


Fig.26 (Cont II).

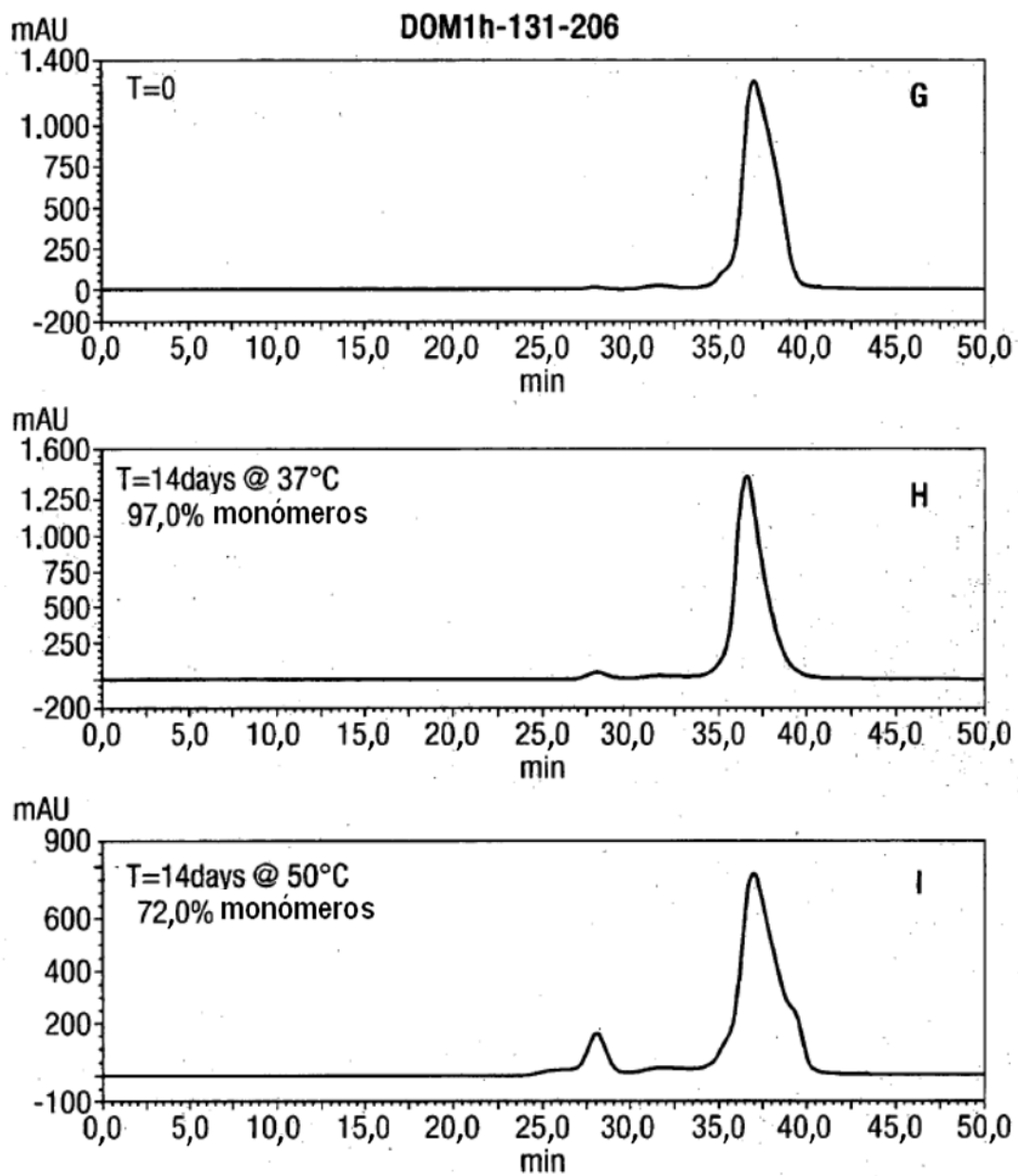


Fig.27.

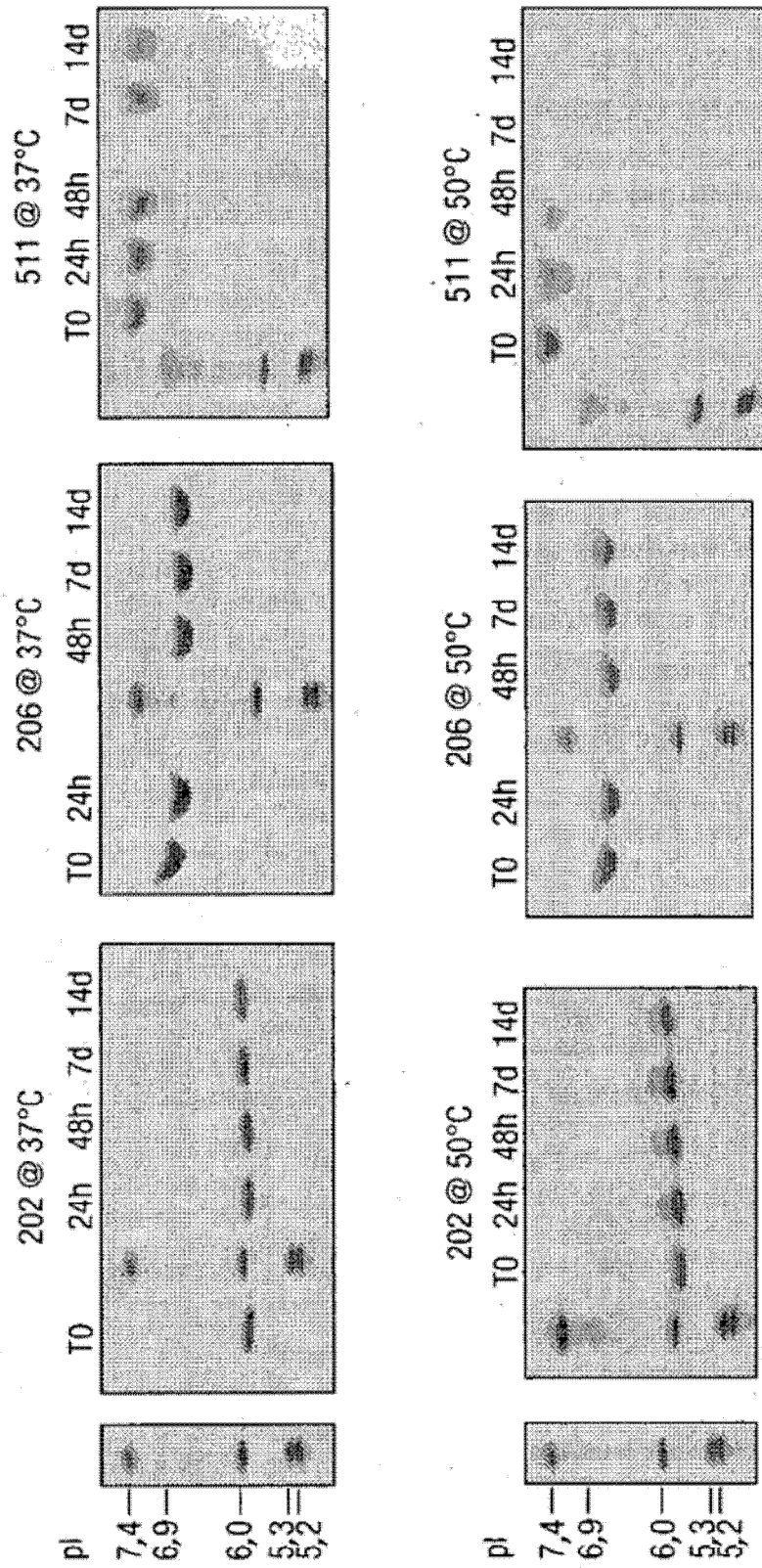


Fig.28.

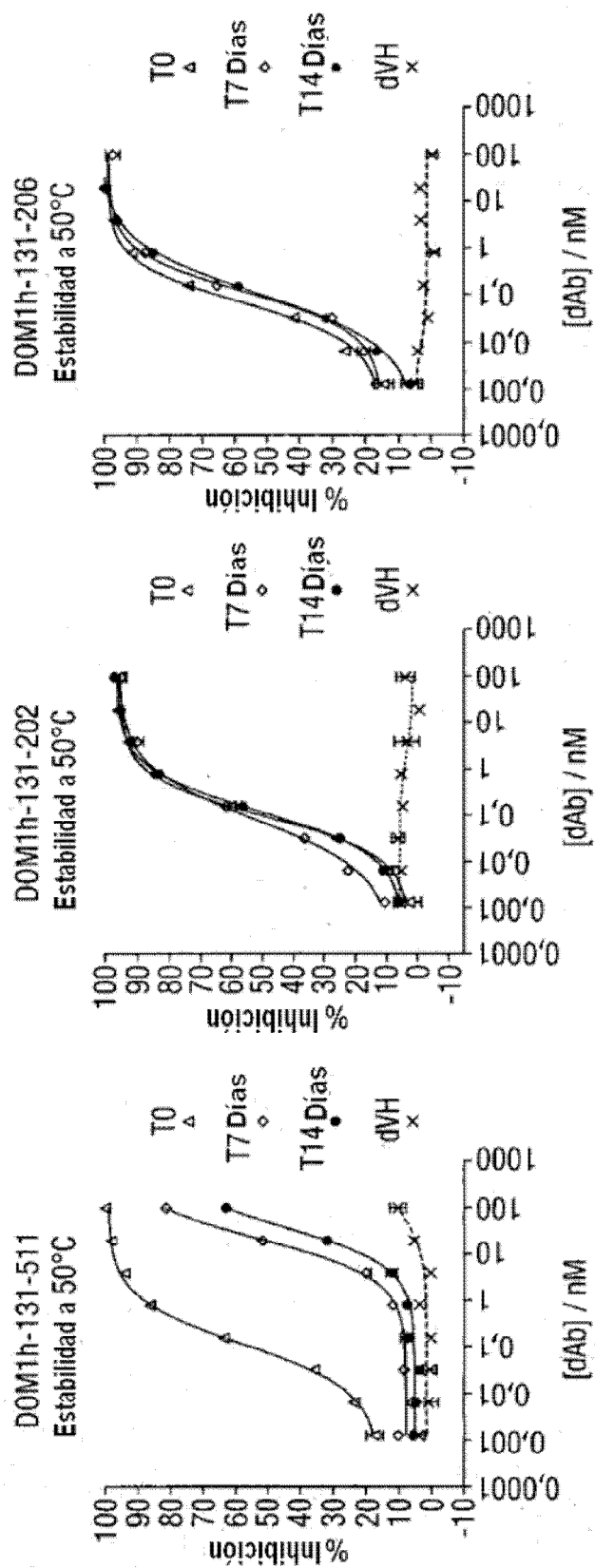


Fig.29.

