

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 177**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2010 E 10774177 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2493504**

54 Título: **Polipéptidos anti-TNFR1 estables, dominios variables de anticuerpos y antagonistas**

30 Prioridad:

27.10.2009 US 255235 P

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

26.11.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DE SILVA, INUSHA;
SEPP, ARMIN y
STOOP, ADRIAAN ALLART**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 552 177 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 anti-TNFR1 estables, dominios variables de anticuerpos y antagonistas

La presente invención se refiere a polipéptidos anti-factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1, p55, CD120a, P60, miembro 1A de la superfamilia de los receptores del TNF, TNFRSF1A), dominios variables sencillos de inmunoglobulina (anticuerpo) y antagonistas que los comprenden. La invención se refiere además a procedimientos, usos, formulaciones, composiciones y dispositivos que comprenden o usan dichos ligandos anti-TNFR1.

Antecedentes de la invención

TNFR1

El TNFR1 es un receptor transmembrana que contiene una región extracelular que se une al ligando y un dominio intracelular que carece de la actividad de transducción de señal intrínseca, pero que se puede asociar con las moléculas de transducción de señal. El complejo del TNFR1 con TNF unido contiene tres cadenas de TNFR1 y tres cadenas de TNF. (Banner et al., Cell, 73(3) 431-445 (1993).) El ligando TNF está presente como un fragmento, que está unido por tres cadenas de TNFR1. (Id.) Las tres cadenas de TNFR1 están agrupadas próximas en el complejo receptor-ligando y este agrupamiento es un requisito previo para la transducción de señal mediada por el TNFR1. De hecho, agentes multivalentes que se unen al TNFR1, tales como los anticuerpos anti-TNFR1, pueden inducir agrupación de TNFR1 y transducción de la señal en ausencia de TNF y normalmente se usan como agonistas del TNFR1. (Véase, p.ej., Belka et al., EMBO, 14(6):1156-1165 (1995); Mandik-Nayak et al., J. Immunol, 167:1920-1928 (2001).) De acuerdo lo anterior, los agentes multivalentes que se unen al TNFR1 no suelen, en general, ser antagonistas eficaces del TNFR1 incluso si bloquean la unión de TNF α a TNFR1.

Los números de SEC ID en este párrafo se refieren a la numeración usada en el documento WO2006038027. La región extracelular del TNFR1 comprende un segmento amino-terminal de trece aminoácidos (aminoácidos 1-13 de la SEC ID N° 603 (humana); aminoácidos 1-13 de la SEC ID N° 604 (de ratón)), el dominio 1 (aminoácidos 14-53 de la SEC ID N° 603 (humana); aminoácidos 14-53 de la SEC ID N° 604 (de ratón)), el dominio 2 (aminoácidos 54-97 de la SEC ID N° 603 (humana); aminoácidos 54-97 de la SEC ID N° 604 (de ratón)), el dominio 3 (aminoácidos 98-138 de la SEC ID N° 603 (humana); aminoácidos 98-138 de la SEC ID N° 604 (de ratón)), y el dominio 4 (aminoácidos 139-167 de la SEC ID N° 603 (humana); aminoácidos 139-167 de la SEC ID N° 604 (de ratón)), seguido de una región proximal a la membrana (aminoácidos 168-182 de la SEC ID N° 603 (humana); aminoácidos 168-183 de la SEC ID N° 604 (ratón)). (Véase, Banner et al., Cell 73(3) 431-445 (1993) y Loetscher et al., Cell 61(2) 351-359 (1990).) Los dominios 2 y 3 entran en contacto con el ligando unido (TNF β , TNF α). (Banner et al., Cell, 73(3) 431-445 (1993).) La región extracelular del TNFR1 también contiene una región denominada dominio de ensamblaje de unión pre-ligando o dominio PLAD (aminoácidos 1-53 de la SEC ID N° 603 (humana); aminoácidos 1-53 de la SEC ID N° 604 (de ratón)) (Gobierno de EE.UU., documento WO 01/58953; Deng et al., Nature Medicine, doi: 10.1038/nm1304 (2005)).

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

El documento WO2006038027, el documento WO2008149144 y el documento WO2008149148 divulgan dominios variables sencillos de inmunoglobulina anti-TNFR1 y antagonistas que los comprenden. Estos documentos también divulgan el uso de dichos dominios y antagonistas para el tratamiento y/o prevención de afecciones mediadas por el TNF α . Sería deseable proporcionar dominios variables sencillos de inmunoglobulina anti-TNFR1 humano con mejor estabilidad al almacenamiento, antagonistas, ligandos y productos que los comprenden. El objetivo de estos sería proporcionar mejores reactivos diagnósticos para detectar TNFR1 humano en las muestras, así como, o como alternativa, proporcionar mejores terapéuticas para el tratamiento y/o la profilaxis de afecciones y enfermedades mediadas por TNFR1 en seres humanos u otros mamíferos. Sería particularmente deseable proporcionar dominios variables sencillos de inmunoglobulina anti-TNFR1, antagonistas, ligandos y productos que los comprenden que sean potentes neutralizantes del TNFR1, especialmente del TNFR1 humano.

Los diversos aspectos de la presente invención cumplen estas características deseables.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNF α de tipo 1 (TNFR1; p55) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 59 (DOM1h-574-208), en la que el dominio variable sencillo tiene una DO₃₂₀ <1,0, <0,9, <0,8, <0,7, <0,6, <0,5, o <0,4 tras la incubación en PBS a 40 °C durante 40 horas. En una forma de realización, el dominio variable sencillo tiene una DO₃₂₀ <1,0, <0,9, <0,8, <0,7, <0,6, <0,5, o <0,4 determinada mediante la prueba siguiente

- a) 100 μ l del dominio variable sencillo de 1 mg/ml en PBS (solución salina tamponada con fosfato) se dispensan sobre una placa para PCR;

b) La placa se incuba durante 40 horas a 40°C; y

c) Se extrae una alícuota de 50 µl y se mide la DO₃₂₀ en, por ejemplo, un lector de microplacas (por ejemplo, uno de Molecular Devices).

5 También forma parte de la divulgación un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNFα de tipo 1 (TNFR1; p55) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95, 96, 97, 98 o 99% (o 100%) idéntica a la secuencia de aminoácidos de DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 o DOM1h-574-214, en los que el dominio variable sencillo tiene una DO₃₂₀ <1,0, <0,9, <0,8, <0,7, <0,6, <0,5, o <0,4 tras la incubación en PBS a 40°C durante 40 horas. En una forma de realización, el dominio variable sencillo tiene una DO₃₂₀ <1,0, <0,9, <0,8, <0,7, <0,6, <0,5, o <0,4 tras la incubación en PBS a 40 °C durante 40 horas. En una realización, el determinada mediante la prueba siguiente dominio variable sencillo tiene una DO₃₂₀ <1,0, <0,9, <0,8, <0,7, <0,6, <0,5, o <0,4 determinado mediante la siguiente prueba

15 a) 100 µl del dominio variable sencillo de 1 mg/ml en PBS (solución salina tamponada con fosfato) se dispensan sobre una placa para PCR;

b) La placa se incuba durante 40 horas a 40°C; y

c) Se extrae una alícuota de 50 µl y se mide la DO₃₂₀ en, por ejemplo, un lector de microplacas (por ejemplo, uno de Molecular Devices).

20 En un aspecto, la invención proporciona un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNFα de tipo 1 (TNFR1; p55) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 59 (DOM1h-574-208).

También parte de la divulgación es un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNFα de tipo 1 (TNFR1; p55) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95, 96, 97, 98 o 99% (o 100%) idéntica a la secuencia de aminoácidos de DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 o DOM1h-574-214.

En un aspecto, la invención proporciona un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNFα de tipo 1 (TNFR1; p55) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 59 (DOM1h-574-208) o tiene 1 o 2 cambios de aminoácidos en comparación con dicha secuencia de aminoácidos seleccionada.

También forma parte de la divulgación un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNFα de tipo 1 (TNFR1; p55) que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 y DOM1h-574-214 o tiene 1 o 2 cambios de aminoácidos en comparación con dicha secuencia de aminoácidos seleccionada.

En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNFα de tipo 1 (TNFR1; p55), en el que el dominio variable comprende una secuencia de aminoácidos SEC ID N° 59 (DOM1h-574-208).

En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNFα de tipo 1 (TNFR1; p55), en el que la secuencia de nucleótidos es, al menos, un 95, 96, 97, 98 o 99% (o 100%) idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 25 DOM1h-574-208).

45 También forma parte de la divulgación un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNFα de tipo 1 (TNFR1; p55), en el que el dominio variable comprende una secuencia de aminoácidos que es, al menos, un 95, 96, 97, 98 o 99% (o 100%) idéntica a la secuencia de aminoácidos de DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 o DOM1h-574-214.

También forma parte de la divulgación un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNFα de tipo 1 (TNFR1; p55), en el que la secuencia de nucleótidos es, al menos, un 70, 75 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% (o 100%) idéntica a la secuencia de nucleótidos de DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-

574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 o DOM1h-574-214.

En un aspecto, la invención se refiere a un ligando multiespecífico que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de la presente invención y, opcionalmente, al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se une de forma específica a la seroalbúmina (SA). En una forma de realización, el ligando multiespecífico es, o comprende, una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia de aminoácidos de cualquier construcción denominado "DMS" divulgado en la presente memoria descriptiva, por ejemplo DMS5541 (SEC ID N° 66). En una forma de realización, el ligando multiespecífico es, o comprende, una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de cualquier DMS divulgado en la presente memoria descriptiva, por ejemplo la secuencias de nucleótidos DMS5541 (SEC ID N° 32). En una forma de realización, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica un ligando multiespecífico que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina anti-TNFR1 y un dominio variable sencillo anti-SA, en el que el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de un DMS divulgado en la presente memoria descriptiva, por ejemplo la secuencia de nucleótidos de DMS5541 (SEC ID N° 32). Se proporciona un vector que comprende dicho ácido nucleico, así como una célula huésped que comprende dicho vector.

En un aspecto, la invención proporciona un ligando multipespecífico que comprende (i) un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNF α de tipo 1 (TNFR1; p55), que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 59 (DOM1h-574-208), (ii) al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina anti-seroalbúmina (SA) que específicamente se une a la SA, en el que el dominio variable sencillo anti-SA comprende una secuencia de aminoácidos que es, al menos, un 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID N° 76 (DOM7h-11-3) y (iii) opcionalmente, en el que se proporciona un enlazador entre el dominio variable sencillo anti-TNFR1 y el dominio variable sencillo anti-SA.

También forma parte de la divulgación un ligando multipespecífico que comprende (i) un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNF α de tipo 1 (TNFR1; p55), que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 96, 96, 97, 98 o 99 % idéntica (o 100% idéntica) con la secuencia de aminoácidos de DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 o DOM1h-574-214, (ii) al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina anti-seroalbúmina (SA) que específicamente se une a la SA, en el que el dominio variable sencillo anti-SA comprende una secuencia de aminoácidos que es, al menos, un 80 % idéntica a la secuencia de DOM7h-11-3 y (iii) opcionalmente, en el que se proporciona un enlazador entre el dominio variable sencillo anti-TNFR1 y el dominio variable sencillo anti-SA.

En una forma de realización, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos AST, opcionalmente ASTGPS. Como alternativa, el enlazador es AS(G₄S)_n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, por ejemplo AS(G₄S)₃.

En un aspecto, la invención proporciona un antagonista del TNFR1 que comprende un dominio variable sencillo, polipéptido o ligando multiespecífico de cualquier aspecto precedente de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona un antagonista del receptor de tipo 1 de TNF α (TNFR1; p55) de la invención, para administración oral, administración en el tracto GI de un paciente, administración pulmonar, administración en los pulmones de un paciente o administración sistémica.

En un aspecto, la invención proporciona un antagonista de 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 de TNFR1 de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una afección inflamatoria.

Otro aspecto de la invención proporciona ligando multiespecífico que comprende o consiste en la SEC ID N° 66 (DMS5541). Un aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico que codifica un ligando multiespecífico. Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es, al menos, un 80% idéntica a la secuencia de SEC ID N° 32 (DMS5541). La invención además proporciona un vector que comprende el ácido nucleico, así como un huésped, opcionalmente una célula embrionaria no humana, que comprende el vector.