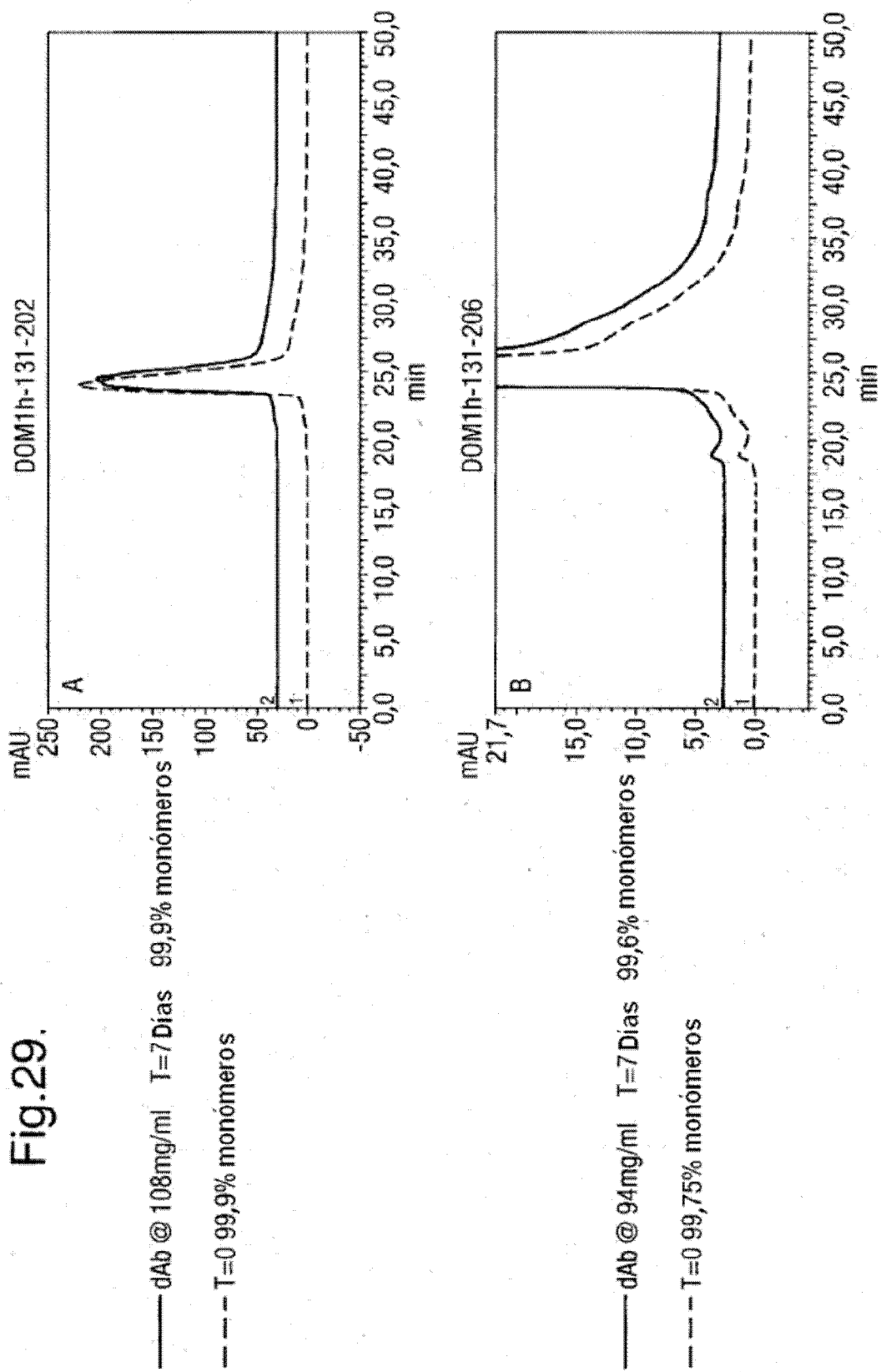


Fig.29 (Cont).

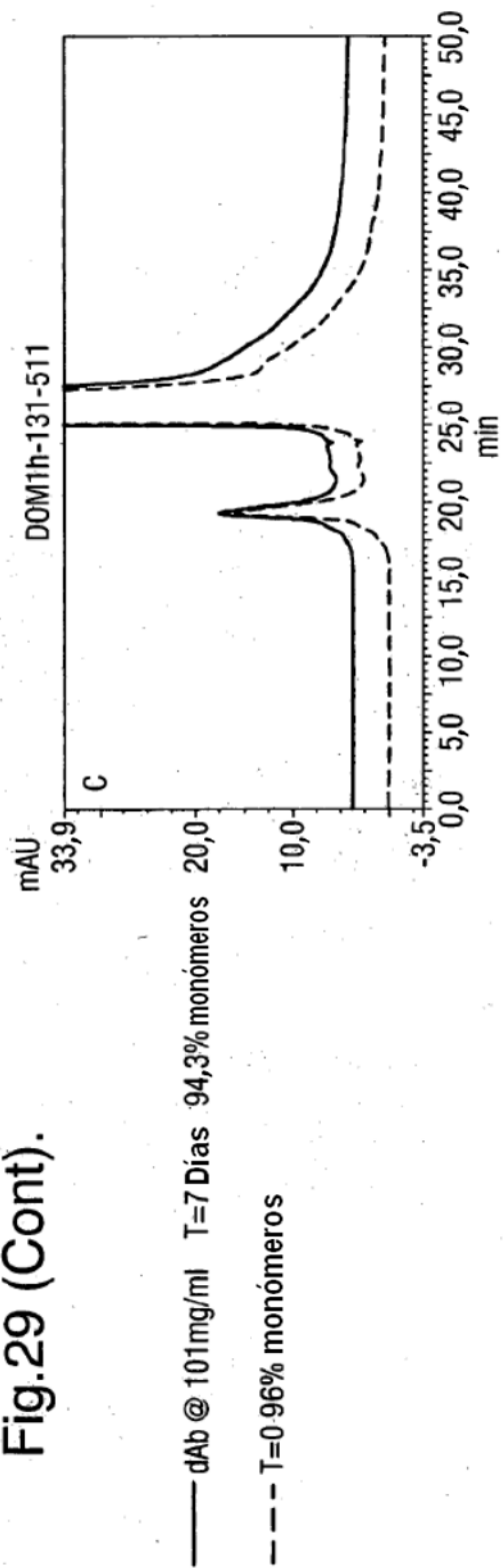


Fig.30.

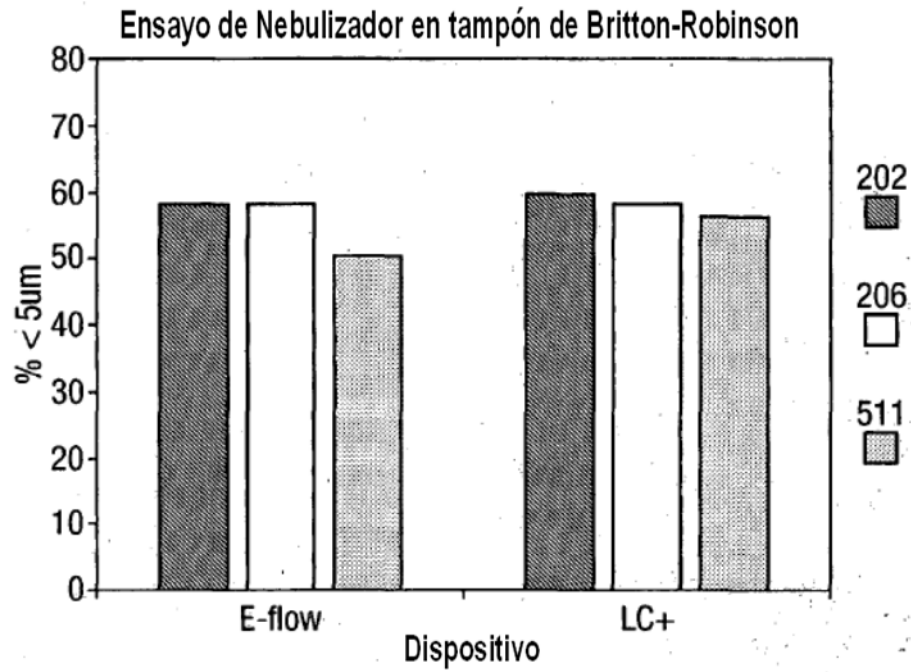


Fig.31.

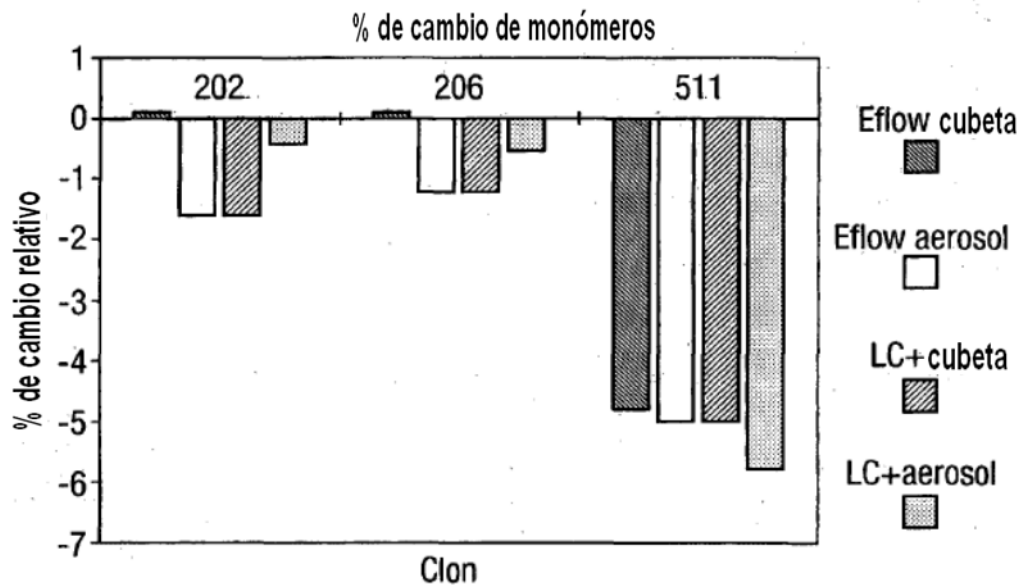


Fig.32.

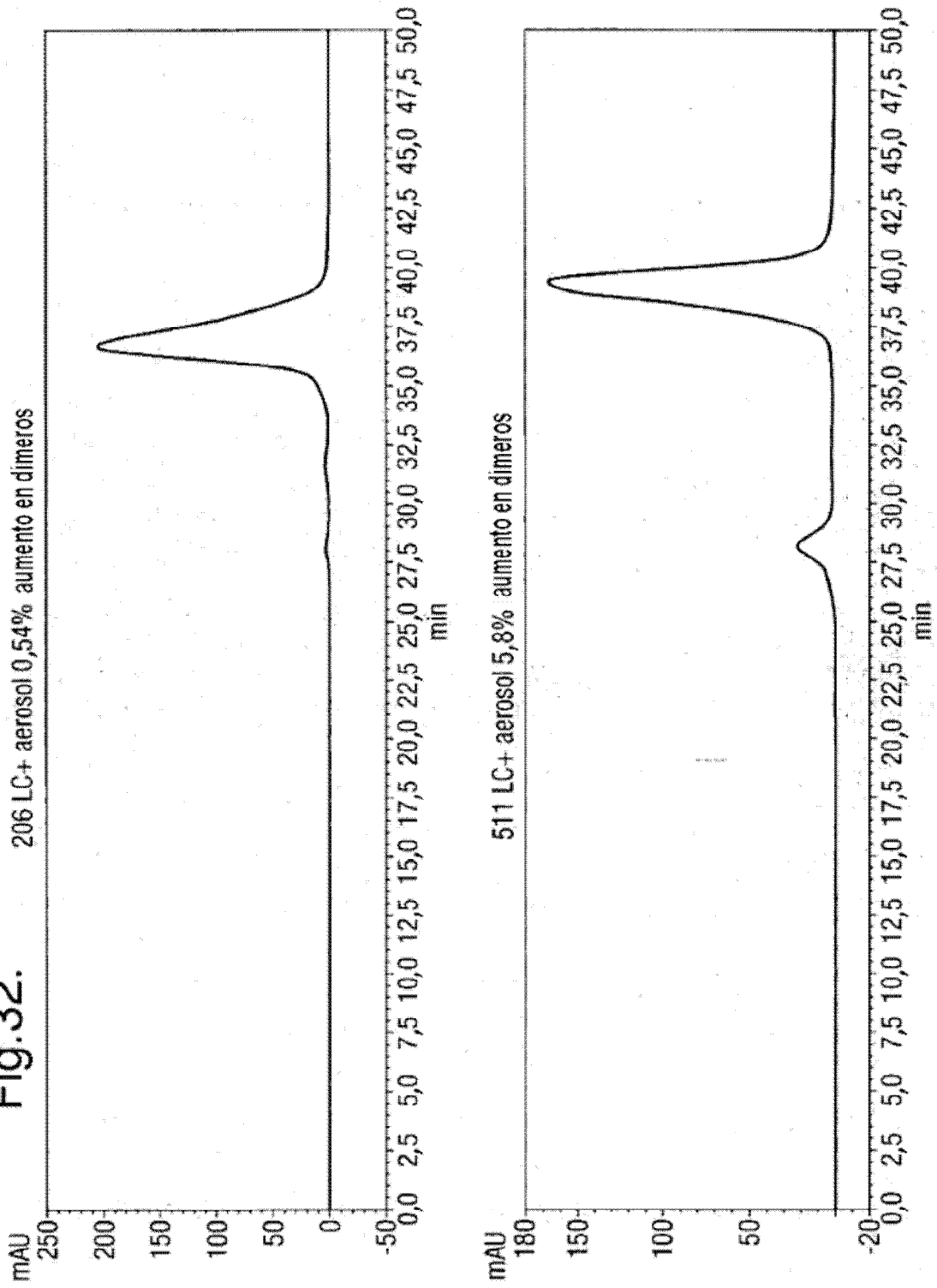
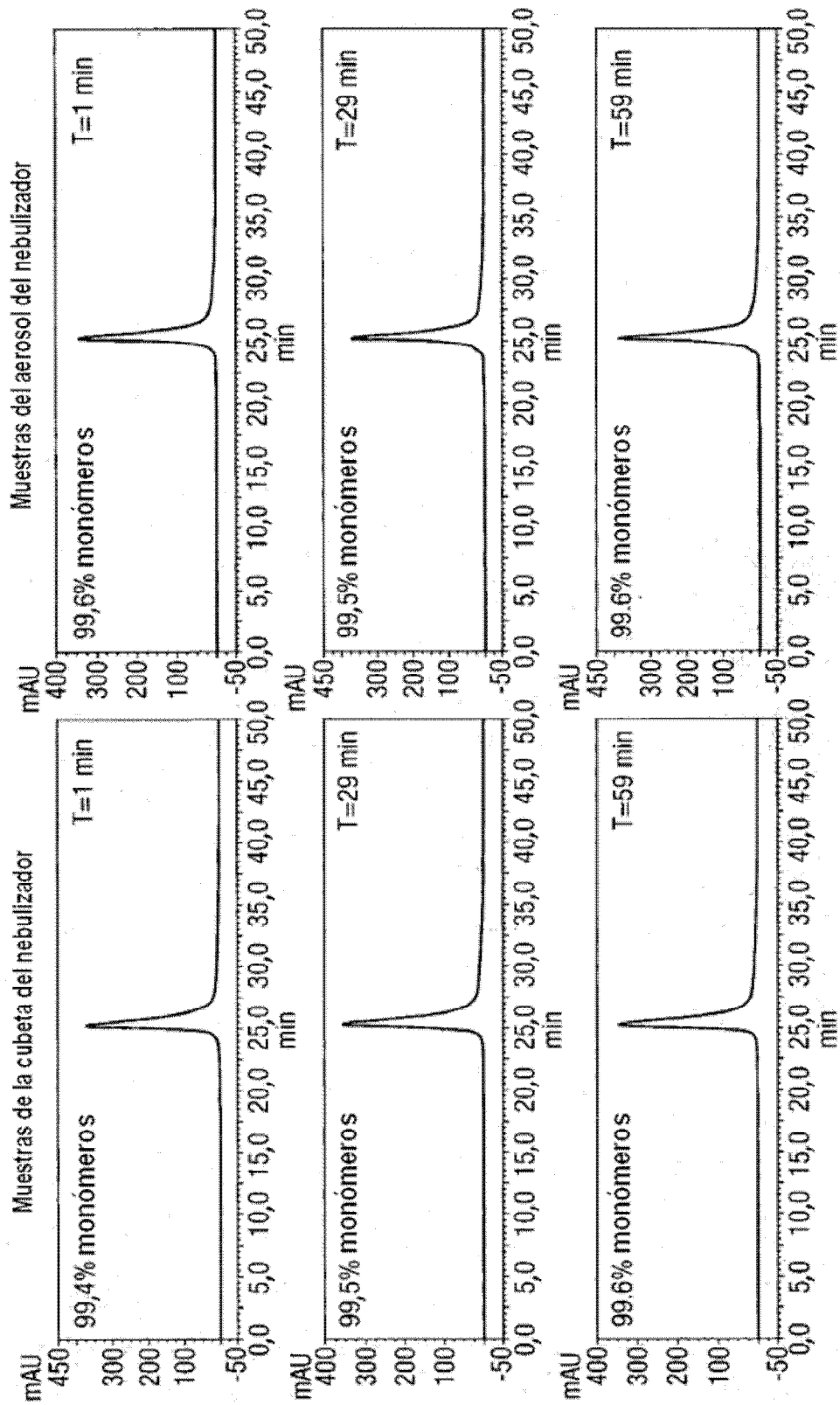


Fig.33.



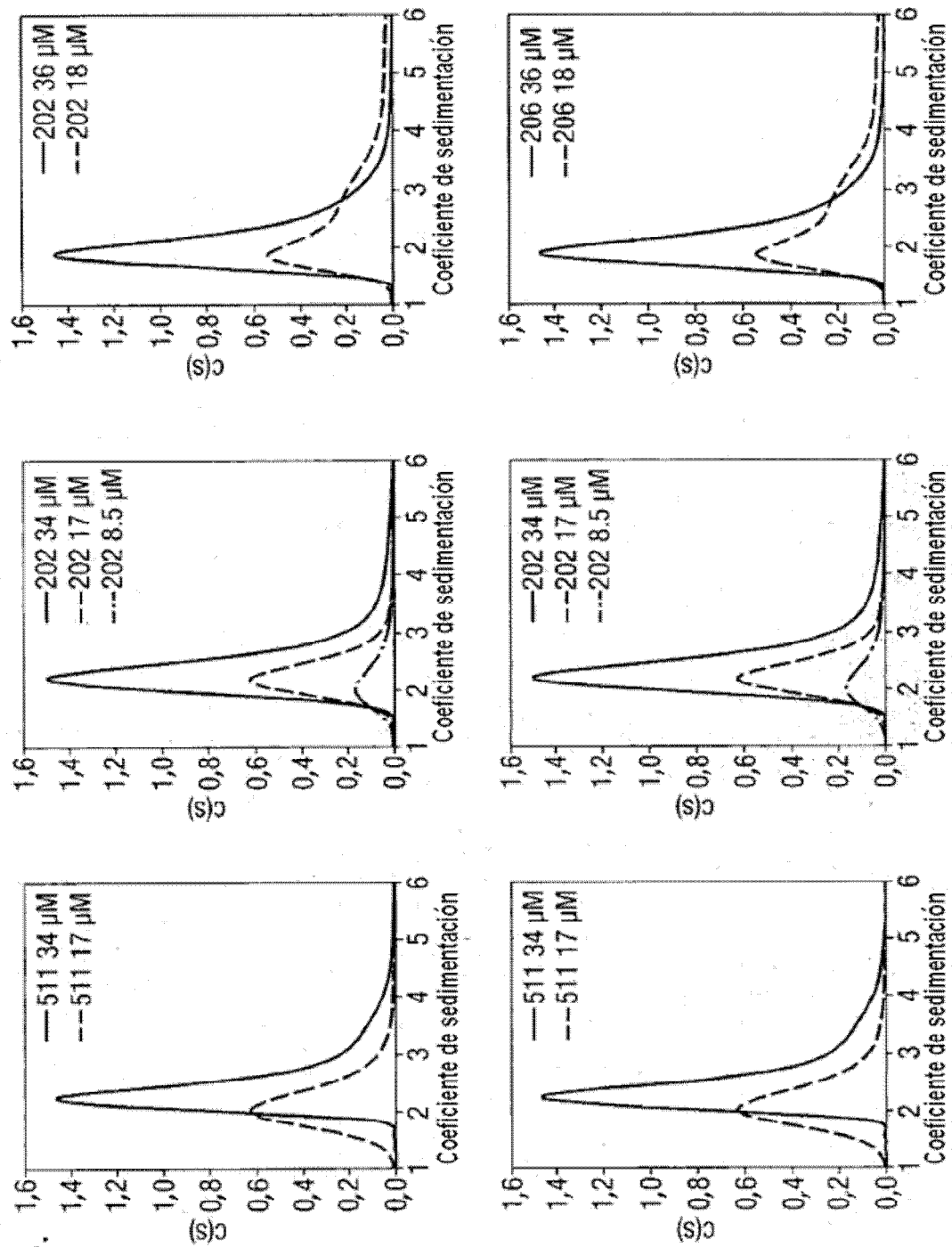


Fig.34.

Fig.35.

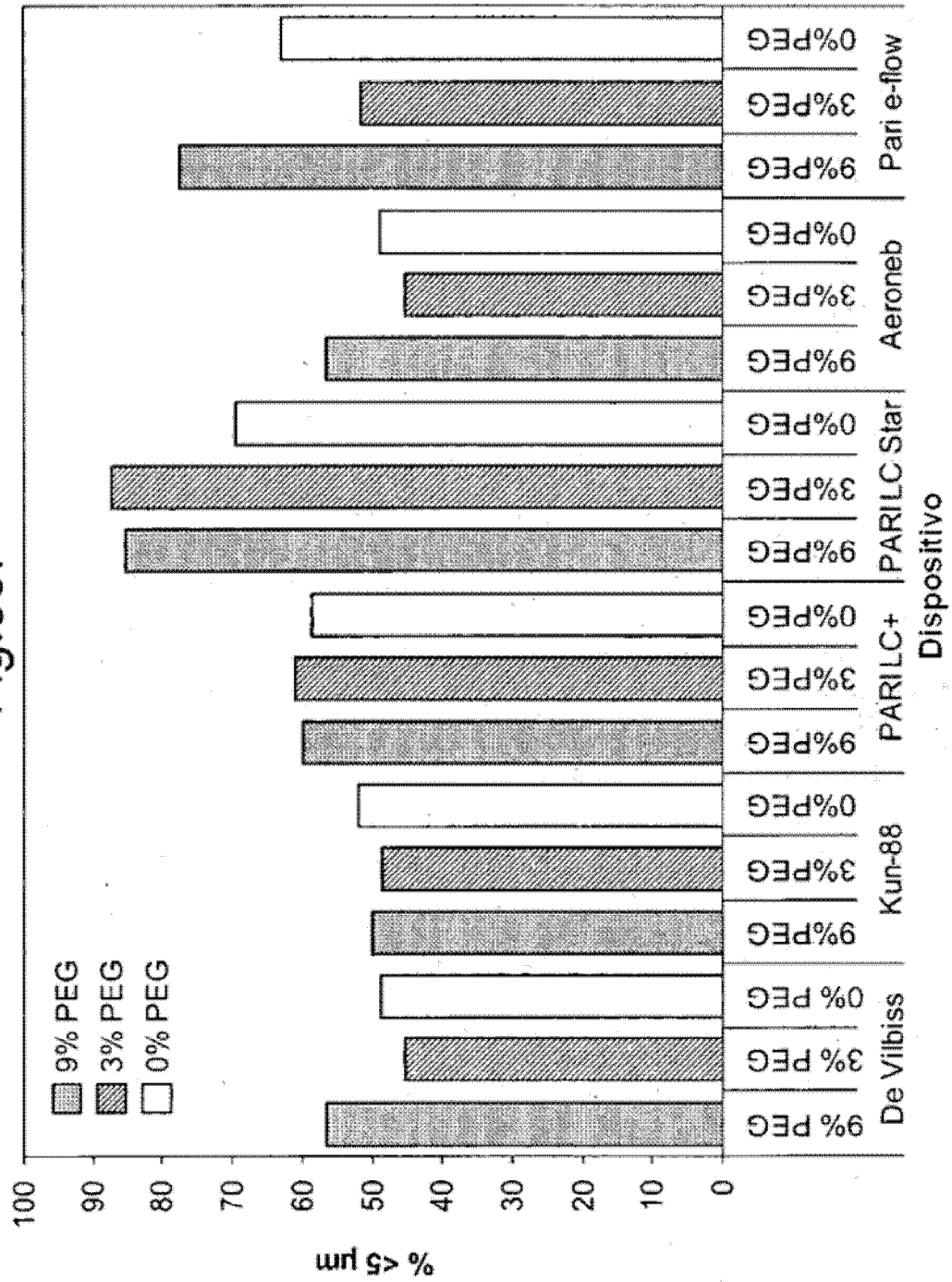


Fig.36.