Breve descripción de la figura

Figura 1. Alineación de la secuencia de aminoácidos para dAb de selecciones de estabilidad y purificada para su caracterización. Las secuencias se alinean contra DOM1h-574-156, un dAb representativo para los usos como dAb de partida para las selecciones de estabilidad. Un "." en una posición concreta indica el mismo amino encontrado en DOM1h-574-156 en dicha posición. Las CDR se indican mediante subrayado y texto en negrita (la primera secuencia subrayada es CDR1, la segunda secuencia subrayada es CDR2 y la tercera secuencia subrayada es CDR3).

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria, la invención se ha descrito con referencia a las formas de realización, de un modo que permite redactar una especificación clara y concisa. Se pretende y debe apreciarse que las formas de realización pueden combinarse o separarse de forma variada sin desviarse de la invención.

- 5 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que un experto en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácido nucleico, técnicas de hibridación y bioquímica) entiende habitualmente. Para los procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos se usan técnicas convencionales (véase, en general, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc. –
- 10 que se incorporan en la presente memoria descriptiva por referencia) y procedimientos químicos.

- Los dominios variables sencillos de inmunoglobulina (dAb) descritos en la presente memoria descriptiva contienen regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3). Las localizaciones de las CDR son regiones estructurales (FR) y Kabat y col. han definido un sistema de numeración. (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). Las secuencias de aminoácidos de las CDR (CDR1, CDR2, CDR3) de las V_H y V_L (V_K) de los dAb divulgados en la presente memoria descriptiva serán evidentes para el experto en la técnica sobre la base del bien conocido sistema de numeración de Kabat y la definición de las CDR. De acuerdo con el sistema de numeración de Kabat las CDR-H3 de la cadena pesada tienen longitudes variables, las inserciones se numeran
- 15 entre el resto H100 y H101 con letras hasta la K (es decir, H100, H100A .. H100K, H101). Como alternativa, las CDR se pueden determinar usando el sistema de Chothia (Chothia et al., (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342, p877-883), de acuerdo con AbM o de acuerdo con el procedimiento de Contacto siguiente. Véase <http://www.bioinf.org.uk/abs/> para procedimientos adecuados para determinar las CDR.
- 20

- Una vez que se ha numerado cada resto, se pueden aplicar las definiciones de CDR siguientes (“-” significa los mismos números de restos que se muestran para Kabat).
- 25

Kabat – procedimiento más utilizado sobre la base de la variabilidad de la secuencia (usando la numeración de Kabat):

CDR H1: 31-35/35A/35B

CDR H2: 50-65

- 30 CDR H3: 95-102

CDR L1: 24-34

CDR L2: 50-56

CDR L3: 89-97

Chothia – sobre la base de la localización de las regiones bucle estructurales (usando la numeración de Chothia):

- 35 CDR H1: 26-32

CDR H2: 52-56

CDR H3: 95-102

CDR L1: 24-34

CDR L2: 50-56

- 40 CDR L3: 89-97

AbM – compromiso entre Kabat y Chothia

(usando la numeración de Kabat):	(usando la numeración de Chothia):
CDR H1: 26-35/35A/35B	26-35
CDR H2: 50-58	-
CDR H3: 95-102	-

CDR L1: 24-34	-
CDR L2: 50-56	-
CDR L3: 89-97	-

Contacto—basado en estructuras de cristal y predicción de residuos de contacto con antígeno

(usando la numeración de Kabat):	(usando la numeración de Chothia):
CDR H1: 30-35/35A/35B	30-35
CDR H2: 47-58	-
CDR H3: 93-101	-
CDR L1: 30-36	-
CDR L2: 46-55	-
CDR L3: 89-96	-

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “antagonista del receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1)” o “antagonista anti-TNFR1” o similar se refiere a un agente (por ejemplo, una molécula, un compuesto) que se une al TNFR1 y puede inhibir una (es decir, una o más) función del TNFR1. Por ejemplo, un antagonista del TNFR1 puede inhibir la unión de $TNF\alpha$ a y/o TNFR1 inhibir la transducción de señal mediada por el TNFR1. De acuerdo con esto, los procesos mediados por el TNFR1 y las respuestas celulares (por ejemplo, la muerte celular inducida por $TNF\alpha$ en un ensayo de citotoxicidad L929 estándar) se pueden inhibir con un antagonista del TNFR1.

- 10 Como se usa en la presente memoria descriptiva, “péptido” se refiere a aproximadamente dos a aproximadamente 50 aminoácidos que se unen a través de enlaces peptídicos.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “polipéptido” se refiere a al menos aproximadamente 50 aminoácidos que se unen a través de enlaces peptídicos. En general, los polipéptidos comprenden estructura terciaria y se pliegan en dominios funcionales.

- 15 Como se usa en la presente memoria descriptiva, un péptido o polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo de dominio (dAb)) que es “resistente a la degradación por proteasas” no es considerablemente degradado por una proteasa cuando se incuba con la proteasa en condiciones adecuadas para la actividad de la proteasa. Un polipéptido (por ejemplo, un dAb) no es considerablemente degradado cuando no más de aproximadamente el 25%, no más de aproximadamente el 20%, no más de aproximadamente el 15%, no más de aproximadamente el 14%, no más de aproximadamente el 13%, no más de aproximadamente el 12%, no más de aproximadamente el 11%, no más de aproximadamente el 10%, no más de aproximadamente el 9%, no más de aproximadamente el 8%, no más de aproximadamente el 7%, no más de aproximadamente el 6%, no más de aproximadamente el 5%, no más de aproximadamente el 4%, no más de aproximadamente el 3%, no más de aproximadamente el 2%, no más de aproximadamente el 1%, o sustancialmente nada de la proteína es degradada 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 o 50 grados C. La degradación de la proteína se puede evaluar usando cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo mediante SDS-PAGE o mediante un ensayo funcional (por ejemplo, unión a ligando) como se describe en la presente memoria descriptiva.

- 30 Como se usa en la presente memoria descriptiva, “sistema de expresión” se refiere a un sistema en el que un grupo de polipéptidos o péptidos son accesibles para selección sobre la base de una característica deseada, tal como una característica física, química o funcional. El sistema de expresión puede ser un repertorio adecuado de polipéptidos o péptidos (por ejemplo, en una solución, inmovilizados en un soporte adecuado) El sistema de expresión también puede ser 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, transfeccionadas o transducidas y la expresión de los polipéptidos codificados sobre la superficie de las células) o un sistema de expresión acelular (por ejemplo, compartimentalización de la emulsión y expresión). Ejemplos de sistemas de expresión vinculan la función de codificación de un ácidos nucleico y las características físicas, químicas y/o funcionales de un polipéptido o péptido codificado por el ácido nucleico. Cuando se emplea dicho sistema de expresión, se pueden seleccionar los polipéptidos o péptidos que tienen una característica física, química y/o funcional deseada y un ácido nucleico que codifica el polipéptido o péptido seleccionado puede aislarse o recuperarse con facilidad. En la técnica se conocen una serie de sistemas de expresión que vinculan la función de codificación de un ácido nucleico y las características físicas, químicas y/o funcionales de un polipéptido o péptido, por ejemplo expresión en bacteriófago (expresión en

fago, por ejemplo expresión en fagemido), expresión en ribosoma, compartimentalización y expresión en emulsión, expresión en levaduras, expresión de puromicina, expresión bacteriana, expresión en plásmidos, expresión covalente y similares. (Véase, por ejemplo, el documento EP 0436597 (Dyax). la patente de EE.UU. nº 6.172.197 (McCafferty et al.). la patente de EE.UU. nº 6.489.103 (Griffiths et al.).)

5 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "repertorio" se refiere a un conjunto 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, capacidad de unirse a un ligando común (por ejemplo, un ligando genérico o un ligando diana, TNFR1)).

10 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "funcional" describe un polipéptido o péptido que tiene actividad biológica, tal como la actividad de unión específica. Por ejemplo, el término "polipéptido funcional" incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno diana a través de su sitio de unión a antígeno.

15 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "ligando genérico" se refiere a un ligando que se une a una porción sustancial (por ejemplo, sustancialmente todo) de los miembros funcionales de un repertorio dado. Un ligando genérico (por ejemplo, un ligando genérico común) puede unirse a muchos miembros de un repertorio dado aunque los miembros puedan no tener la especificidad para un ligando diana común. En general, la presencia de un sitio de unión a ligando genérico funcional en un polipéptido (como indica la capacidad de unirse a un ligando genérico) indica que el polipéptido está correctamente plegado y es funcional. Ejemplos adecuados de ligandos
20 genéricos incluyen superantígenos, anticuerpos que se unen a un epítipo expresado sobre una porción sustancial de miembros funcionales de un repertorio y similares.

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

30 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "ligando diana" se refiere a un ligando que se une de forma específica o selectiva a un polipéptido o péptido. Por ejemplo, cuando un polipéptido es un anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno, el ligando diana puede ser cualquier antígeno o epítipo deseado. La unión al antígeno diana depende del polipéptido o péptido que es funcional.

35 Como se usa en la presente memoria descriptiva un anticuerpo se refiere a IgG, IgM, IgA, IgD o IgE o un fragmento (tales como Fab, F(ab')₂, Fv, Fv unida por disulfuro, scFv, anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada, scFv unida por disulfuro, diacuerpo) derivado de cualquier especie natural que produce un anticuerpo o creado por tecnología de ADN recombinante; aislado de suero, de células B, hibridomas, transfectomas, levaduras o bacterias.

40 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "formato de anticuerpo", "formateado" o similar se refiere a cualquier estructura polipeptídica en la que se pueden incorporar uno o más dominios variables del anticuerpo de modo que se confiere especificidad de unión para el antígeno sobre la estructura. En la técnica se conocen varios formatos de anticuerpos adecuados, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpo, cadenas ligeras de anticuerpo, homodímeros y heterodímeros de las cadenas pesadas y/o las cadenas ligeras del anticuerpo de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, un fragmento Fv (por ejemplo, Fv de cadena sencilla(scFv), un Fv unido por disulfuro), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un dominio variable de anticuerpo
45 sencillo (por ejemplo, un dAb, V_H, V_{HH}, V_L), y versiones modificadas de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, modificados por la unión covalente de polietilenglicol u otro polímero adecuado o una V_{HH} humanizada).

La frase "dominio variable sencillo de inmunoglobulina" se refiere a un dominio variable del anticuerpo (V_H, V_{HH}, V_L) que se une específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de otras regiones o dominios V. Un dominio variable sencillo de la inmunoglobulina puede estar presente en un formato (por ejemplo, homo o heteromultímero) con otras regiones variables o dominios variables en los que las otras regiones o dominios no son necesarias para la unión al antígeno a través del dominio variable sencillo de la inmunoglobulina (es decir, en el que el dominio variable sencillo de la inmunoglobulina se une al antígeno de forma independiente de los dominios variables adicionales). Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" es lo mismo que un "dominio variable sencillo de inmunoglobulina" tal como el término se usa en la presente memoria descriptiva. Un "dominio variable sencillo la inmunoglobulina" es lo mismo que un "dominio variable sencillo de inmunoglobulina" tal como el término se usa en la presente memoria descriptiva. Un "dominio variable de anticuerpo sencillo" o un "dominio variable sencillo de anticuerpo" es lo mismo que un "dominio variable sencillo de anticuerpo" tal como el término se usa en la presente memoria descriptiva. Un dominio variable sencillo de inmunoglobulina es, en una forma de realización, un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables sencillos de anticuerpo de otras especies,

como de dAc V_{HH} de roedores (por ejemplo, tal como se divulga en el documento WO 00/29004), cuyo contenido se incorpora en la presente memoria descriptiva por referencia en su totalidad), dAb V_{HH} de tiburón nodriza y de camélidos. El V_{HH} de camélidos son polipéptidos en el dominio variable sencillo de inmunoglobulina que derivan de especies, entre las que se incluyen camellos, llamas, alpacas, dromedarios y guanacos, que producen anticuerpos de cadena pesada desprovistos de forma natural de las cadenas ligeras. El V_{HH} puede ser humanizada.

Un "dominio" es una estructura proteica plegada que tiene una estructura terciaria independiente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de las discretas propiedades funcionales de las proteínas y, en muchos casos, se pueden añadir, eliminar o transferir a otras proteínas sin que se pierda la función del resto de la proteína y/o del dominio. Un "dominio variable sencillo de anticuerpo" es un dominio polipeptídico plegado que comprende secuencias características de los dominios variables del anticuerpo. Por tanto, incluye dominios variables completos del anticuerpo y dominios variables modificados en los que, por ejemplo, uno o más bucles han sido reemplazados por secuencias que no son características de los dominios variables del anticuerpo, o dominios variables del anticuerpo que se han truncado o que comprenden extensiones en los extremos N o C, así como fragmentos plegados de los dominios variables que retienen 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 por miembros, cada uno de los cuales tiene una secuencia única de polipéptido o de ácido nucleico. Hasta este punto, "biblioteca" es sinónimo de "repertorio". Las diferencias de secuencia entre los miembros de la biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede tomar la forma de una mezcla sencilla de polipéptidos o ácidos nucleicos o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo bacterias, virus, células animales o vegetales y similares, transformados con una biblioteca de ácidos nucleicos. En una forma de realización, cada organismo o célula individual sólo contiene uno o una serie limitada de miembros de la biblioteca. En una forma de 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. Por tanto, en un aspecto, una biblioteca puede tomar la forma de una población de organismos huésped, en la que cada organismo contiene una o más copias de un vector de expresión que contiene un único miembro de la biblioteca en forma de ácido nucleico que puede expresarse para producir su miembro polipeptídico correspondiente. Por tanto, la población de organismos huésped tiene el potencial de codificar un gran repertorio de diversos polipéptidos.

Una "estructura universal" es una única secuencia estructural de anticuerpo correspondiente a las regiones de un anticuerpo de secuencia conservada tal como define Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services) o correspondiente al repertorio o estructura de inmunoglobulinas de la línea germinal humana definida por Chothia y Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917. Las bibliotecas y repertorios pueden usar una estructura única, o un grupo de dichas estructuras, lo cual se ha encontrado que permite la obtención prácticamente de cualquier especificidad de unión mediante la variación en las regiones hipervariables solo.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "dosis" se refiere a la cantidad de ligando administrada a un sujeto de una vez (monodosis) o en dos o más administraciones durante un intervalo de tiempo definido. Por ejemplo, dosis se puede referir a la cantidad de ligando (por ejemplo, ligando que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se une al antígeno diana) administrada a un sujeto durante el transcurso de un día (24 horas) (dosis diaria), dos días, una semana, dos semanas, tres semanas o uno o más meses (por ejemplo, mediante una única administración o mediando dos o más administraciones). El intervalo entre dosis puede ser cualquier cantidad de tiempo deseada.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "tamaño hidrodinámico" se refiere al tamaño evidente de una molécula (por ejemplo, una molécula proteica, un ligando) sobre la base de la difusión de la molécula a través de una solución acuosa. La difusión o movimiento de una proteína a través de la solución se puede procesar para deducir un tamaño evidente de la proteína, en el que el tamaño viene dado por el "radio de Stokes" o el "radio hidrodinámico" de la partícula proteica. El "tamaño hidrodinámico" de una proteína depende de la masa y de la forma (conformación) de modo que dos proteínas que tienen la misma masa molecular pueden tener diferentes tamaños hidrodinámicos sobre la base de la conformación global de la proteína.

Como se menciona en la presente memoria descriptiva, el término "compite" significa que la unión de una primera diana a su dominio de unión a la diana conocida se inhibe en presencia de un segundo dominio de unión que es específico de la diana conocida. Por ejemplo, la unión puede inhibirse estéricamente, por ejemplo mediante bloqueo físico de un dominio de unión o mediante alteración de la estructura o ambiente de un dominio de unión de modo que se reduce su afinidad o aidez por una diana. Véase el documento WO2006038027 para los detalles de cómo realizar un ELISA competitivo y experimentos de competición BiaCore para determinar la competición entre los dominios de unión primero y segundo.

Los cálculos de "homología" o "identidad" o "similitud" entre dos secuencias (los términos se usan de forma intercambiable en la presente memoria descriptiva) se realizan del siguiente modo. Las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (e.g., se pueden introducir huecos en una o ambas secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos primero y segundo para la alineación óptima y las secuencias no homólogas se pueden descartar

para fines comparativos). En una forma de realización, la longitud de una secuencia de referencia alineada para fines comparativos es de al menos 30%, o de al menos 40%, o de al menos 50%, o de al menos 60%, o de al menos 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Después se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está opcuada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en dicha posición (como se usa en la presente memoria descriptiva, "homología" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "identidad" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se han de introducir para la alineación óptima de las dos secuencias. Alineaciones de la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos, y la homología, similitud o identidad, tal como se define en la presente memoria descriptiva se pueden preparar y determinar en una forma de realización usando el algoritmo BLAST 2 Sequences, con parámetros por defecto (Tatusova, T. A. y col., FEMS Microbiol Lett, 174:187-188 (1999)).

En una forma de realización de cualquier aspecto de la invención, la variable sencilla anti-TNFR1, antagonista, ligando o polipéptido neutraliza el TNFR1 (eg, TNFR1 humano) con una ND50 de (o de aproximadamente) 5, 4, 3, 2 o 1 nM o menor en un ensayo MRC5 estándar, determinado mediante la inhibición de la secreción de IL-8 inducida por TNF alfa.

En una forma de realización de cualquier aspecto de la invención, la variable sencilla anti-TNFR1, antagonista, ligando o polipéptido neutraliza el TNFR1 (por ejemplo, TNFR1 murino) con una ND50 de 150, 100, 50, 40, 30 o 20 nM o menor; o de (aproximadamente) 150 a 10 nM; o de (aproximadamente) 150 a 20 nM; o de (aproximadamente) 110 a 10 mM; o de (aproximadamente) 110 a 20 mM en un ensayo L929 estándar, determinado mediante la inhibición de la citotoxicidad inducida por TNF alfa.

En una forma de realización de cualquier aspecto de la invención, la variable sencilla anti-TNFR1, antagonista, ligando o polipéptido neutraliza el TNFR1 (eg, TNFR1 de Macaco Cynomologus) con una ND50 de 5, 4, 3, 2 o 1 nM o menor; o de (aproximadamente) nM en un ensayo Cynomologus KI MRC5 estándar, determinado mediante la inhibición de la secreción de IL-8 inducida por TNF alfa.

En una forma de realización de cualquier aspecto de la invención, el dominio variable sencillo comprende un resto terminal de cisteína, opcionalmente C-terminal. Por ejemplo, el resto de cisteína se puede usar para unir PEG al dominio variable, por ejemplo, usando un enlace maleimida (véase, por ejemplo, el documento WO04081026). En una forma de realización de cualquier aspecto de la invención, el dominio variable sencillo está unido a un resto de polialquilenglicol, opcionalmente un resto de polietilenglicol. Véase, eg, el documento WO04081026, para restos de PEG adecuados y procedimientos y pruebas de conjugación. En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de la presente invención y a un grupo efector o un dominio constante de anticuerpo, opcionalmente unaregión Fc de anticuerpo, en la que, opcionalmente, el extremo N de la Fc está unido (opcionalmente directamente unido) al extremo C del dominio variable. Cualquier "grupo efector", tal como se describe en el documento in WO04058820, se puede usar en este aspecto de la presente invención

En un aspecto, la invención se refiere a un ligando multiespecífico que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de la presente invención y, opcionalmente, al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se une de forma específica a la seroalbúmina (SA). En una forma de realización, el ligando multiespecífico se une a TNFR1 (eg, TNFR1 humano) con una KD que es al menos dos veces menor que la KD del monómero del TNFR1. Adicional o alternativamente, en una forma de realización, el ligando multiespecífico tiene una semivida que es al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50 ó 100 veces la del monómero. Adicional o alternativamente, en una forma de realización, el ligando multiespecífico tiene una semivida terminal de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 or 25 días en el hombre (por ejemplo, tal como se determina empíricamente en voluntarios sanos o como se calcula usando técnicas convencionales familiares para el experto mediante extrapolación de la semivida del ligando en un sistema animal tal como ratón, perro y/o primate no humano (por ejemplo, mono Cynomolgus, babuino , mono rhesus)), por ejemplo cuando el dominio anti-SA tiene reacción cruzada entre la SA humana y la SA del animal.

En una forma de realización de los ligandos multiespecíficos de la invención, el ligando es un antagonista de TNFR1 (por ejemplo, TNFR1), opcionalmente de la señalización mediada por TNFR1.

En una forma de realización, la presente invención proporciona el dominio variable, el ligando multiespecífico o antagonista de acuerdo con la invención tiene una semivida t_{1/2} en el intervalo de (o de aproximadamente) 2,5 horas o más. En una forma de realización, el extremo inferior del intervalo es (o es de aproximadamente) 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas , 11 horas o 12 horas. Además o como alternativa, la semivida t_{1/2}es (o es de aproximadamente) hasta 21 o 25 días, y ambos incluidos. En una forma de realización, el extremo superior del intervalo es (o es de aproximadamente) 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 19 días 20 días, 21 días o 22 días. Por ejemplo, el dominio variable o antagonista de acuerdo con la invención tendrá una semivida t_{1/2} en el intervalo de 12 a 60 horas (o de aproximadamente 12 a 60 horas). En otra forma de realización, estará en el intervalo de 12 a 48 horas (o de aproximadamente 12 a 48 horas). En otra forma de realización más, estará en el intervalo de 12 a 26 horas (o de aproximadamente 12 a 26 horas).

Como alternativa al uso de modelización de dos compartimentos, el experto estará familiarizado con el uso de modelización no compartimental, que se puede usar para determinar las semividas terminales (a este respecto, el término "semivida terminal" como se usa en la presente memoria descriptiva significa una semivida terminal determinada mediante el uso de modelización no compartimental). Se puede usar el paquete de análisis WinNonlin, por ejemplo, versión 5.1 (disponible Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, USA) por ejemplo, para modelar la curva de este modo. En este caso, en una forma de realización, el dominio variable sencillo, ligando multiespecífico o antagonista tiene una semivida terminal de al menos (o de al menos aproximadamente) 8 horas, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 28 horas, 20 horas, 1 day, 2 días, 3 días, 7 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días, 22 días, 23 días, 24 días or 25 días. En una forma de realización, el extremo superior de este intervalo es (o es de aproximadamente) 24 horas, 48 horas, 60 horas o 72 horas o 120 horas. Por ejemplo, la semivida terminal es (o es de aproximadamente) 8 horas a 60 horas, o de 8 horas a 48 horas o de 12 a 120 horas, por ejemplo, en el hombre.

Además, o como alternativa a, de los criterios anteriores, el dominio variable o antagonista de acuerdo con la invención tiene un valor de la AUC (área bajo la curva) en el intervalo de (o de aproximadamente) 1 mg.min/ml o más. En una forma de realización, el extremo inferior del intervalo es (o es de aproximadamente) 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 or 300 mg.min/ml. Además, o como alternativa a, el dominio variable, ligando multiespecífico o antagonista de acuerdo con la invención tiene un valor de la AUC en el intervalo de (o de aproximadamente) hasta 600 mg.min/ml. En una forma de realización, el extremo superior del intervalo es (o es de aproximadamente) 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 o 50 mg.min/ml. De forma ventajosa, el dominio variable o antagonista tendrá una AUC en el intervalo de (o aproximadamente) seleccionado del grupo que consiste en los siguientes: 15 a 150 mg.min/ml, 15 a 100 mg.min/ml, 15 a 75 mg.min/ml, y 15 a 50 mg.min/ml.