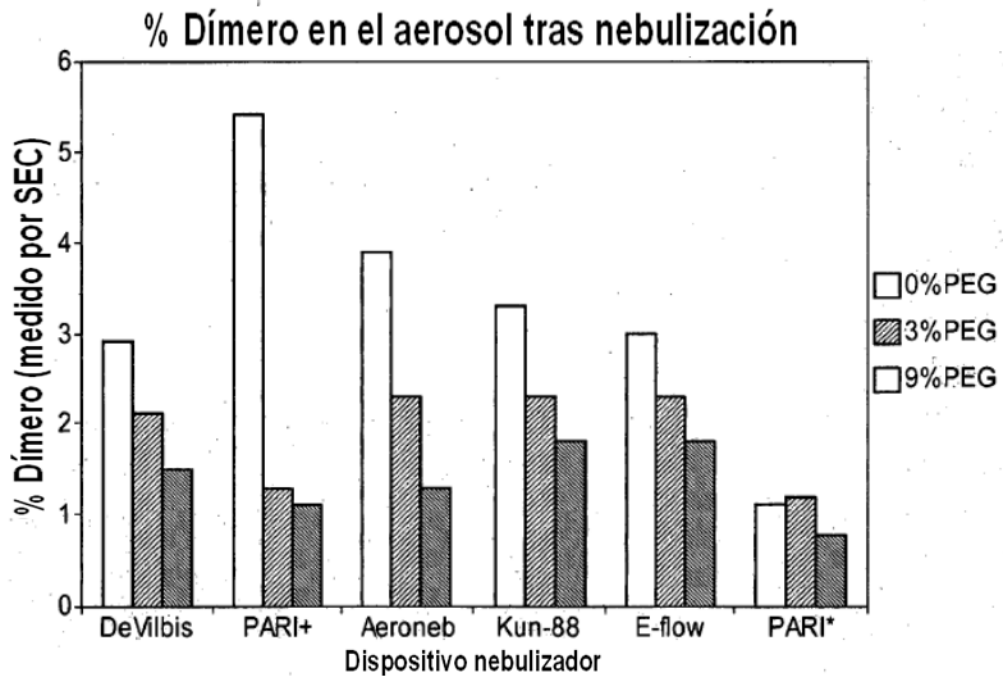
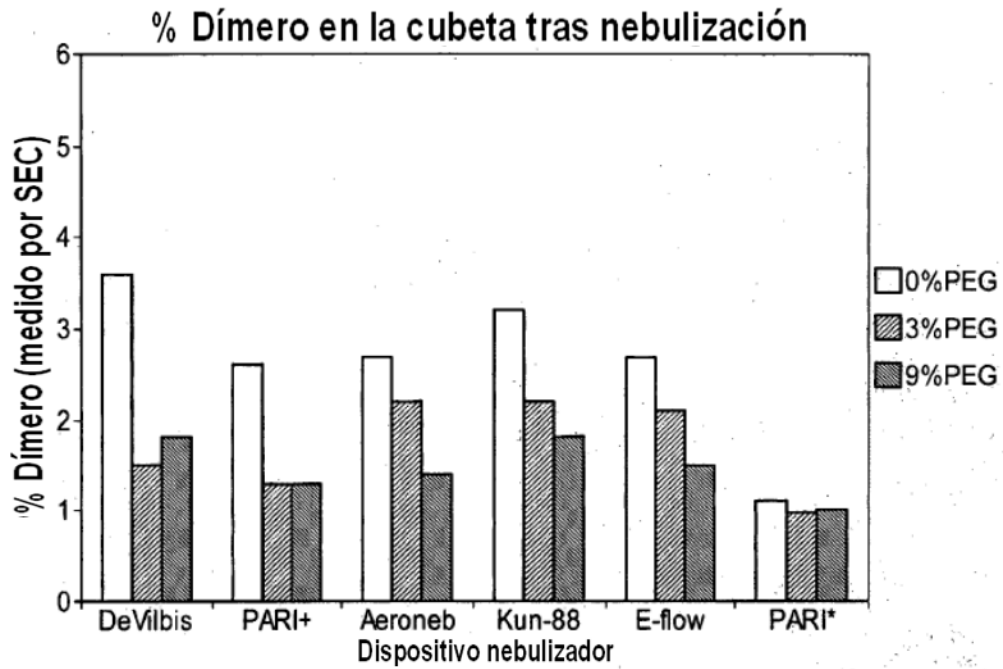


Fig.37.

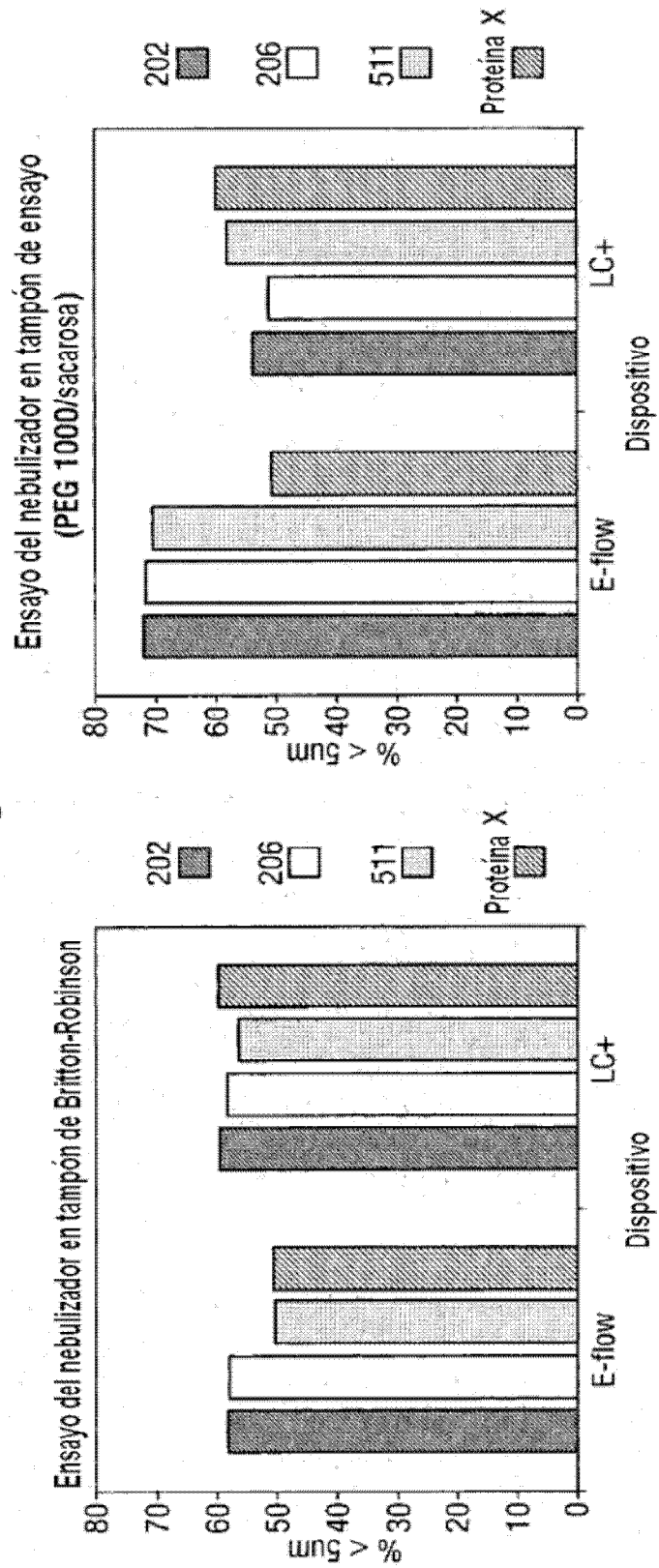


Fig.38.

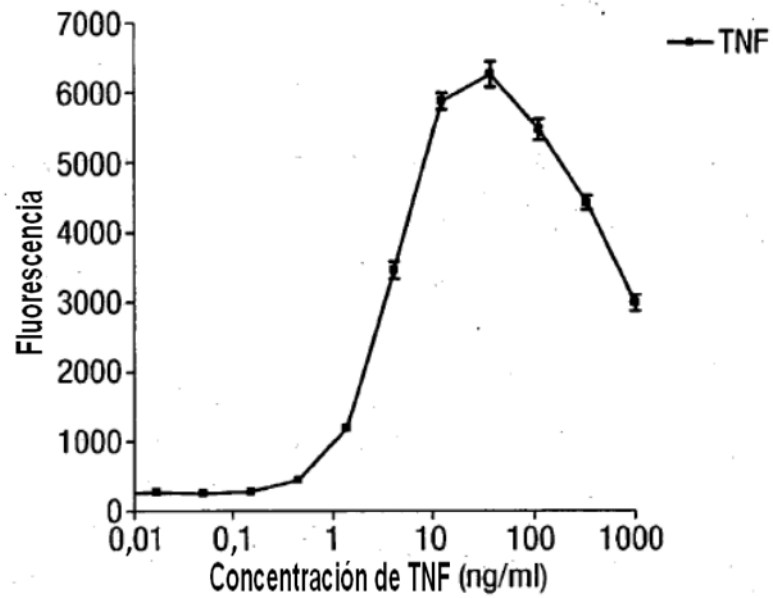


Fig.39.

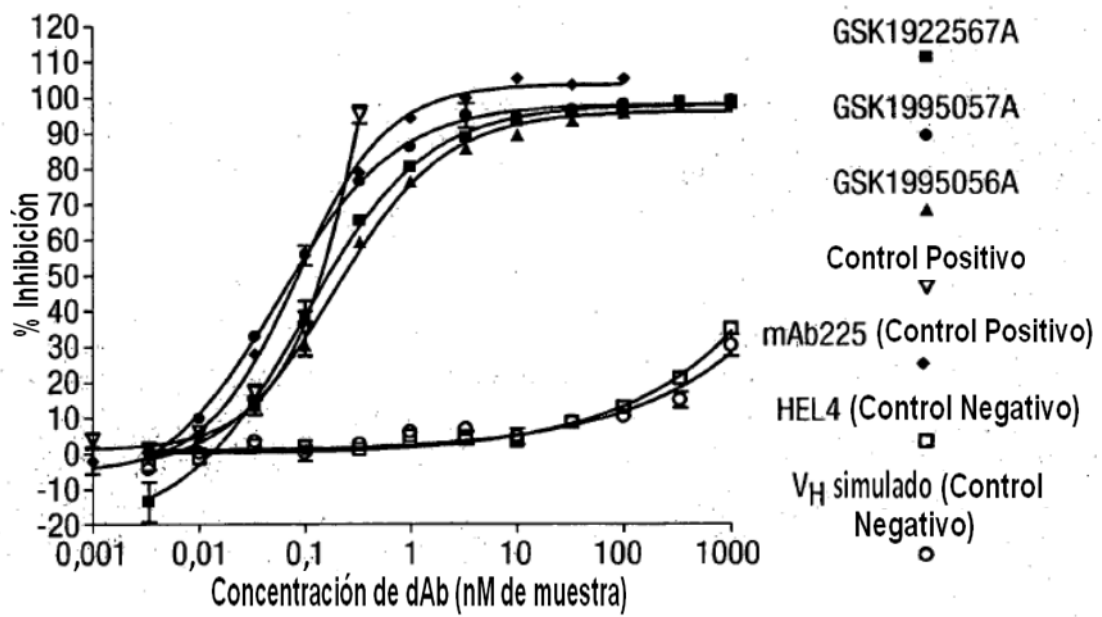


Fig.40.

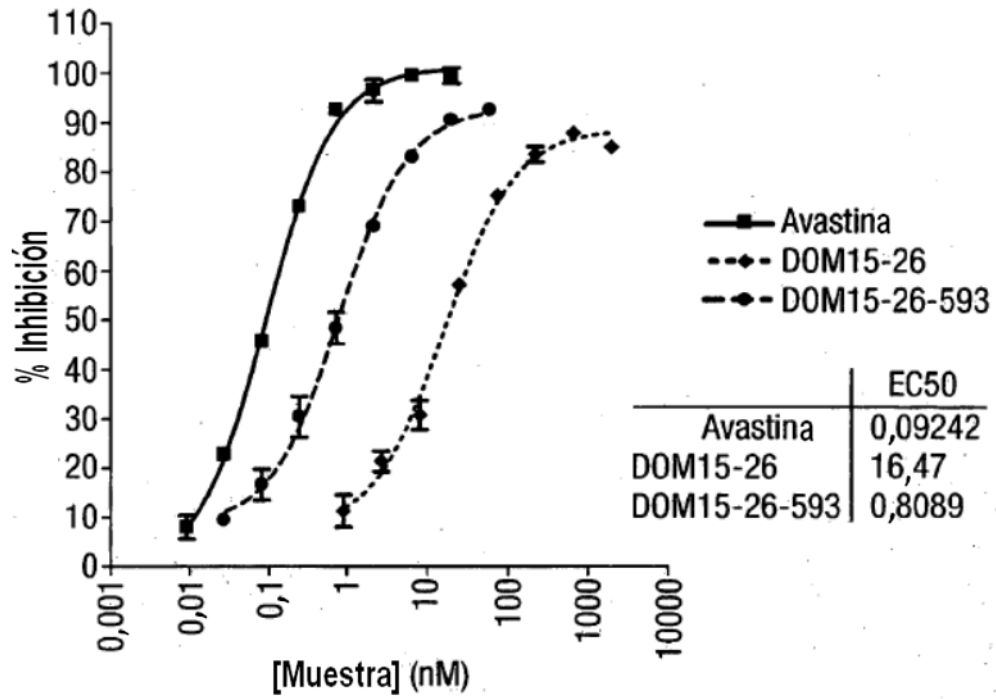


Fig.41.