Una o más de las semividas t alfa, t beta y terminales, así como las AUC citadas en la presente memoria descriptiva se pueden obtener en un ser humano y/o animal (por ejemplo, un ratón o un primate no humano, por ejemplo, un babuino, mono rhesus, mono Cynomolgus) proporcionando uno o más dominios variables sencillos anti-TNFR1 (u otros restos de unión definidos en la presente memoria descriptiva) unidos a un PEG o a un dominio variable sencillo (o resto de unión) que se une de forma específica a la seroalbúmina, por ejemplo seroalbúmina de ratón y/o humana. El tamaño de PEG puede ser (o ser aproximadamente) de al menos 20 kDa, por ejemplo 30, 40, 50, 60, 70 o 80 kDa. En una forma de realización, el PEG es 40 kDa, por ejemplo, 2x20kDa PEG. En una forma de realización, para obtener semividas t alfa, t beta y terminales, o una AUC citadas en la presente memoria descriptiva, se proporciona un antagonista que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina anti-TNFR1 unido a un dominio variable sencillo de inmunoglobulina anti-SA. En una forma de realización, el PEG es 40 kDa, por ejemplo, 2x20kDa PEG. Por ejemplo, el antagonista comprende sólo uno de estos dominios variantes anti-TNFE1, por ejemplo uno de esos dominios unidos a sólo un dominio variable anti-SA. En una forma de realización, para obtener semividas t alfa, t beta y terminales, o una AUC citadas en la presente memoria descriptiva, se proporciona un antagonista que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina anti-TNFR1 unido a PEG, eg, 40-80 kDa PEG, por ejemplo 40 kDa PEG. Por ejemplo, el antagonista comprende sólo uno de estos dominios variantes anti-TNFE1, por ejemplo uno de esos dominios unidos a PEG de 40 kDa.

En una forma de realización del ligando multiespecífico de la invención, el ligando comprende un dominio variable sencillo anti-SA (por ejemplo, HSA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a, o al menos idéntica a, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99, la secuencia de DOM7h-11, DOM7h-11-3, DOM7h-11-12, DOM7h-11-15, DOM7h-14, DOM7h-14-10, DOM7h-14-18 o DOM7m-16 (véanse los documentos WO04003019, WO2008096158 y las solicitudes de patente pendientes de tramitación USSN 61/163,987 y 61/163,990 presentadas el 27 de marzo de 2009, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente memoria descriptiva, incluidas específicamente las secuencias de dAb anti-seroalbúmina). Además, o como alternativa a, en una forma de realización, el ligando multiespecífico comprende un enlazador proporcionado entre el dominio variables sencillo anti-TNFR1 y el dominio variable sencillo anti-SA, en el que el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos AST, opcionalmente ASTSGPS. Como alternativa, el enlazador es AS(G₄S)_n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, por ejemplo AS(G₄S)₃. Por ejemplo, el ligando comprende (de N- a C- terminal) DOM1h-574-16-AST-DOM7h-11; o DOM1h-574-72-ASTSGPS-DOM7m-16; or DOM1h-574-72-ASTSGPS-DOM7h-11-12.

En un aspecto, la invención proporciona un ligando multipespecífico que comprende (i) un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNF α de tipo 1 (TNFR1; p55), que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID No 59(DOM1h-574-208). (ii) al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina anti-seroalbúmina (SA) que específicamente se une a la SA, en el que el dominio variable sencillo anti-SA comprende una secuencia de aminoácidos que es, al menos, un 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 or 99% idéntica a la secuencia de DOM7h-11-3, y (iii) opcionalmente, en el que se proporciona un enlazador entre el dominio variable sencillo anti-TNFR1 y el dominio variable sencillo anti-SA, en el que el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos AST, opcionalmente ASTSGPS. Como alternativa, el enlazador es AS(G₄S)_n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, por ejemplo AS(G₄S)₃. Por ejemplo, el ligando comprende DOM1h-574-156 y DOM7h-11-3 opcionalmente unidos por AST o ASTSGPS. Como alternativa, el enlazador es AS(G₄S)_n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, por ejemplo AS(G₄S)₃. En este ejemplo o aspecto, el ligando está opcionalmente adaptado para administrar a un paciente por vía intravascular, subcutánea, intramuscular, peritoneal o mediante inhalación. En un ejemplo, el ligando se proporciona en forma de un polvo seco o composición liofilizada (que opcionalmente se mezcla con un diluyente antes de administrar).

En un aspecto, la invención proporciona un ligando multipespecífico que comprende (i) un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNF α de tipo 1 (TNFR1; p55), que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID No 59(DOM1h-574-208). (ii) al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina anti-seroalbúmina (SA) que específicamente se une a la SA, en el que el dominio variable sencillo anti-SA comprende una secuencia de aminoácidos que es, al menos, un 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 or 99% idéntica a la secuencia de DOM7h-14-10, y (iii) opcionalmente, en el que se proporciona un enlazador entre el dominio variable sencillo anti-TNFR1 y el dominio variable sencillo anti-SA, en el que el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos AST, opcionalmente ASTSGPS. Como alternativa, el enlazador es AS(G₄S)_n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, por ejemplo AS(G₄S)₃. En este ejemplo o aspecto, el ligando está opcionalmente adaptado para administrar a un paciente por vía intravascular, subcutánea, intramuscular, peritoneal o mediante inhalación. En un ejemplo, el ligando se proporciona en forma de un polvo seco o composición liofilizada (que opcionalmente se mezcla con un diluyente antes de administrar).

La invención proporciona un antagonista del TNFR1 que comprende un dominio variable sencillo, polipéptido o ligandos multiespecíficos de cualquier aspecto o forma de realización de la invención. Por ejemplo, el antagonista o dominio variable de la invención es monovalente para la unión a TNFR1. Por ejemplo, el antagonista o dominio variable de la invención es monovalente o sustancialmente monovalente tal como se determina mediante SEC-MALLS. Monovalencia sustancial está indicada por no más de 5, 4, 3, 2 or 1% del dominio variable o antagonista presente en forma no monovalente tal como se determina mediante SEC-MALLS.

En una forma de realización, el antagonista de la invención comprende los dominios primero y segundo variable sencillo de inmunoglobulina anti-TNFR1, en el que cada dominio variable es de acuerdo a cualquier aspecto o forma de realización de la invención. Los dominios primero y segundo variables sencillos de inmunoglobulina son, en un ejemplo, idénticos. En otro ejemplo son diferentes.

En un ejemplo, la secuencia de aminoácidos del antagonista o cada dominio variable sencillo de inmunoglobulina anti-TNFR1 en un antagonista de la invención es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 59(DOM1h-574-208).

En un aspecto, la invención proporciona un antagonista del receptor de tipo 1 de TNF α (TNFR1; p55) que comprende un dominio variable anti-TNFR1 de acuerdo con cualquier aspecto de la invención, para administración oral, administración en el tracto GI de un paciente, administración pulmonar, administración en los pulmones de un paciente o liberación sistémica. En otro aspecto, la invención proporciona el uso del antagonista de TNFR1 de cualquier aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para administración oral. En otro aspecto, la invención proporciona el uso del antagonista de TNFR1 de cualquier aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para administración en el tracto GI de un paciente. En un ejemplo, el antagonista o el dominio variable es resistente a tripsina, elastasa y/o pancreatina (véase el documento WO2008149143).

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un antagonista de TNFR1 de cualquier aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para administración pulmonar. En otro aspecto, la invención proporciona el uso del antagonista de TNFR1 de cualquier aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para administración en los pulmones de un paciente. En un ejemplo del antagonista o el dominio variable es resistente a leucocizina.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para administración oral o administración de un medicamento en el tracto GI de un paciente o en los pulmones o el tejido pulmonar de un paciente, en el que el procedimiento comprende administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de un antagonista del TNFR1 de la invención.

También forma parte de la divulgación un antagonista del receptor de tipo 1 del TNF α (TNFR1; p55) para la unión al TNFR1 humano, murino o macaco Cynomologus, en el que el antagonista tiene una secuencia de CDR1 que es idéntica, o al menos idéntica, 50, 60, 70, 80, 90, 95 or 98%, a la secuencia de CDR1 de DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 o DOM1h-574-214. Opcionalmente, el antagonista también tiene una secuencia de CDR2 que es idéntica, o al menos idéntica, en un 50, 60, 70, 80, 90, 95 or 98%, a la secuencia de CRD2 de la secuencia seleccionada. Opcionalmente, adicionalmente o como alternativa, el antagonista también tiene una secuencia de CDR3 que es idéntica a, o al menos idéntica a, en un 50, 60, 70, 80, 90, 95 or 98%, a la secuencia de CRD3 de la secuencia seleccionada.

También forma parte de la divulgación un antagonista del receptor de tipo 1 del TNF α (TNFR1; p55) para la unión al TNFR1 humano, murino o Macaco Cynomologus, en el que el antagonista tiene una secuencia de CDR2 que es idéntica, o al menos idéntica, 50, 60, 70, 80, 90, 95 or 98%, a la secuencia de CDR2 de DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213

o DOM1h-574-214. Opcionalmente, el antagonista también tiene una secuencia de CDR3 que es idéntica, o al menos idéntica, en un 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 98%, a la secuencia de CRD3 de la secuencia seleccionada.

También forma parte de la divulgación un antagonista del receptor de tipo 1 del TNF α (TNFR1; p55) para la unión al TNFR1 humano, murino o Macaco Cynomologus, en el que el antagonista tiene una secuencia de CDR3 que es idéntica, o al menos idéntica, 50, 60, 70, 80, 90, 95 or 98%, a la secuencia de CDR3 de DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 o DOM1h-574-214.

También forma parte de la divulgación un antagonista del receptor de tipo 1 del TNF α (TNFR1; p55) para la unión al TNFR1 humano, murino o Macaco Cynomologus, en el que el antagonista comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que comprende la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de un dominio variable sencillo seleccionado de DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 o DOM1h-574-214.

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

La invención proporciona un antagonista de TNFR1 de cualquier aspecto, para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad respiratoria. La invención proporciona el uso del antagonista de TNFR1 de cualquier aspecto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad respiratoria. En un ejemplo, la enfermedad respiratoria se selecciona del 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 injerto, enfermedad de injerto contra huésped, cáncer de pulmón, rinitis alérgica, alergia, asbestosis, aspergiloma, aspergilosis, bronquiectasia, bronquitis crónica, enfisema, neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad neumocócica invasiva, gripe, micobacteria no tuberculosa, derrame pleural, neumoconiosis, neumoцитosis, neumonía, actinomicosis pulmonar, proteinosis alveolar pulmonar, ántrax pulmonar, edema pulmonar, embolia pulmonar, inflamación pulmonar, histiocitosis pulmonar X, hipertensión pulmonar, nocardiosis pulmonar, tuberculosis pulmonar, enfermedad venooclusiva pulmonar, enfermedad reumatoide pulmonar, sarcoidosis y granulomatosis de Wegener.

Polipéptidos, dAb y antagonistas

El polipéptido, ligando, dAb, ligando o antagonista se puede expresar en *E. coli* o en especies de *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*). En una forma de realización, el ligando o monómero de dAb se secreta en una cantidad de al menos aproximadamente 0,5 mg/l cuando se expresa en *E. coli* o en especies de *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*). Aunque los ligandos y monómeros de dAb descritos en la presente memoria descriptiva se pueden secretar cuando se expresan en *E. coli* o en especies de *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*), se pueden producir usando cualquier procedimiento adecuado, tal como procedimientos químicos sintéticos o procedimientos de producción biológica que no emplean *E. coli* o especies de *Pichia*.

En algunas formas de realización, el polipéptido, ligando, dAb, ligando o antagonista no comprende un dominio variable de inmunoglobulina de camélidos o uno o más aminoácidos estructurales que son únicos de los dominios variables de inmunoglobulina codificados por segmentos génicos de anticuerpos de la línea germinal de camélidos, por ejemplo en la posición 108, 37, 44, 45 y/o 47. En una forma de realización, el dominio variable anti-TNFR1 de la invención comprende un resto G en la posición 44 de acuerdo con Rabat y opcionalmente comprende uno o más aminoácidos específicos de camélidos en otras posiciones, por ejemplo en la posición 37 o 103.

Los antagonistas del TNFR1 de acuerdo con la invención pueden ser monovalentes o multivalentes. En algunas formas de realización, el antagonista es monovalente y contiene un sitio de unión que interacciona con TNFR1, el sitio de unión proporcionado por un polipéptido o dAb de la invención. Los antagonistas monovalentes se unen a un TNFR1 y pueden no inducir reticulación ni agrupación de TNFR1 sobre la superficie de las células que puede

conducir a la activación del receptor y la transducción de la señal. Los antagonistas monovalentes de acuerdo con la invención se pueden unir al Dominio 1, Dominio 2, Dominio 3 o Dominio 4 del TNFR1. En una forma de realización, el antagonista monovalente se une al dominio 4 del TNFR1. En otras formas de realización, el antagonista monovalente se une a un epítipo que abarca más de un Dominio de TNFR1. Por tanto, en una forma de realización, el antagonista monovalente se puede unir a los Dominios 1 y 2, los Dominios 1 y 3, los Dominios 1 y 4, los Dominios 2 y 3, los Dominios 2 y 4, los Dominios 3 y 4, los Dominios 1, 2 y 3, los Dominios 1, 2 y 4 o los Dominios 1, 3 y 4, de TNFR1.

En otras formas de realización, el antagonista de TNFR1 es multivalente. Los antagonistas multivalentes de TNFR1 pueden contener dos o más copias de un sitio de unión concreto para TNFR1 o contener dos o más sitios de unión diferentes que se unen a TNFR1, proporcionándose al menos uno de los sitios de unión por un polipéptido o dAb de la invención. Por ejemplo, como se ha descrito en la presente memoria descriptiva, el antagonista de TNFR1 puede ser un dímero, trímero o multímero, que comprende dos o más copias de un polipéptido o dAb concreto de la invención que se une a TNFR1, o dos o más polipéptidos o dAb diferentes de la invención que se unen a TNFR1. En una forma de realización, un antagonista multivalente de TNFR1 no tiene agonismo sustancial con TNFR1 (actúa como agonista de TNFR1) en un ensayo celular estándar (es decir, cuando está presente a una concentración de 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M or 5.000 μ M, tiene como resultado en no más de aproximadamente 55 de la actividad mediada por TNFR1 inducida por TNF α (100 pg/ml) en el ensayo).

En ciertas formas de realización, el antagonista multivalente de TNFR1 contiene dos o más sitios de unión para un epítipo o dominio deseado de TNFR1. 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 de TNFR1 o se unen al mismo epítipo en el Dominio 4 de TNFR1.

En otras formas de realización, el antagonista multivalente de TNFR1 contiene dos o más sitios de unión proporcionados por polipéptidos o dAb de la invención que se unen a diferentes epítopos o dominios de TNFR1. Por ejemplo, los antagonistas multivalentes de TNFR1 pueden comprender sitios de unión para los Dominios 1 y 2, los Dominios 1 y 3, los Dominios 1 y 4, los Dominios 2 y 3, los Dominios 2 y 4, los Dominios 3 y 4, los Dominios 1, 2 y 3, los Dominios 1, 2 y 4 o los Dominios 1, 3 y 4 de TNFR1. En una forma de realización, dichos antagonistas multivalentes de TNFR1 no tienen agonismo con TNFR1 cuando están presentes a una concentración de aproximadamente 1 nM, o de aproximadamente 10 nM, o de aproximadamente 100 nM, o de aproximadamente 1 μ M, o de aproximadamente 10 μ M, en un ensayo estándar de citotoxicidad en L929 o un ensayo estándar con IL-8 en HeLa como se describe en el documento WO2006038027.

Otros antagonistas de TNFR1 no inhiben la unión de TNF α a TNFR1. Dichos ligandos (y antagonistas) pueden tener utilidad como agentes diagnósticos porque pueden usarse para unirse y detectar, cuantificar o medir TNFR1 en una mezcla y no competirán con el TNF en la muestra por la unión a TNFR1. De acuerdo con lo anterior se puede realizar una determinación precisa de si, o cuánto, TNFR1 hay en la muestra.

En otras formas de realización, el polipéptido, ligando, dAb, ligando o antagonista se une a TNFR1 y antagoniza la actividad de TNFR1 en un ensayo celular estándar con una ND₅₀ de $\leq$ 100 nM, y a una concentración de $\leq$ 10 μ M, el dAb agoniza la actividad del TNFR1 en $\leq$ 5% en el ensayo.

En formas de realización concretas, el polipéptido, ligando, dAb, ligando o antagonista no tiene agonismo sustancial con TNFR1 (actúa como agonista de TNFR1) en un ensayo celular estándar (es decir, cuando está presente a una concentración de 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M or 5.000 μ M, tiene como resultado en no más de aproximadamente 5% de la actividad mediada por TNFR1 inducida por TNF α (100 pg/ml) en el ensayo).

En ciertas formas de realización, el polipéptido, ligando, dAb o antagonista de la invención son eficaces en modelos de enfermedades inflamatorias crónicas cuando se administra una cantidad eficaz. En general, una cantidad eficaz es de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg (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 expertos en la técnica reconocen los modelos de enfermedad inflamatoria crónica (véase los descritos en el documento WO2006038027) como predictores de la eficacia terapéutica en seres humanos.

En formas de realización particulares, el polipéptido, ligando, dAb o antagonista es eficaz en el modelo estándar de artritis inducida por colágeno en ratones (véase el documento WO2006038027 para los detalles del modelo). Por ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del polipéptido, ligando, dAb o antagonista puede reducir la puntuación media de artritis de la suma de las cuatro extremidades en el modelo estándar de artritis inducida por colágeno en ratones, por ejemplo en aproximadamente 1 a aproximadamente 16, aproximadamente 3 a aproximadamente 16, aproximadamente 6 a aproximadamente 16, aproximadamente 9 a aproximadamente 16, or aproximadamente 12 a aproximadamente 16, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del polipéptido, ligando, dAb o antagonista puede retrasar el inicio de los síntomas de artritis en el modelo estándar de artritis inducida por colágeno en ratones, por ejemplo en aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días,

aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días o aproximadamente 28 días, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del polipéptido, ligando, dAb o antagonista puede resultar en una puntuación media de artritis de la suma de las cuatro extremidades en el modelo estándar de artritis inducida por colágeno en ratones de 0 a aproximadamente 3, aproximadamente 3 a aproximadamente 5, aproximadamente 5 a aproximadamente 7, aproximadamente 7 a aproximadamente 15, aproximadamente 9 a aproximadamente 15, aproximadamente 10 a aproximadamente 15, aproximadamente 12 a aproximadamente 15, or aproximadamente 14 a aproximadamente 15.

En otras formas de realización, el polipéptido, ligando, dAb o antagonista es eficaz en el modelo Δ ARE de artritis en ratones (véase el documento WO2006038027 para los detalles del modelo). Por ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del polipéptido, ligando, dAb o antagonista puede reducir la puntuación media de artritis en el modelo Δ ARE de artritis en ratones, por ejemplo en aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5, or aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del polipéptido, ligando, dAb o antagonista puede retrasar el inicio de los síntomas de artritis en el en el modelo Δ ARE de artritis en ratones, por ejemplo, en aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días o aproximadamente 28 días, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del polipéptido, ligando, dAb o antagonista puede tener como resultado una puntuación media de artritis en el modelo Δ ARE de artritis en ratones de 0 a aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1, aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5.

En otras formas de realización, el polipéptido, ligando, dAb o antagonista es eficaz en el modelo $\square$ ARE de enfermedad intestinal inflamatoria (EII) en ratones (véase el documento WO2006038027 para los detalles del modelo). Por ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del polipéptido, ligando, dAb o antagonista puede reducir la puntuación media de inflamación crónica y/o aguda en el modelo $\square$ ARE de EII en ratones, 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, or aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del polipéptido, ligando, dAb o antagonista puede retrasar el inicio de los síntomas de EII en el en el modelo $\square$ ARE de EII en ratones, por ejemplo, en aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días o aproximadamente 28 días, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del polipéptido, ligando, dAb o antagonista puede tener como resultado una puntuación media de de inflamación crónica y/o aguda en el modelo Δ ARE de EII en ratones de 0 a aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1, aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5.

En otras formas de realización, el polipéptido, ligando, dAb o antagonista es eficaz en el modelo de EII inducida por dextrano sulfato sódico (DSS) en ratones (véase el documento WO2006038027 para los detalles del modelo). Por ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del polipéptido, ligando, dAb o antagonista puede reducir la puntuación media de gravedad en el modelo DSS de EII en ratones, por ejemplo en aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5, or aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del polipéptido, ligando, dAb o antagonista puede retrasar el inicio de los síntomas de EII en el en el modelo DSS de EII en ratones, por ejemplo, en aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días o aproximadamente 28 días, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del polipéptido, ligando, dAb o antagonista puede tener como resultado una puntuación media de gravedad en el modelo DSS de EII en ratones de 0 a aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1, aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5.

En formas de realización concretas, el polipéptido, ligando, dAb o antagonista es eficaz en el modelo de enfermedad obstructiva crónica (EPOC) por humo de tabaco en ratones (véase el documento WO2006038027 y el documento WO2007049017 para los detalles del modelo). Por ejemplo, la administración de una cantidad eficaz del ligando puede reducir o retrasar el inicio de los síntomas de EPOC, comparación con un control adecuado.

Se dispone de sistemas de modelos animales que se pueden usar para detectar la eficacia de los antagonistas de TNFR1 (por ejemplo, ligandos, anticuerpos o proteínas de unión de los mismos) en la protección contra, o el tratamiento de, la enfermedad. En la técnica se conocen procedimientos para analizar el lupus eritematoso sistémico

(LES) en ratones susceptibles (Knight y col. (1978) J. Exp. Med., 147: 1653; Reinersten y col. (1978) New Eng. J. Med., 299: 515). La miastenia gravis (MG) se analiza en ratones SJL/J hembras mediante la inducción de la enfermedad con proteína AchR soluble de otra especie (Lindstrom y col. (1988) Adv. Immunol., 42: 233). La artritis se induce en una cepa susceptible de ratones mediante inyección de colágeno de tipo II (Stuart y col. (1984) Ann. Rev. Immunol., 42: 233). Se ha descrito un modelo mediante el cual se induce artritis adyuvante en ratas susceptibles mediante inyección de proteína del shock térmico micobacteriana (Van Eden y col. (1988) Nature, 331: 171). Se induce tiroiditis en ratones mediante la administración de tiroglobulina, tal como se ha descrito (Maron y col. (1980) J. Exp. Med., 152: 1115). La diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) se produce de forma natural o se puede inducir en ciertas cepas de ratones, tales como las descritas por Kanasawa y col. (1984) Diabetologia, 27: 113. EAE en ratas y ratones sirve como modelo para la EM en seres humanos. En este modelo se induce enfermedad desmielinizante mediante la administración de proteína básica de mielina (véase Paterson (1986) Textbook of Immunopathology, Mischer et al., eds., Grune and Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin 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 forma purificada junto con vehículos farmacológicamente adecuados. Normalmente, estos vehículos incluyen soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, todas incluyendo medios salinos y/o tamponados. Vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de ringer, dextrosa y cloruro sódico y solución de Ringer lactato. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si son necesarios para mantener un complejo polipeptídico en suspensión, se pueden escoger de espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.

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

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

La vía de administración de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención puede ser cualquiera de las conocidas habitualmente por los expertos en la técnica. Para terapia, incluida la inmunoterapia sin limitaciones, sus ligandos seleccionados de la invención se pueden administrar a cualquier paciente de acuerdo con técnicas estándar.

La administración se puede realizar de cualquier modo, incluidas las vías parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, mediante la vía pulmonar o, también, adecuadamente, mediante infusión directa con un catéter. La dosificación y la frecuencia de administración dependerá de la edad, el sexo y la afección del paciente, la administración concurrente de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros que el médico ha de tener en cuenta. La administración puede ser local (por ejemplo, liberación local en los pulmones mediante administración pulmonar, por ejemplo, administración intranasal) o sistémica, según lo indicado.