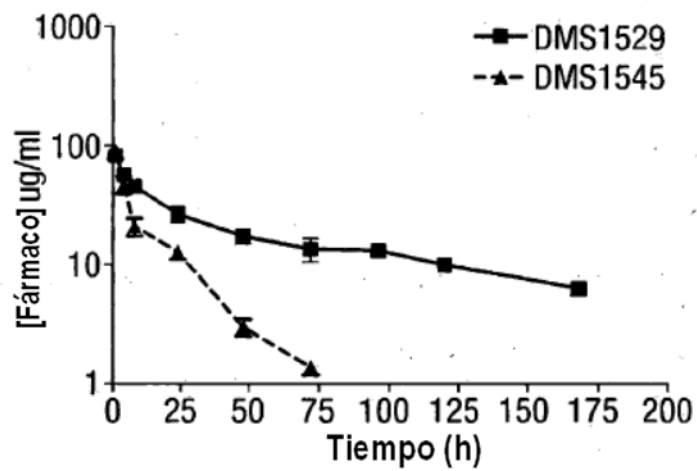


Fig.42a.

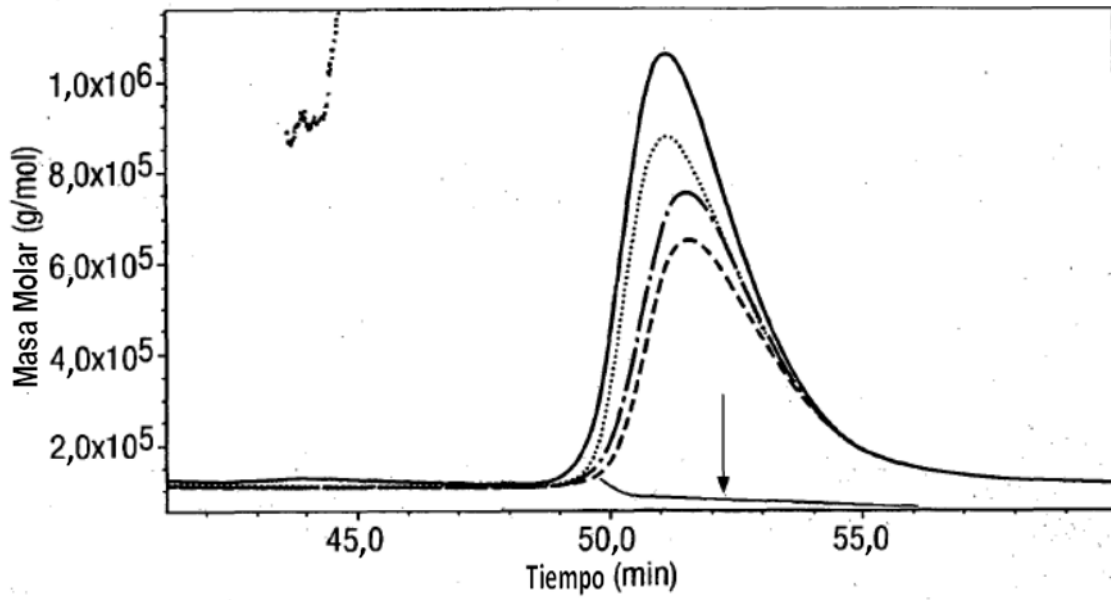


Fig.42b.

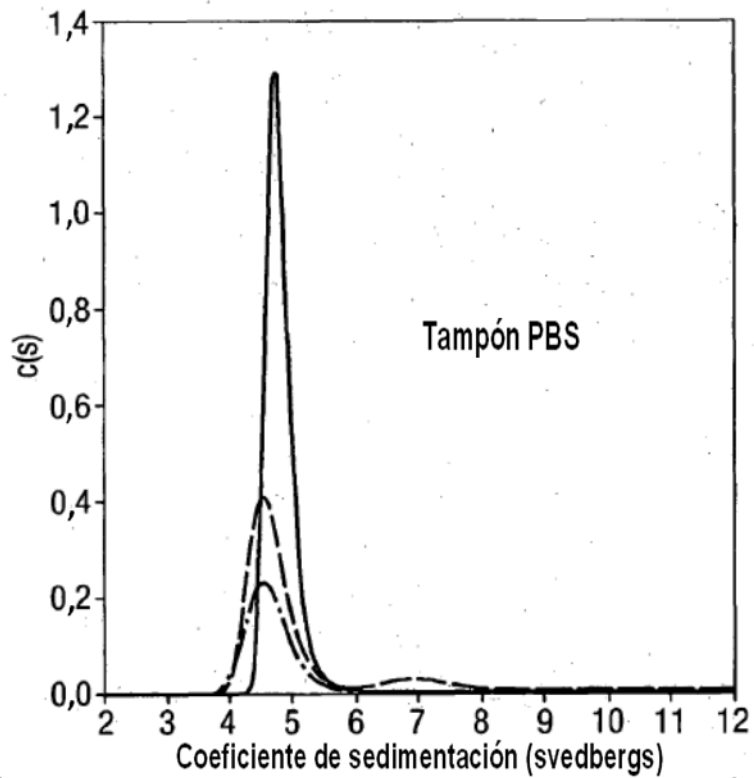
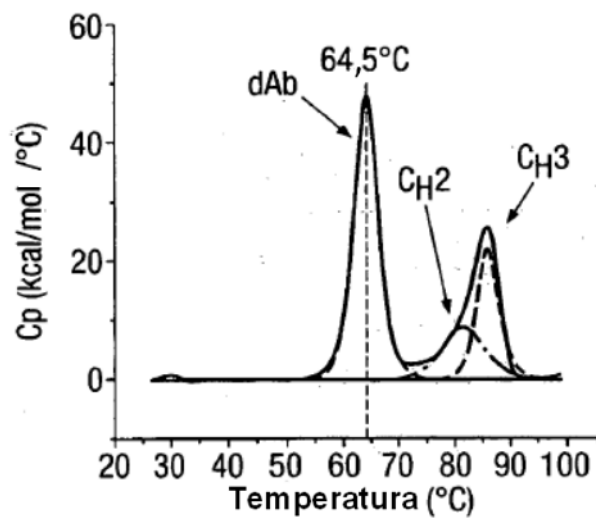
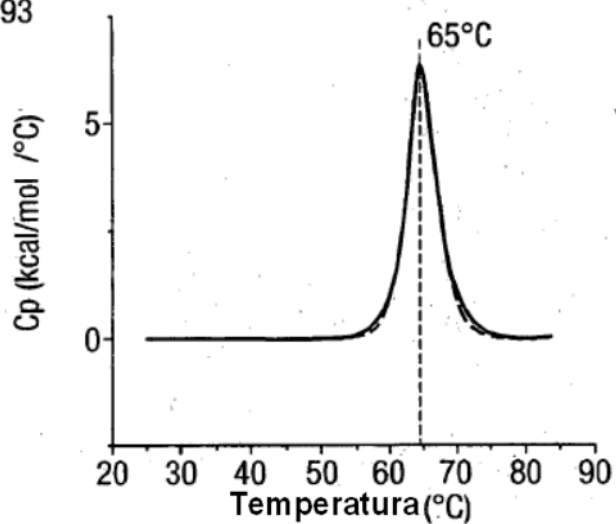


Fig.43.

DMS1529



DOM15-26-593



DOM15-26-601

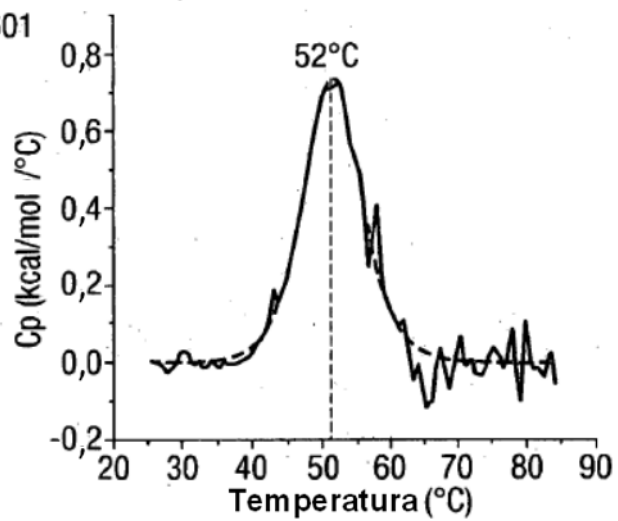
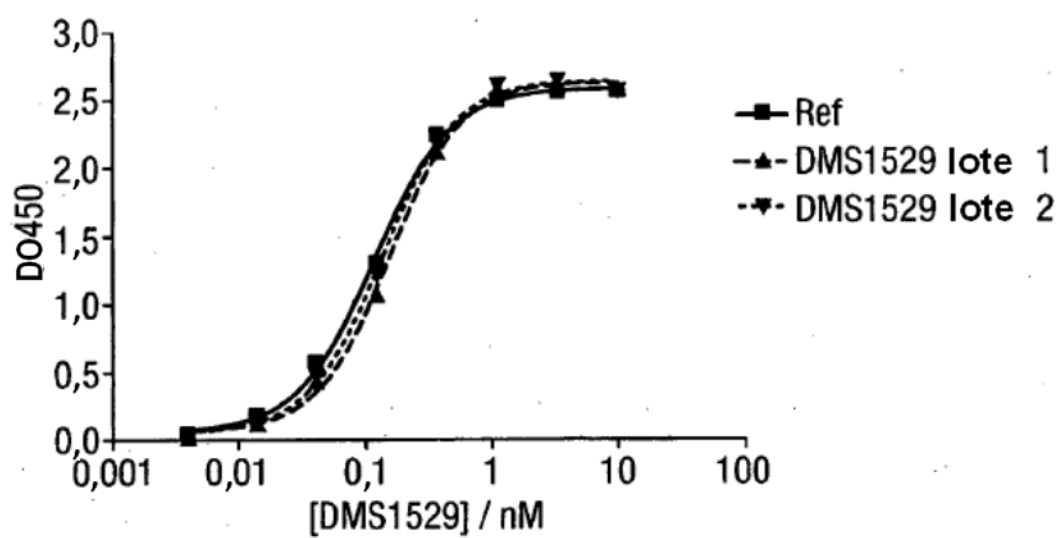


Fig.44.



	Ref	DMS1529 lote 1	DMS1529 lote 2
CE50	0,1167	0,1539	0,1358

Fig.45.