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

Las composiciones que contienen los presentes ligandos (por ejemplo, antagonistas) o un cóctel de las mismas se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En ciertas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para conseguir al menos una inhibición, supresión, modulación, muerte parciales, o algún otro parámetro mensurable, de una población de células seleccionadas se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades necesarias para alcanzar esta dosificación dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmunitario del paciente pero, en general, varían de 0,005 a 10,0 mg de ligando, por ejemplo dAb o antagonista por kilogramo de peso corporal, siendo las dosis de 0,05 a 2,0 mg/kg las más habituales. Para aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes ligandos o cócteles de los mismos también se pueden administrar a dosis similares o ligeramente menores, para prevenir, inhibir o retrasar el inicio de la enfermedad (por ejemplo, para mantener la remisión o quiescencia, o prevenir la fase aguda). El clínico experto podrá determinar el intervalo de dosificación adecuado para tratar, suprimir o prevenir la enfermedad.

Cuando un ligando de TNFR1 (por ejemplo, antagonista) se administra para tratar, suprimir o prevenir una enfermedad inflamatoria crónica, se puede administrar hasta cuatro veces al día, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes o una vez cada dos meses, a una dosis de, por ejemplo, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 2.5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg. En formas de realización concretas, el ligando de TNFR1 (por ejemplo, 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 realizado usando las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva se considera "eficaz" si se reducen uno o más síntomas (por ejemplo, en al menos 10% o al menos un punto en una escala de evaluación clínica) respecto a dichos síntomas presentes antes del tratamiento, o respecto a dichos síntomas en un individuo (humano o animal) no tratado con dicha composición u otro control adecuado. Obviamente, los síntomas varían en función de la enfermedad o trastorno diana, pero un clínico o técnico experto los puede medir. Dichos síntomas se pueden medir mediante, por ejemplo, monitorización del nivel de uno o más indicadores bioquímicos de la enfermedad o trastorno (por ejemplo, niveles de una enzima o metabolito correlacionados con la enfermedad, números de células afectadas etc.), mediante monitorización de las manifestaciones físicas (por ejemplo, inflamación, tamaño del tumor etc.) o mediante una escala de evaluación clínica aceptada, por ejemplo la escala Expanded Disability Status Scale (para la esclerosis múltiple), el cuestionario Irvine Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (evaluación de 32 puntos de la calidad de vida con respecto a la función intestinal, síntomas sistémicos, función social y estado emocional, la puntuación varía de 32 a 224, en el que las puntuaciones más altas indican una mejor calidad de vida), la escala Quality of Life Rheumatoid Arthritis Scale u otras escalas de evaluación clínica aceptadas conocidas en el campo. Una reducción sostenida (por ejemplo, un día o más, o más prolongada) en los síntomas de la enfermedad o trastorno e al menos un 10% o en uno o más puntos en una escala clínica dada es indicativa de tratamiento "eficaz". De igual forma, la profilaxis realizada usando una composición como se ha descrito en la presente memoria descriptiva es "eficaz" si el inicio o gravedad de uno o más síntomas se retrasa, reduce o anula con respecto a dichos síntomas en un individuo similar (humano o animal) no tratado con la composición.

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

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

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

En una forma de realización, la invención es un procedimiento para tratar, suprimir o prevenir una enfermedad inflamatoria crónica, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, ligando, dAb, ligando o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención.

En una forma de realización, la invención es un procedimiento para tratar, suprimir o prevenir la artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica) que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, ligando, dAb, ligando o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención.

En otra forma de realización, la invención es un procedimiento para tratar, suprimir o prevenir la psoriasis, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, ligando, dAb, ligando o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención.

5 En otra forma de realización, la invención es un procedimiento para tratar, suprimir o prevenir la enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, ligando, dAb, ligando o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención.

10 En otra forma de realización, la invención es un procedimiento para tratar, suprimir o prevenir la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (por ejemplo, bronquitis crónica, bronquitis obstructiva crónica y enfisema), que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, ligando, dAb, ligando o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención.

15 En otra forma de realización, la invención es un procedimiento para tratar, suprimir o prevenir la neumonía (por ejemplo, neumonía bacteriana, tal como la neumonía producida por estafilococos), que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, ligando, dAb, ligando o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención.

20 La invención proporciona un procedimiento para tratar, suprimir o prevenir otras enfermedades pulmonares además de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la neumonía. Otras enfermedades pulmonares que se pueden tratar, suprimir o prevenir de acuerdo con la invención incluyen, por ejemplo, fibrosis quística y asma (por ejemplo, asma resistente a esteroides). Por tanto, en otra forma de realización, la invención es un procedimiento para tratar, suprimir o prevenir una enfermedad pulmonar (por ejemplo, fibrosis quística, asma), que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, ligando, dAb, ligando o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención.

25 En formas de realización concretas, un antagonista de TNFR1 se administra vía liberación pulmonar, tal como mediante inhalación (por ejemplo, intrabronquial, intranasal o inhalación oral, gotas intranasales) o mediante administración sistémica (por ejemplo, parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea).

En otra forma de realización, la invención es un procedimiento para tratar, suprimir o prevenir el shock séptico, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, ligando, dAb, ligando o antagonista de TNFR1 de acuerdo con la invención.

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

35 Además, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad usando un polipéptido, ligando, dAb o antagonista de TNFR1 o una composición de acuerdo con la presente invención. En una forma de realización, la enfermedad es cáncer o una enfermedad inflamatoria, por ejemplo artritis reumatoide, asma o enfermedad de Crohn,

En un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición que comprende un polipéptido, dominio variable sencillo, ligando o antagonista de acuerdo con la invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 En formas de realización concretas, el polipéptido, dominio variable sencillo, antagonista o composición se administra vía liberación pulmonar, tal como mediante inhalación (por ejemplo, intrabronquial, intranasal o inhalación oral, gotas intranasales) o mediante administración sistémica (por ejemplo, parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea).

45 Un aspecto de la invención se proporciona un dispositivo para liberación pulmonar que contiene un polipéptido, dominio variable sencillo, ligando, composición o antagonista de acuerdo con la invención. El dispositivo puede ser un inhalador o un dispositivo de administración intranasal.

50 En otras formas de realización, cualquiera de los ligandos descritos en la presente memoria descriptiva (por ejemplo, antagonista o dominio variable sencillo) comprende además un resto extensor de la semivida, tales como un resto de polialquilenglicol, seroalbúmina o un fragmento de la misma, receptor de transferrina o una porción del mismo de unión a transferrina, o un resto que comprende un sitio de unión para un polipéptido que potencia la semivida in vivo. En algunas formas de realización, el resto extensor de la semivida es un resto que comprende un sitio de unión para un polipéptido que potencia la semivida in vivo seleccionado del grupo compuesto por un affibody, un dominio SpA, un dominio de clase A del receptor de LDL, un dominio de EGF y un avimero.

55 En otras formas de realización, el resto extensor de la semivida es un resto de polietilenglicol. En una forma de realización, el antagonista comprende (opcionalmente consta de) un dominio variable sencillo de la invención ligado a un resto de polietilenglicol (opcionalmente, en el que el resto tiene el tamaño de aproximadamente 20 a

aproximadamente 50 kDa, opcionalmente de aproximadamente 40 kDa de PEG lineal o modificado). Se hace referencia al documento WO04081026 para una información más detallada sobre la PEGilación de dAb y restos de unión. En una forma de realización, el antagonista consta de un monómero de dAb unido a un PEG, en el que el monómero de dAb es un dominio variable sencillo de acuerdo con la invención. Este antagonista se puede proporcionar para el tratamiento de enfermedad inflamatoria, una afección pulmonar (por ejemplo, asma, gripe o EPOC) o cáncer u, opcionalmente es para administración intravenosa.

En otras formas de realización, el resto extensor de la semivida es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina) que comprende un sitio de unión para seroalbúmina o receptor Fc neonatal.

La invención también se refiere a una composición (por ejemplo, composición farmacéutica), que comprende un ligando de la invención (p. e., antagonistas o dominio variable sencillo) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la composición comprende un vehículo para administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intratecal, intraarticular, subcutánea, administración pulmonar, intranasal, vaginal o rectal.

La invención también se refiere a un dispositivo de administración de fármaco, que comprende la composición (por ejemplo, composición farmacéutica) de la invención. En algunas formas de realización, el dispositivo de administración de fármaco comprende una pluralidad de dosis terapéuticamente eficaces de ligando. En otras formas de realización, el dispositivo de administración de fármaco se selecciona del grupo constituido por dispositivo de administración parenteral, dispositivo de administración intravenosa, dispositivo de administración intramuscular, dispositivo de administración intraperitoneal, dispositivo de administración transdérmica, dispositivo de administración pulmonar, dispositivo de administración intraarterial, dispositivo de administración intratecal, dispositivo de administración intraarticular, dispositivo de administración subcutánea, dispositivo de administración intranasal, dispositivo de administración vaginal, dispositivo de administración rectal, jeringuilla, un dispositivo de administración transdérmica, una cápsula, un comprimido, un nebulizador, un inhalador, un atomizador, un aerosol, un dispensador de neblina, un inhalador de polvo seco, un inhalador de dosis medida, un pulverizador de dosis medida, un dispensador de neblina en dosis medida, un atomizador de dosis medida y un cateter.

El ligando (por ejemplo, dominio variable sencillo, antagonista o ligando multiespecífico) de la invención se puede formatear como se ha descrito en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, el ligando de la invención puede formatear para ajustar la semivida sérica in vivo. Si se desea, el ligando puede comprender además una toxina o resto de toxina como se ha descrito en la presente memoria descriptiva. En algunas formas de realización, el ligando comprende una toxina de superficie activa, tal como un generador de radicales libres (por ejemplo, toxina que contiene selenio) o un radionúclido. En otras formas de realización, la toxina o resto de toxina es un dominio polipeptídico (por ejemplo, un dAb) que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para una diana intracelular. En formas de realización concretas, el ligando es un formato de tipo IgG que tiene especificidad de unión por el TNFR1 (por ejemplo, TNFR1 humano).

En un aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende el dominio variable sencillo de la invención. El dominio variable se puede fusionar con, por ejemplo, un péptido o polipéptido o proteína. En una forma de realización, el dominio variable se fusiona con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo monoclonal. En general, la fusión se puede conseguir expresando el producto de fusión de una secuencia de ácido nucleico sencilla o expresando un polipéptido que comprende el dominio variable sencillo y, después, ensamblando este polipéptido en un formato de proteína o anticuerpo más grande usando técnicas convencionales.

En una forma de realización, el dominio variable sencillo de inmunoglobulina, antagonista o proteína de fusión comprende un dominio constante de anticuerpo. En una forma de realización, el dominio variable sencillo de inmunoglobulina, antagonista o proteína de fusión comprende un anticuerpo Fc, en el que, opcionalmente, el extremo N de Fc está unido (opcionalmente directamente unido) a extremo C del dominio variable. En una forma de realización, el dominio variable sencillo de inmunoglobulina, antagonista o proteína de fusión comprende un resto extensor de la semivida. El resto extensor de la semivida puede ser un resto de polietilenglicol, seroalbúmina o un fragmento de la misma, receptor de transferrina o una porción del mismo de unión a transferrina, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión para un polipéptido que potencia la semivida in vivo. El resto extensor de la semivida puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión para seroalbúmina o receptor Fc neonatal. El resto extensor de la semivida puede ser un dAb, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En una forma de realización, el dominio variable sencillo de inmunoglobulina, o el antagonista o la proteína de fusión se proporciona de modo que el dominio variable (o el dominio variable que consiste en el antagonista o la proteína de fusión) comprende además un resto de polialquilenglicol. El resto de polialquilenglicol puede ser un resto de polietilenglicol. Más adelante se proporciona discusión adicional.

Se hace referencia al documento WO2006038027, que divulga dominios variables sencillos de inmunoglobulina anti-TNFR1. La divulgación de este documento proporciona usos, formatos, procedimientos de selección, procedimientos de producción, procedimientos de formulación y ensayos para dominios variables sencillos anti-TNFR1, ligandos, antagonistas y similares.

El anti-TNFR1 de la invención es un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que opcionalmente es un dominio variable humano o un dominio variable que comprende o deriva de regiones estructurales humanas (por ejemplo, regiones estructurales DP47 o DPK9). En ciertas formas de realización, el dominio variable se basa en una estructura universal, como se ha descrito en la memoria descriptiva.

- 5 En ciertas formas de realización, un dominio polipeptídico (por ejemplo, dominio variable sencillo de inmunoglobulina) que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para TNFR1 resiste agregaciones, se despliega de forma reversible (véase el documento WO04101790).

MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO, VECTORES Y CÉLULAS HUÉSPED

- 10 La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas y/o recombinantes que codifican ligandos (dominios variables sencillos, proteínas de fusión, polipéptidos, ligandos de especificidad doble y ligandos multiespecíficos) como se ha descrito en la memoria descriptiva.

- En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado y/o recombinante que codifica un polipéptido que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de acuerdo con la invención. En una forma de realización, el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 25 (DOM1h-574-208). En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado o recombinante, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80, 85, 90, 95, 98 or 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 25 (DOM1h-574-208) y en el que el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se une específicamente a TNFR1. En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado o recombinante, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80, 85, 90, 95, 98 or 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 25 (DOM1h-574-208) y en el que el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se une específicamente a TNFR1. En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado o recombinante, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80, 85, 90, 95, 98 or 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 25 (DOM1h-574-208) y en el que el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se une específicamente a TNFR1. En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado o recombinante, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80, 85, 90, 95, 98 or 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 25 (DOM1h-574-208) y en el que el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se une específicamente a TNFR1.

- 30 En un aspecto, la invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico de la invención. En un aspecto, la invención proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico de la invención o el vector. Se proporciona un procedimiento para producir un polipéptido que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina, en el que el procedimiento comprende mantener la célula huésped en las condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico o vector, de modo que se produce un polipéptido que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina. Opcionalmente, el procedimiento comprende además la etapa de aislar el polipéptido y, opcionalmente, producir una variante, por ejemplo una variante mutada, que tiene una afinidad mejorada (KD); la ND50 para la neutralización de TNFR1 en un ensayo KI con MRC5, L929 o Cynomologus con respecto al polipéptido aislado.

- 40 Los ácidos nucleicos a los que en la presente memoria descriptiva se hace referencia como "aislados" son ácidos nucleicos que se han separado de los ácidos nucleico del ADN genómico o el ARN celular o su fuente de origen (por ejemplo, como existen en las células o en una mezcla de ácidos nucleicos tal como una biblioteca) e incluyen ácidos nucleicos obtenidos mediante los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva u otros procedimientos adecuados, incluidos ácidos nucleicos esencialmente puros, ácidos nucleicos producidos mediante síntesis química, mediante combinación de procedimientos biológicos y químicos, y ácidos nucleicos recombinantes que se aíslan (véase, por ejemplo, Daugherty, B.L. et al., Nucleic Acids Res., 19(9): 2471-2476 (1991); Lewis, A.P. and J.S. Crowe, Gene, 101: 297-302 (1991)).

- Los ácidos nucleicos a los que en la presente memoria descriptiva se hace referencia como "recombinantes" son ácidos nucleicos que se han producido mediante metodología de ADN recombinante, incluidos los ácidos generados mediante procedimientos que dependen de un procedimiento de recombinación artificial, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o clonación en un vector usando enzimas de restricción.

- También se incluye en la divulgación, el ácido nucleico aislado y/o recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un ligando, tal como se ha descrito en la memoria descriptiva, en el que el ligando comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, or al menos aproximadamente 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un dAb que se une al TNFR1 descrito en la presente memoria descriptiva, por ejemplo DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196,

DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 o DOM1h-574-214. La identidad de la secuencia de nucleótidos se puede determinar a lo largo de toda la longitud de la secuencia de nucleótidos que codifica el dAb anti-TNFR1 seleccionado.

5 La invención también proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención. En ciertas formas de realización, el vector es un vector de expresión que comprende uno o más elementos de control de la expresión o secuencias operablemente unidas al ácido nucleico recombinante de la invención. La invención también proporciona una célula huésped recombinante, que comprende una molécula de ácido nucleico o un vector de la invención. Vectores adecuados (por ejemplo, plásmidos, fágidos), elementos de control de la expresión, células huésped y procedimientos para producir células huésped recombinantes de la invención son bien conocidos en la técnica y ejemplos se describen más adelante en la presente memoria descriptiva.

10 Los vectores de expresión adecuados pueden contener una serie de componentes, por ejemplo un origen de replicación, un gen marcador seleccionable, uno o más elementos de control de la expresión, tal como un elemento de control de la transcripción (por ejemplo, promotor, potenciador, terminador) y/o una o más señales de traducción, una secuencia señal o secuencia líder, y similares. Los elementos de control de la expresión y una secuencia señal, si están presentes, pueden ser proporcionados por el vector u otra fuente. Por ejemplo, las secuencias de control de la transcripción y/o la traducción de un ácido nucleico clonado que codifica una cadena de anticuerpo se pueden usar para dirigir la expresión.

15 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 operablemente unido a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, una cadena de anticuerpo o una porción del mismo, de modo que dirige la transcripción del ácido nucleico. Se dispone de diversos promotores adecuados para huéspedes procariotas (por ejemplo, los promotores lac, tac, T3, T7 para *E. coli*) y eucariotas (por ejemplo, el promotor temprano o tardío del virus 40 de simios, el promotor de la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el promotor del citomegalovirus, el promotor tardío del adenovirus).

20 Además, los vectores de expresión normalmente comprenden un marcador seleccionable para la selección de células huésped que portan el vector y, en el caso de un vector de expresión replicable, un origen de replicación. Los genes que codifican productos que confieren resistencia a antibióticos o fármacos son marcadores seleccionables comunes y pueden usarse en células procariotas (por ejemplo, gen de la β -lactamasa (resistencia a ampicilina), gen Tet para resistencia a tetraciclina) y eucariotas (por ejemplo, genes de resistencia a neomicina (G148 o geneticina), gpt (ácido micofenólico), ampicilina o higromicina). Los genes marcadores de la dihidrofolato reductasa permiten la selección con metotrexato en diversos huéspedes. Los genes que codifican el producto génico de marcadores auxótrofos del huésped (por ejemplo, LEU2, URA3, HIS3) a menudo se usan como marcadores seleccionables en levaduras. También se contempla el uso de vectores víricos (por ejemplo, baculovirus) o fagos y vectores que son capaces de integrarse en el genoma de la célula huésped, tales como vectores retrovirales. En la técnica se conocen bien vectores de expresión adecuados para expresión en células de mamífero y procariotas (*E. coli*), células de insectos (células S2 de *Drosophila* Schnieder. Sf9) y levaduras (*P. methanolica*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*).

30 Células huésped adecuadas pueden ser procariotas, incluidas células bacterianas tales como *E. coli*, *B. subtilis* y/u otras bacterias adecuadas; células eucarióticas, tales como células fúngicas o de levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Aspergillus* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*), u otras células eucariotas menores y células de eucariotas superiores tales como las de insectos (células S2 de *Drosophila* Schnieder, células de insectos Sf9 (documento WO 94/26087 (O'Connor)), de mamíferos (por ejemplo, células COS, tales como COS-1 (nº de registro en la ATCC CRL-1650) y COS-7 (nº de registro en la ATCC CRL-1651), CHO (por ejemplo, nº de registro en la ATCC CRL-9096, CHO DG44 (Urlaub, G. y Chasin, LA., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(7):4216-4220 (1980))), 293 (nº de registro en la ATCC CRL-1573), HeLa (nº de registro en la ATCC CCL-2), CV1 (nº de registro en la ATCC CCL-70), WOP (Dailey, L., et al., J. Virol., 54:739-749 (1985), 3T3, 293T (Pear, W. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:8392-8396 (1993)) células NS0, SP2/0, células HuT 78 y similares, o plantas (por ejemplo, tabaco). (Véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc. (1993).) En algunas formas de realización, la célula huésped es una célula huésped aislada y no es parte de un organismo multicelular (por ejemplo, planta o animal). En ciertas formas de realización, la célula huésped es una célula huésped no humana.

40 La invención también proporciona un procedimiento para producir un ligando (por ejemplo, ligandos de especificidad doble y ligandos multiespecíficos) de la invención, que comprende mantener una célula huésped recombinante que comprende un ácido nucleico recombinante de la invención en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico recombinante, de modo que se expresa el nucleico recombinante y se produce un ligando. En algunas formas de realización, el procedimiento además comprende aislar el ligando.

45 Se hace referencia al documento WO2006038027, para detalles de la divulgación que es aplicable a formas de realización de la presente invención. Por ejemplo, una divulgación relevante se refiere a la preparación de ligandos basados en dominios variables sencillos de inmunoglobulina, sistemas de vectores en bibliotecas, construcción de

biblioteca, combinación de dominios variables sencillos, caracterización de ligandos, estructura de ligandos, esqueletos, armazones proteicos, diversificación de la secuencia canónica, ensayos y composiciones y USIS terapéuticos y diagnósticos, así como definiciones de “unido operablemente”, “naive”, “prevención”, “supresión”, “tratamiento” y “dosis terapéuticamente eficaz”.

5 Formatos

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

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

En una forma de realización, la presente invención proporciona un ligando (por ejemplo, polipéptido, dominio variable, antagonista, ligando multiespecífico) o una composición que comprende un ligando de acuerdo con la invención que tiene una semivida t_{α} en el intervalo de 15 minutos o más. En una forma de realización, el extremo inferior del intervalo es de 30 minutos, 45 minutos, 1 hour, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o como alternativa, un ligando o composición de acuerdo con la invención tendrá una semivida t_{α} en el intervalo de hasta 12 horas, incluidas. En una forma de realización, el extremo superior del intervalo es 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 horas. Un ejemplo de un intervalo adecuado es de 1 a 6 horas, de 2 a 5 horas o de 3 a 4 horas.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un ligando (por ejemplo, polipéptido, dominio variable, antagonista, ligando multiespecífico) o una composición que comprende un ligando de acuerdo con la invención que tiene una semivida t_{β} en el intervalo de 2,5 horas o más. En una forma de realización, el extremo inferior del intervalo es de aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, o aproximadamente 12 horas. Además, o como alternativa, un ligando o composición de acuerdo con la invención tendrá una semivida t_{β} en el intervalo de hasta e incluidos 21 días. En una forma de realización, el extremo superior del intervalo es de aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 15 días o aproximadamente 20 días. En una forma de realización, un ligando o composición de acuerdo con la invención tendrá una semivida t_{β} en el intervalo de aproximadamente 12 a aproximadamente 60 horas. En otra forma de realización, estará en el intervalo de aproximadamente 12 a aproximadamente 48 horas. En otra forma de realización más, estará en el intervalo de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 horas.

Además, o como alternativa a, de 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 de la AUC (área bajo la curva) en el intervalo de aproximadamente 1 mg·min/ml o más. En una forma de realización, el extremo inferior del intervalo es de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 100, aproximadamente 200 o aproximadamente 300 mg·min/ml. Además, o como alternativa, un ligando o composición de acuerdo con la invención tiene una AUC en el intervalo de hasta aproximadamente 600 mg·min/ml. En una forma de realización, el extremo superior del intervalo es de aproximadamente 500, aproximadamente 400, aproximadamente 300, aproximadamente 200, aproximadamente 150, aproximadamente 100, aproximadamente 75 o aproximadamente 50 mg·min/ml. En una forma de realización, un ligando de acuerdo con la invención tendrá una AUC en el intervalo seleccionado del grupo que consiste en los siguientes: aproximadamente 15 a aproximadamente 150 mg·min/ml, aproximadamente 15 a aproximadamente 100 mg·min/ml, aproximadamente 15 a aproximadamente 75 mg·min/ml, y aproximadamente 15 a aproximadamente 50 mg·min/ml.

Los polipéptidos y dAb de la invención y antagonistas que comprenden éstos pueden formatearse de modo que tengan un tamaño hidrodinámico más grande mediante, por ejemplo, unión de un grupo PEG, seroalbúmina, transferrina, receptor de transferrina o al menos la porción del mismo de unión a transferrina, una región Fc del anticuerpo, o mediante conjugación a un dominio de anticuerpo. Por ejemplo, polipéptidos dAb y antagonistas formateados como un fragmento de unión a antígeno más grandes de un anticuerpo o como un anticuerpo (por ejemplo, formateado como Fab, Fab', F(ab')₂, IgG, scFv).