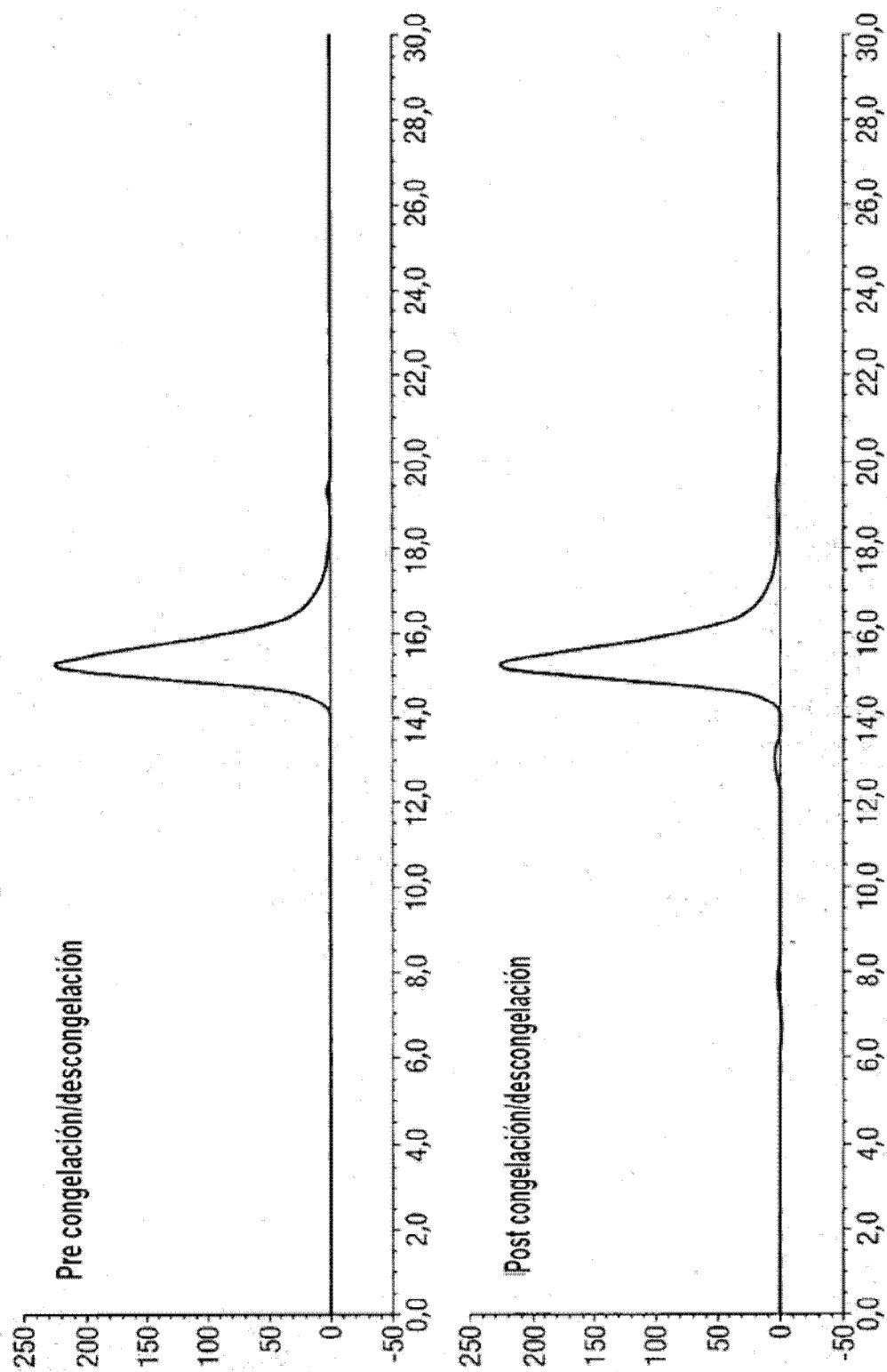
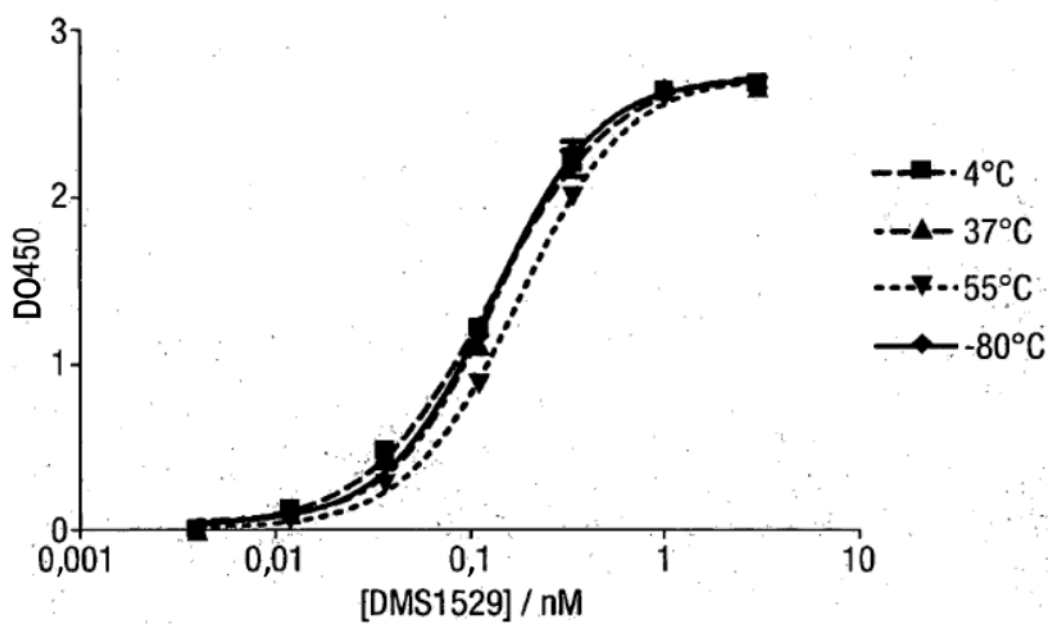
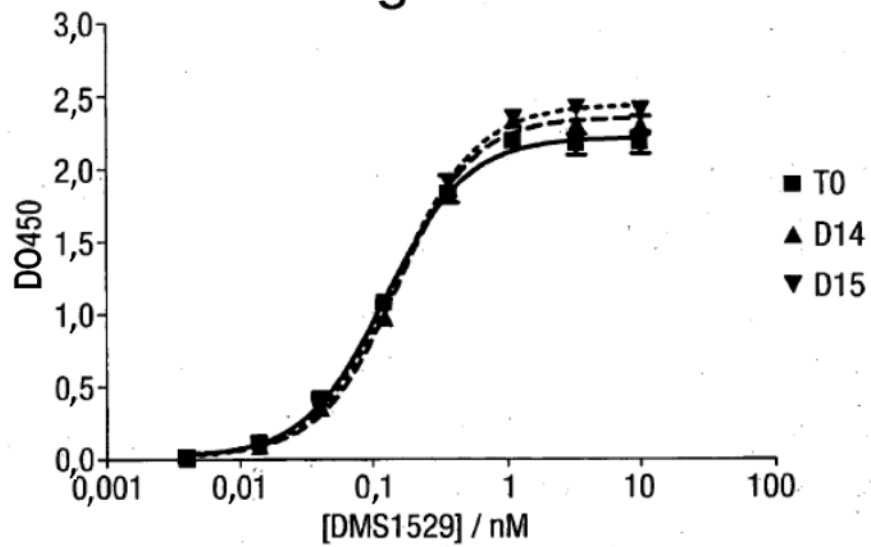


Fig.46.



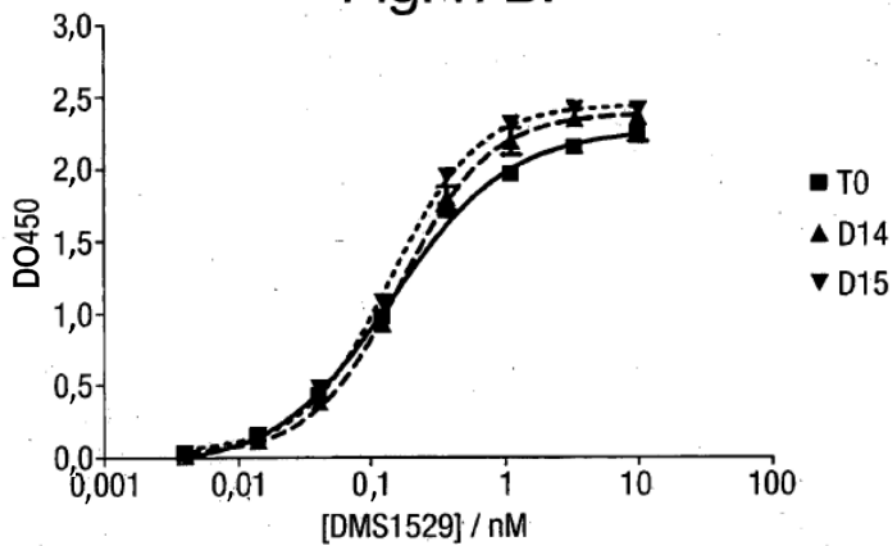
	4°C	37°C	55°C	-80°C
CE50	0,1269	0,1334	0,1748	0,1288

Fig.47A.



	T0	D14	D15
CE50	0,1253	0,1520	0,1495

Fig.47B.



	T0	D14	D15
CE50	0,1453	0,1681	0,1422

Fig.48.

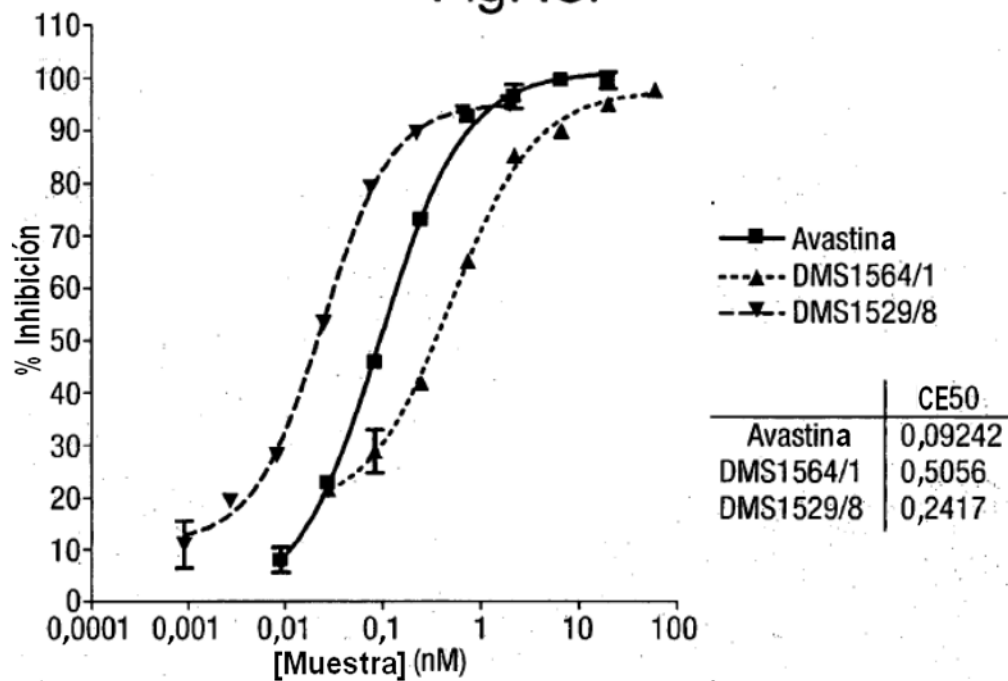
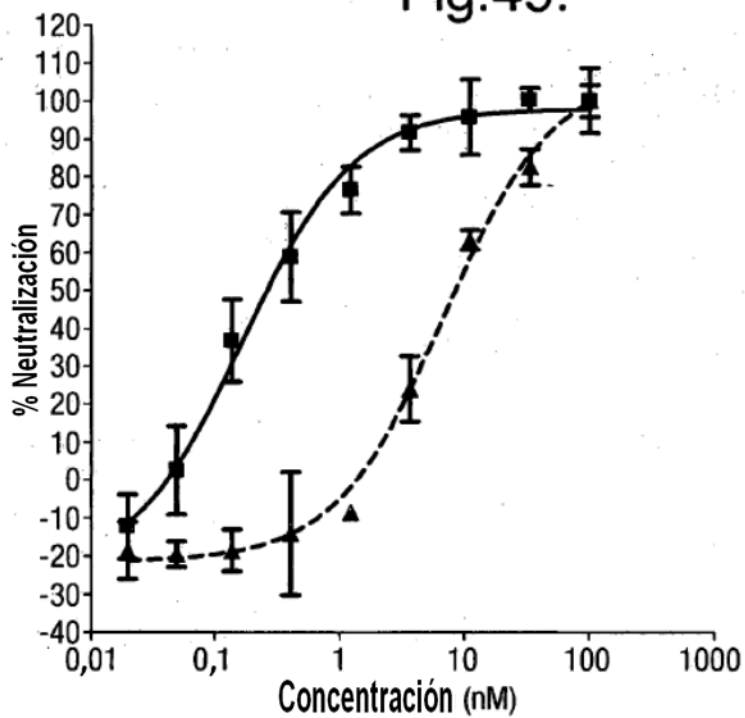


Fig.49.



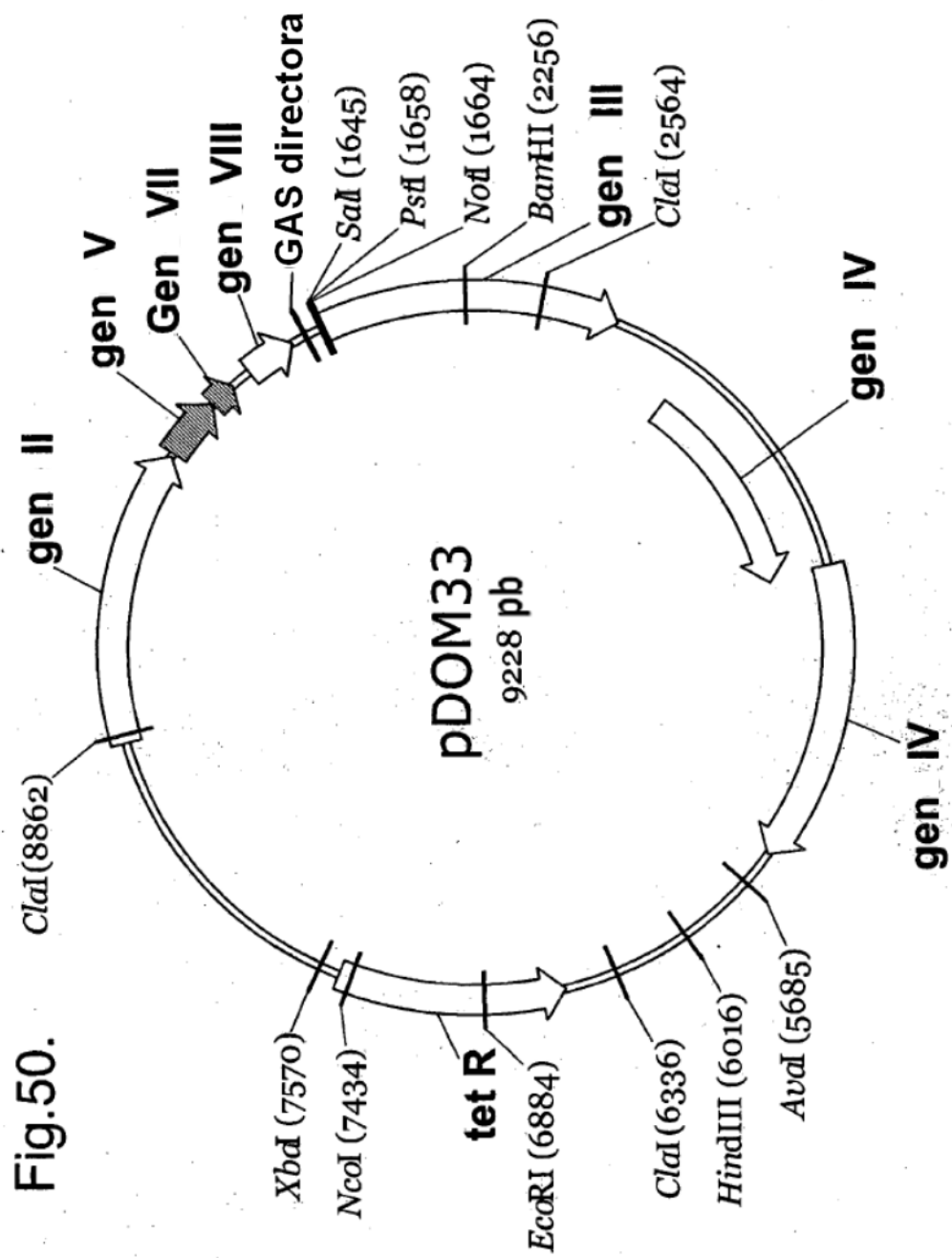


Fig.51a.

Numeración de Kabat	5	10	15	20	25	30	35																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
DOM7h-1	D	I	O	M	T	Q	I	F	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	T	T	I	T	C	R	A	I	C	S	T	S	S	F	L	N	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-10	D	I	O	M	T	Q	I	F	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	T	T	I	T	C	R	A	I	C	S	T	S	S	F	L	N	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-11	D	I	O	M	T	Q	I	F	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	T	T	I	T	C	R	A	I	C	S	T	S	S	F	L	N	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-12	D	I	O	M	T	Q	I	F	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	T	T	I	T	C	R	A	I	C	S	T	S	S	F	L	N	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-13	D	I	O	M	T	Q	I	F	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	T	T	I	T	C	R	A	I	C	S	T	S	S	F	L	N	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-14	D	I	O	M	T	Q	I	F	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	T	T	I	T	C	R	A	I	C	S	T	S	S	F	L	N	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-2	D	I	O	M	T	Q	I	F	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	T	T	I	T	C	R	A	I	C	S	T	S	S	F	L	N	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-3	D	I	O	M	T	Q	I	F	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	T	T	I	T	C	R	A	I	C	S	T	S	S	F	L	N	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-4	D	I	O	M	T	Q	I	F	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	T	T	I	T	C	R	A	I	C	S	T	S	S	F	L	N	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-5	D	I	O	M	T	Q	I	F	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	T	T	I	T	C	R	A	I	C	S	T	S	S	F	L	N	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-7	D	I	O	M	T	Q	I	F	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	T	T	I	T	C	R	A	I	C	S	T	S	S	F	L	N	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-8	D	I	O	M	T	Q	I	F	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	T	T	I	T	C	R	A	I	C	S	T	S	S	F	L	N	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-9	D	I	O	M	T	Q	I	F	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	T	T	I	T	C	R	A	I	C	S	T	S	S	F	L	N	W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
Numeración de Kabat	40	45	50	55	60	65	70																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
DOM7h-1	Y	Q	D	K	F	G	K	A	P	E	L	L	I	T	R	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	A	F	S	D	S	C	G	S	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-10	Y	Q	D	K	F	G	K	A	P	E	L	L	I	T	R	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	A	F	S	D	S	C	G	S	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-11	Y	Q	D	K	F	G	K	A	P	E	L	L	I	T	R	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	A	F	S	D	S	C	G	S	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-12	Y	Q	D	K	F	G	K	A	P	E	L	L	I	T	R	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	A	F	S	D	S	C	G	S	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-13	Y	Q	D	K	F	G	K	A	P	E	L	L	I	T	R	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	A	F	S	D	S	C	G	S	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-14	Y	Q	D	K	F	G	K	A	P	E	L	L	I	T	R	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	A	F	S	D	S	C	G	S	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-2	Y	Q	D	K	F	G	K	A	P	E	L	L	I	T	R	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	A	F	S	D	S	C	G	S	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-3	Y	Q	D	K	F	G	K	A	P	E	L	L	I	T	R	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	A	F	S	D	S	C	G	S	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-4	Y	Q	D	K	F	G	K	A	P	E	L	L	I	T	R	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	A	F	S	D	S	C	G	S	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-5	Y	Q	D	K	F	G	K	A	P	E	L	L	I	T	R	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	A	F	S	D	S	C	G	S	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-7	Y	Q	D	K	F	G	K	A	P	E	L	L	I	T	R	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	A	F	S	D	S	C	G	S	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-8	Y	Q	D	K	F	G	K	A	P	E	L	L	I	T	R	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	A	F	S	D	S	C	G	S	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
DOM7h-9	Y	Q	D	K	F	G	K	A	P	E	L	L	I	T	R	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	A	F	S	D	S	C	G	S	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
Numeración de Kabat	75	80	85	90	95	100	105																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
DOM7h-1	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	T	T	C	Q	T	T	T	V	F	T	T	P	Q	Q	T	K	V	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
DOM7h-10	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	T	T	C	Q	T	T	T	V	F	T	T	P	Q	Q	T	K	V	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
DOM7h-11	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	T	T	C	Q	T	T	T	V	F	T	T	P	Q	Q	T	K	V	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
DOM7h-12	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	T	T	C	Q	T	T	T	V	F	T	T	P	Q	Q	T	K	V	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
DOM7h-13	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	T	T	C	Q	T	T	T	V	F	T	T	P	Q	Q	T	K	V	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
DOM7h-14	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	T	T	C	Q	T	T	T	V	F	T	T	P	Q	Q	T	K	V	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
DOM7h-2	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	T	T	C	Q	T	T	T	V	F	T	T	P	Q	Q	T	K	V	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
DOM7h-3	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	T	T	C	Q	T	T	T	V	F	T	T	P	Q	Q	T	K	V	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
DOM7h-4	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	T	T	C	Q	T	T	T	V	F	T	T	P	Q	Q	T	K	V	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
DOM7h-7	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	T	T	C	Q	T	T	T	V	F	T	T	P	Q	Q	T	K	V	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
DOM7h-8	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	T	T	C	Q	T	T	T	V	F	T	T	P	Q	Q	T	K	V	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
DOM7h-9	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	T	T	C	Q	T	T	T	V	F	T	T	P	Q	Q	T	K	V	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Numeración de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614

Fig.51a (Cont I).

Numeración de Kabat	5	10	15	20	25	30	35																												
<u>DOM7m-12</u>	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	B	Q	S	I	P	R	H	L	K	W
<u>DOM7m-16</u>	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	I	F	H	L	K	W
<u>DOM7m-26</u>	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	Y	H	L	K	W

Numeración de Kabat	40	45	50	55	60	65	70																												
<u>DOM7m-12</u>	Y	Q	Q	K	P	G	R	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	R	L	Q	S	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	T	D
<u>DOM7m-16</u>	Y	Q	Q	K	P	G	R	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	R	L	Q	S	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	T	D
<u>DOM7m-26</u>	Y	Q	Q	K	P	G	R	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	T	D

Numeración de Kabat	75	80	85	90	95	100	105																												
<u>DOM7m-12</u>	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	V	A	L	Y	P	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E
<u>DOM7m-16</u>	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	A	R	W	E	Q	T	F	G	Q	G	T	K	V	E
<u>DOM7m-26</u>	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	V	R	K	V	E	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E

Numeración de Kabat							
<u>DOM7m-12</u>	I	K	R				
<u>DOM7m-16</u>	I	K	R				
<u>DOM7m-26</u>	I	K	R				

Fig.51a
(Cont II).

Numeración de Kabat	5	10	15	20	25	30	35
DOM7-1	D	I	O	T	T	Q	S
DOM7-13	D	I	O	M	T	O	S
DOM7-14	D	I	O	M	T	O	S
DOM7-15	D	I	O	M	T	O	S
DOM7-16	D	I	O	M	T	O	S
DOM7-17	D	I	O	M	T	O	S
DOM7-18	D	I	O	M	T	O	S
DOM7-19	D	I	O	M	T	O	S
DOM7-3	D	I	O	M	T	O	S
DOM7-4	D	I	O	M	T	O	S
DOM7-7	D	I	O	M	T	O	S
DOM7-5	D	I	O	M	T	O	S
DOM7-8	D	I	O	M	T	O	S
Numeración de Kabat	40	45	50	55	60	65	70
DOM7-1	Y	Q	K	F	O	K	A
DOM7-13	Y	Q	K	F	O	K	A
DOM7-14	Y	Q	K	F	O	K	A
DOM7-15	Y	Q	K	F	O	K	A
DOM7-18	Y	Q	K	F	O	K	A
DOM7-17	Y	Q	K	F	O	K	A
DOM7-18	Y	Q	K	F	O	K	A
DOM7-19	Y	Q	K	F	O	K	A
DOM7-3	Y	Q	K	F	O	K	A
DOM7-4	Y	Q	K	F	O	K	A
DOM7-7	Y	Q	K	F	O	K	A
DOM7-5	Y	Q	K	F	O	K	A
DOM7-8	Y	Q	K	F	O	K	A
Numeración de Kabat	75	80	85	90	95	100	105
DOM7-1	F	T	L	T	I	S	L
DOM7-13	F	T	L	T	I	S	L
DOM7-14	F	T	L	T	I	S	L
DOM7-15	F	T	L	T	I	S	L
DOM7-16	F	T	L	T	I	S	L
DOM7-17	F	T	L	T	I	S	L
DOM7-18	F	T	L	T	I	S	L
DOM7-19	F	T	L	T	I	S	L
DOM7-3	F	T	L	T	I	S	L
DOM7-4	F	T	L	T	I	S	L
DOM7-7	F	T	L	T	I	S	L
DOM7-5	F	T	L	T	I	S	L
DOM7-8	F	T	L	T	I	S	L
Numeración de Kabat							
DOM7-1	I	K	A				
DOM7-13	I	K	A				
DOM7-14	I	K	A				
DOM7-15	I	K	A				
DOM7-16	I	K	A				
DOM7-17	I	K	A				
DOM7-18	I	K	A				
DOM7-19	I	K	A				
DOM7-3	I	K	A				
DOM7-4	I	K	A				
DOM7-7	I	K	A				
DOM7-5	I	K	A				
DOM7-8	I	K	A				

Fig.51a (Cont III).

Numeración de Kabat	5	10	15	20	25	30	35
DOM7h-23	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLRLSCAASGPTFYDYNM S
DOM7h-21	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLRLSCAASGPTFDLYDM S
DOM7h-22	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLRLSCAASGPTFSKYWM S
DOM7h-24	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLRLSCAASGPTFHRYSM S
DOM7h-25	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GGLRLSCAASGPTFWKYNM A
DOM7h-26	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLRLSCTASGPTFDLYNM S
DOM7h-27	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLRLSCAASGPTFSDYRM S
DOM7h-30	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLRLSCAASGPTFRITYM A
DOM7h-31	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLRLSCAASGPTFRPTNM S
Numeración de Kabat	40	45	50	54	59	64	69
DOM7h-23	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ITHTQGVITYADSVKGRFT I
DOM7h-21	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	E	IVNEQVRTIYADSVKGRFT I
DOM7h-22	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	E	IDFMQPHIYADSVKGRFT I
DOM7h-24	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ILPQGDTIYADSVKGRFT I
DOM7h-25	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ILGEGNNTIYADSVKGRFT I
DOM7h-26	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ILPEQDRTIYADSVKGRFT I
DOM7h-27	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	IISNGKPTIYADSVKGRFT I
DOM7h-30	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	S	ITSSQSEIYADSVKGRFT I
DOM7h-31	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ITGTGAATYADSVKGRFT I
Numeración de Kabat	74	79	82b	86	91	96	100a
DOM7h-23	ERDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKQNPSTO -
DOM7h-21	ERDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKLNQSYH W
DOM7h-22	ERDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKORTSHL P
DOM7h-24	ERDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKQTFDYM -
DOM7h-25	ERDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKTM DYK -
DOM7h-26	ERDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKQDPLYR -
DOM7h-27	ERDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKQDWMYM -
DOM7h-30	ERDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKVNSLYK -
DOM7h-31	ERDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKQNSRYR E
Numeración de Kabat	100b	105	110				
DOM7h-23	- - - -	F	DYWGQGTILVT VSS				
DOM7h-21	D - - -	F	DYWGQGTILVT VSS				
DOM7h-22	HKGGK	F	DYWGQGTILVT VSS				
DOM7h-24	- - - -	F	DYWGQGTILVT VSS				
DOM7h-25	- - - -	F	DYWGQGTILVT VSS				
DOM7h-26	- - - -	F	DYWGQGTILVT VSS				
DOM7h-27	- - - -	F	DYWGQGTILVT VSS				
DOM7h-30	- - - -	F	DYWGQGTILVT VSS				
DOM7h-31	- - - -	D	YWGQGTILVT VSSX				

Fig.51a (Cont IV).

Numeración de Kabat	5	10	15	20	25	30	35
DOM7r-20	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGPTFWPYTHS
DOM7r-27	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGPTFWPYTHS
DOM7r-28	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGPTFMAYQMA
DOM7r-21	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGPTFWPYTHS
DOM7r-25	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGPTFWPYTHS
DOM7r-22	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGPTFWPYTHS
DOM7r-23	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGPTFWPYTHS
DOM7r-24	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGPTFWPYTHS
DOM7r-26	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGPTFWPYTHS
DOM7r-29	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGPTFKDYDMT
Numeración de Kabat	40	45	50	54	59	64	69
DOM7r-20	WVRQ	A	FGKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFTI
DOM7r-27	WVRQ	A	FGKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFTI
DOM7r-28	WVRQ	A	FGKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFTI
DOM7r-21	WVRQ	A	FGKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFTI
DOM7r-25	WVRQ	A	FGKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFTI
DOM7r-22	WVRQ	A	FGKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFTI
DOM7r-23	WVRQ	A	FGKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFTI
DOM7r-24	WVRQ	A	FGKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFTI
DOM7r-26	WVRQ	A	FGKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFTI
DOM7r-29	WVRQ	A	FGKG	L	EWVS	N	ISPPGSTTYTADSVKGRFTI
Numeración de Kabat	74	79	82b	86	91	96	100a
DOM7r-20	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVVYCAKGGGDF-
DOM7r-27	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVVYCAKEDVLKTG
DOM7r-28	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVVYCAKVRKMRPY
DOM7r-21	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVVYCAKGNLEDF-
DOM7r-25	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVVYCAKETGPSEF
DOM7r-22	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVVYCAKELGKGF-
DOM7r-23	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVVYCAKVVEDNTF
DOM7r-24	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVVYCAKNTGGGQF
DOM7r-26	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVVYCAERTENRCV
DOM7r-29	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVVYCAKGPRLFP R
Numeración de Kabat	100c	105	110				
DOM7r-20	- - -	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
DOM7r-27	LDGF	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
DOM7r-28	KF -	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
DOM7r-21	- - -	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
DOM7r-25	- - -	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
DOM7r-22	- - -	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
DOM7r-23	- - -	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
DOM7r-24	- - -	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
DOM7r-26	SP -	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
DOM7r-29	TF -	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX

Fig.51a (Cont V).

dAb 2, 4, 7, 41

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASPLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSVPPTFGQGTKVEIKR

dAb 38, 54

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYRASPLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYRIPPTFGQGTKVEIKR

dAb 46, 47, 52, 56

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIKSLKWKYQQKPGKAPKLLIYNASYLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVVPVTFGQGTKVEIKR

dAb 13, 15

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIYYHLKWKYQQKPGKAPKLLIYKSTLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVRKVPRTFGQGTKVEIKR

dAb 30, 35

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIIRYLKWKYQQKPGKAPKLLIYQASVLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGLYPPITFGQGTKVEIKR

dAb 19,

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIYNHLKWKYQQKPGKAPKLLIYRASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNVVIPRTFGQGTKVEIKR

dAb22

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSILWHLKWKYQQKPGKAPKLLIYHASLLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSAVYPKTFGQGTKVEIKR

dAb23

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIIRYLKWKYQQKPGKAPKLLIYHASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRLLYPKTFGQGTKVEIKR

dAb24

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIIFYLKWKYQQKPGKAPKLLIYPASKLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRARWPRTFGQGTKVEIKR

dAb31

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIIWHLKWKYQQKPGKAPKLLIYRASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVARVPRTFGQGTKVEIKR

dAb33

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIIRYLKWKYQQKPGKAPKLLIYKASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVVGYPRTFGQGTKVEIKR

dAb34

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSILKYLKWKYQQKPGKAPKLLIYNASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTTYYPITFGQGTKVEIKR

dAb53

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSILRYLKWKYQQKPGKAPKLLIYKASWLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVLYYPQTFGQGTKVEIKR

dAb11

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSILRLKWKYQQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVVPVTFGQGTKVEIKR

Fig.51a (Cont VI).

dab12

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIFRHLKWKYQQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVALYPKTFGQGTKVEIKR

dab17

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIRKYLWKYQQKPGKAPKLLIYTASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLFWPRTFGQGTKVEIKR

dab18

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIRRYLNWKYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLFYPTFGQGTKVEIKR

dab16, 21

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIKHLKWKYQQKPGKAPKLLIYGASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGARWPQTFGQGTKVEIKR

dab25, 26

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIYHLKWKYQQKPGKAPKLLIYKASTLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVRKVPRTFGQGTKVEIKR

dab27

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIYKHLKWKYQQKPGKAPKLLIYNASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVGRIYPTFGQGTKVEIKR

dab55

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIFKSLKWKYQQKPGKAPKLLIYNASYLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVVYWPVTFGQGTKVEIKR

dab 8, 10

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFWVYQMDWVRQAPGKGLEWVSSISAFGAKTL
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLSGKFDYWGQGT LTVSS

dab 36

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFWSYQMTWVRQAPGKGLEWVSSISSFGSSTL
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRDHNYS LFDYWGQGT LTVSS

Fig.51b.

>DOM7h-1

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATTCCTTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCC
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATACTG TTCCTCCTAC GTTTGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACAG

>DOM7h-10

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCACCCTCC CTGTCCGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATTCCTTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTATTCGA TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-11

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCG TCCGATTGGG ACGACGTTAA GTTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTGGTTT GGTTCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCGCAG GCTGGGACGC ATCCTACGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-12

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTAA GTATATTGGT TCGCAGTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCGCTTGG GCGTCCGTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCTCAG GGTGCTGCGT CGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-13

GACATTCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTTATTTTAT CGGTATTTAT CGTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGTCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCGTCCTATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CATGCTCATT TGCCTCGTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont I).

>DOM7h-14

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGG TCTCAGTTAT CTTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCATGTGG CGTTCCTCGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT

GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCTCAG GGTGCGGCGT TGCCTAGGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont II).

>DOM7h-2

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTGCT ACTTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGG TCTTCCTCTT TGCAAAGCGC GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGTT TTCACACTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATGCTG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-3

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGAT ACTGGGTTAG CGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATAAT GTGTCCAGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATTGGGGTA GTCCTACGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-4

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGAGATTAT TCGTGGTTAG CGTGGTACCA GCAGAGACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCTTCCCAT TGC AAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTGATTGGTG ATCCTGTTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-6

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTACGCTCCT GATCTATCGG TTGTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTATAATG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-7

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATCTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGG AATTCCTAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTTTGGCG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGG

Fig.51b (Cont III).

>DOM7h-8

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATTCCCCTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATAGGG TGCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont IV).

>DOM7h-9

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTGGG TTGTGGTTAC ATTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGG TCTTCCTTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGTATAATT TGCCTTATAC GTCCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-12

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTITT CGGCATTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCG GCATCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTGGCGTGT ATCCTAAGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-16

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTATT AAGCATTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGGT GCATCCCGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GGGGCTCGGT GGCCTCAGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-26

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAT TATCATTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAG GCATCCACGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTCGGAAGG TGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-1

GACATCCAGA CGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATCGTA TGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TAGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont V).

>DOM7r-13

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTCAT AGGGAGTTAA GGTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG GCGTCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGTATCTGC CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont VI).

>DOM7r-14

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTCAT AGGGAGTTAA GGTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG GCGTCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATAGGG TGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-15

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGTATTGGG CGGAGGTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGGACAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATCGT ACGTCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTCGCAGT GGCCTCATACT GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-16

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTTAT AAGAATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT TCTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATCTGT CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-17

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTTAT AATAATTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT ACTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGATGGCGTG CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-18

GACATTCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTTAT AAGTCGTTAG GGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG TCTTCTTTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATCAGA TGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont VII).

>DOM7r-19

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTATCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTTAT AGGCATTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GCGTCCAGGT TGCAAAGTGG GGTCCCAACA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTCATAATC CTCCTAAGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont VIII).

>DOM7r-3

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATATGC AGCCTTTTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-4

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCCGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGT CGGTATTTAC GGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GGGTCCAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGGTATCTTC AGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-7

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATTCTT CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA GCGG

>DOM7r-5

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTTCG CGTCAGTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATGGG GCGTCCGTTT TGCAAAGCGG GATCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATATTA CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAAGTCAA ACGG

>DOM7r-8

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTCAAT AGGCAGTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTAT GCTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTTTTCTA AGCCTTCTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Fig.51b (Cont IX).

>DOM7h-23

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTAT GATTATAATA TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTACGCATA CGGGTGGGGT TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGAAT
CCTTCTTATC AGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

Fig.51b (Cont X).

>DOM7h-21

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT CTTTATGATA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGTTAATT CGGGTGTTAG GACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACTTAAT
 CAGAATTATC ATTGGGATTT TGACTIONTGG GGTACAGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC

>DOM7h-22

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG AAGTATTGGA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTGATTTTA TGGGTCCGCA TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGAGG
 ACGTCGATGT TGCCGATGAA GGGGAAGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC
 GTCTCGAGC

>DOM7h-24

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCAT CGTTATTGGA TGTCCTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTTGCCCTG GTGGTGATGT TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGACG
 CCTGATTATA TGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-25

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG AAGTATAATA TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTCTTGGTG AGGGTAATAA TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAACGATG
 GATTATAAGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG C

>DOM7h-26

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTACAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT GAGTATAATA TGTCCTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTCTGCCGC ATGGTGATCG GACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGGAT
 CTTTGTATA GGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

Fig.51b (Cont XI).

>DOM7h-27

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG GATTATCGGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTATTTTCGA ATGGTAAGTT TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGGAT
 TGGATGTATA TGTTTGAATA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-30

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCGG ACGTATACTA TGGCTTGGGT CCGCCAGGCC
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTACTAGTA GTGGTTCTTC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGAAT
 TCTTTGTATA AGTTTGAATA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-31

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCGG CCGACTAATA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTACTGGTA CTGGTGCTGC GACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGAAT
 TCTCGTTATA GGTTTGAATA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7r-20

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTCGCCGT TTGGTTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGGGG
 AAGGATTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGCG

>DOM7r-27

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTCGCCGT TTGGTTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAGTGAT
 GTTCTTAAGA CGGGTCTGGA TGTTTTTGAC TACTGGGGTC AGGGAACCCT GGTACCGTCTC
 TCGAGCG

Fig.51b (Cont XII).

>DOM7r-28

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTATG GCGTATCAGA TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTCATCAGA CGGGTTTTTC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGCCT
TCTATGCGTC CTTATAAGTT TGA TACTACTGG GGT CAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
G

>DOM7r-21

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTCGCCGT TTGGTTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTAAT
CTTGAGCCGT TTGA TACTACTG GGT CAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG CG

Fig.51b (Cont XIII).

>DOM7x-25

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTGCGCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAAGACG
 GGTCCGTCGT CGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7x-22

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGT TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTGCGCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAAGCTT
 AGTAATGGTT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG CG

>DOM7x-23

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTGCGCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGGTT
 AAGGATAATA CGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7x-24

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTGCGCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAATACT
 GGGGGTAAGC AGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7x-26

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTGCGCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAGGACT
 GAGAATAGGG GGGTTTCTTT TGA TACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
 G

Fig.51b (Cont XIV).

>DOM7r-29

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAG GATTATGATA TGACTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAATG ATTTCTTCGT CGGGTCTTTG GACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTTTT
 AGGCTGTTTC CTCGGACTTT TGACTIONTGG GGTGAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
 G