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

determinarse usando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar cromatografía de filtración en gel para determinar el tamaño hidrodinámico de un ligando. Matrices de filtración en gel adecuadas para determinar los tamaños hidrodinámicos de los ligandos, tales como matrices de agarosa reticulada, son bien conocidas y fácilmente disponibles.

- 5 El tamaño de un formato de ligando (por ejemplo, el tamaño de un resto PEG unido a un monómero de dAb) se puede variar en función de la aplicación deseada. Por ejemplo, cuando se pretende que el ligando salga de la circulación y entre en tejidos periféricos, es deseable mantener el tamaño hidrodinámico del ligando bajo para facilitar la extravasación desde la corriente sanguínea. Como alternativa, cuando se desee que el ligando permanezca en la circulación sistémica durante un periodo de tiempo más prolongado, el tamaño del ligando se puede incrementar mediante, por ejemplo, formateo en forma de una proteína similar a Ig.

Extensión de la semivida apuntando a un antígeno o epítipo que incrementa la semivida in vivo

- 15 El tamaño hidrodinámico de un ligando y su semivida en suero también puede incrementarse mediante conjugación o asociación de un polipéptido de unión a TNFR1, dAb o antagonista de la invención con un dominio de unión (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a un antígeno o epítipo que aumenta la semivida in vivo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, el agente de unión a TNFR1 (por ejemplo, polipéptido) se puede conjugar o unir a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-receptor de FC neonatal antiseroalbúmina, por ejemplo dAb receptor de Fc anti-SA o antineonatal, Fab, Fab' orscFv, o a un affibody anti-SA o affibody del receptor de Fc anti-neonatal o un avímero anti-SA o un dominio de unión anti-SA que comprende un armazón seleccionado de, entre otros, el grupo que consiste en CTLA-4, lipocalina, SpA, un affibody, un avímero, 20 GroEl y fibronectina (véase el documento WO2008096158 para una divulgación de estos dominios de unión, en la que los dominios y sus secuencias se incorporan en la presente memoria descriptiva por referencia y forman parte de la divulgación del presente texto). Conjugación se refiere a una composición que comprende polipéptido, dAb o antagonista de la invención que está unido (de forma covalente o no covalente) a un dominio de unión que se une a seroalbúmina.

- 25 Los polipéptidos adecuados que potencian la semivida sérica in vivo incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión del agente neurofarmacéutico-ligando específico del receptor de transferrina (véase la patente de EE.UU. n° 5,977,307, cuyas enseñanzas se incorporan en la presente memoria descriptiva por referencia), receptor de células endoteliales capilares del cerebro, transferrina, receptor de transferrina (por ejemplo, receptor de transferrina soluble), insulina, receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF 1), receptor del factor de crecimiento 2 similar a la 30 insulina (IGF 2), receptor de la insulina, factor de coagulación sanguíneo X, antitripsina α I y HNF 1 α . Entre los polipéptidos adecuados que potencian la semivida también se incluyen glicoproteína alfa-1 (orosomucoide; AAG), antiqumotripsina 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 del complemento C3 (C3), componente del complemento C4 (C4), inhibidor de la esterasa C1 (C1 INH), proteína C-reactiva (CRP), ferritina (FER), 35 hemopexina (HPX), lipoproteína(a) (Lp(a)), proteína de unión a manosa (MBP), mioglobina (Myo), prealbúmina (transtiretina; PAL), proteína de unión a retinol (RBP) y factor reumatoide (RF).

- Proteínas adecuadas de la matriz extracelular incluyen, por ejemplo, colágenos, laminas, integrinas y fibronectina. Los colágenos son las proteínas principales de la matriz extracelular. Actualmente se conocen aproximadamente 15 tipos de moléculas de colágeno, que se encuentran en diferentes partes del cuerpo, p.ej., colágeno de tipo I (que 40 representa el 90% del colágeno corporal) que se encuentran en huesos, piel, tendón, ligamentos, córnea, órganos internos, o colágeno de tipo II que se encuentra en cartílago, discos vertebrales, notocorda y humor vítreo del ojo.

- Proteínas adecuadas de la sangre incluyen, por ejemplo, proteínas plasmáticas (por ejemplo, fibrina, α -2 macroglobulina, seroalbúmina, fibrinógeno (e.g., fibrinógeno A, fibrinógeno B), proteína A amiloide sérica, 45 haptoglobina, profilina, ubiquitina, uteroglobulina y α -2-microglobulina), enzimas e inhibidores enzimáticos (e.g., plasminógeno, lisozima, cistatina C, alfa-1-antitripsina e inhibidor de la tripsina pancreática, proteínas del sistema inmunitario, tal como proteínas inmunoglobulinas (e.g., cadenas ligeras de inmunoglobulinas, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, (kappa/lambda)), proteínas vehículoas (e.g., proteína de unión a retinol, α -1 microglobulina), defensinas (e.g., beta-defensina 1, defensina de neutrófilos 1, defensina de neutrófilos 2 y defensina de neutrófilos 3) y similares.

- Proteínas adecuadas que se encuentran en la barrera hematoencefálica o en el tejido neural incluyen, por ejemplo, 50 receptor de melanocortina, mielina, vehículo de ascorbato y similares.

- Entre los polipéptidos adecuados que potencian la semivida sérica in vivo también se incluyen las proteínas localizadas en el riñón (e.g., policistina, colágeno de tipo IV, vehículo aniónico orgánico KI, antígeno de Heymann'), proteínas localizadas en el hígado (e.g., alcohol deshidrogenasa, G250), proteínas localizadas en el pulmón (e.g., miocardiopatía dilatada), proteínas localizadas en la piel (e.g., queratina), proteínas específicas de hueso, tal como 55 proteínas morfogénicas (BMP), que son un subconjunto del factor de crecimiento transformante β , superfamilia de proteínas que muestran actividad osteogénica (e.g., BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8), proteínas específicas tumorales (e.g., antígeno trofoblástico, receptor de herceptina, receptor de estrógenos, catepsinas (e.g., catepsina B, que se puede unir en el hígado y el bazo))

Entre las proteínas específicas de enfermedad adecuadas se incluyen, por ejemplo, antígenos que sólo se expresan en células T activadas, incluidas LAG-3 (gen de activación de linfocitos), ligando de osteoprotegerina (OPGL; véase Nature 402, 304-309 (1999)), OX40 (un miembro de la familia de los receptores de TNF, expresado sobre células T activadas y específicamente regulado por incremento en células productoras de virus de la leucemia de células T humana de tipo -I (HTLV-I); véase Immunol. 165 (1):263-70 (2000)). Entre las proteínas específicas de enfermedad adecuadas se incluyen, por ejemplo, metaloproteasas (asociadas con artritis/cáncer) incluidas CG6512 de *Drosophila*, paraplegina humana, FtsH humana, AFG3L2 humana, ftsH murino; y factores de crecimiento angiogénico, incluido el factor de crecimiento fibroblástico ácido (FGF-1), el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF-2), factor de crecimiento endotelial vascular /factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF), factor transformante de crecimiento ($TGF\ \alpha$), factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$), angiogenina, interleukina-3 (IL-3), interleukina-8 (IL-8), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento placentario (P1GF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas midkine BB (PDGF), y fractalkina.

Entre los polipéptidos que potencian la semivida sérica in vivo también incluye proteínas de tensión, tales como las proteínas del shock térmico (HSP). Las HSP normalmente se encuentran intracelularmente. Cuando se encuentran extracelularmente es indicativo de que la célula ha muerto y sus componentes se han diseminado. Esta muerte celular no programada (necrosis) se produce como resultado de traumatismo, enfermedad o lesión, las HSP desencadenan una respuesta del sistema inmunitario. La unión a HSP extracelular pueda dar lugar a localizar las composiciones de la invención en un punto enfermo.

Las proteínas adecuadas implicadas en el transporte de Fc incluyen, por ejemplo, receptor de Brambell (también conocido como FcRB). Este receptor de Fc tiene dos funciones, ambas potencialmente útiles para liberar. Las funciones son (1) transporte de IgG de la madre al hijo a través de la placenta (2) protección de IgG de la degradación, de modo que se prolonga su semivida en suero. Se piensa que el receptor recicla IgG de los endosomas. (Véase, Holliger et al, Nat Biotechnol 15(7):632-6 (1997).)

dAb que se unen a la seroalbúmina

La invención, en una forma de realización, proporciona un ligando, polipéptido o antagonista (por ejemplo, ligandos de especificidad doble y dAb anti-TNFR1 (un primer dAb)) que se une al TNFR1 y un segundo dAb que se une a la seroalbúmina (SA), donde el segundo dAb se une a la SA con una KD determinada mediante resonancia en plasmón superficial de aproximadamente 1nM a aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400 o aproximadamente 500 μ M (es decir., $\times 10^{-9}$ a 5×10^{-4} M), o aproximadamente 100 nM a aproximadamente 10 μ M, o aproximadamente 1 a aproximadamente 5 μ M o aproximadamente 3 a aproximadamente 70 nM o aproximadamente 10nM a aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 μ M. Por ejemplo, de aproximadamente 30 a aproximadamente 70 nM, determinado mediante resonancia en plasmón superficial. En una forma de realización, el primer dAb (o monómero de dAb) se une a la SA (por ejemplo, HSA) con una KD determinada mediante resonancia en plasmón superficial de aproximadamente 1, aproximadamente 50, aproximadamente 70, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 300 nM o aproximadamente 1, aproximadamente 2 o aproximadamente 3 μ M. En una forma de realización, para un ligando de especificidad doble que comprende un primer dAb anti-SA y un segundo dAb frente a TNFR1, la afinidad (por ejemplo, KD y/o Koff medida mediante resonancia en plasmón superficial, por ejemplo, usando BiaCore) del segundo dAb por su diana es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10000 veces (por ejemplo, aproximadamente 100 a aproximadamente 100000, o aproximadamente 1000 a aproximadamente 100000, o de aproximadamente 10000 a aproximadamente 100000 veces) la afinidad del primer dAb por SA. En una forma de realización, la seroalbúmina es seroalbúmina humana (HSA). Por ejemplo, el primer dAb se une a la SA con una afinidad de aproximadamente unos 10 μ M, mientras que el segundo dAb se une a su diana con una afinidad de aproximadamente 100 pM. En una forma de realización, la seroalbúmina es seroalbúmina humana (HSA). En una forma de realización, el primer dAb se une a la SA (por ejemplo, HSA) con una KD de aproximadamente unos 50, por ejemplo de aproximadamente 70, aproximadamente 100, aproximadamente 150 o aproximadamente 200 nM. Detalles sobre ligandos con especificidad doble se encuentran en los documentos WO03002609, WO04003019, WO2008096158 y WO04058821.

En una forma de realización, los ligandos de la invención pueden comprender un dAb que se une a la seroalbúmina (SA) con una KD determinada mediante resonancia en plasmón superficial de aproximadamente 1nM a aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400 o aproximadamente 500 μ M (i.e., $\times$ aproximadamente 10^{-9} a aproximadamente 5×10^{-4} M), o aproximadamente 100 nM a aproximadamente 10 μ M, o aproximadamente 1 a aproximadamente 5 μ M o aproximadamente 3 a aproximadamente 70 nM o aproximadamente 10nM a aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 μ M. Por ejemplo de aproximadamente 30 a aproximadamente 70 nM determinada mediante resonancia en plasmón superficial. En una forma de realización, el primer dAb (o un monómero de dAb) se une a la SA (por ejemplo, HSA) con una KD determinada mediante

resonancia en plasmón superficial de aproximadamente 1, aproximadamente 50, aproximadamente 70, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 300 nM o aproximadamente 1, aproximadamente 2 o aproximadamente 3 μ M. En una forma de realización, el primero y el segundo dAb están unidos por un enlazador, por ejemplo un enlazador de 1 a 4 aminoácidos o de 1 a 3 aminoácidos o de más de 3 aminoácidos o de más de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 aminoácidos. En una forma de realización, se usa un enlazador más largo (mayor de 3 aminoácidos) para aumentar la potencia (KD de uno o ambos dAb en el antagonista).

En formas de realización concretas de los ligandos y antagonistas, el dAb se une a seroalbúmina humana y compite por la unión a albúmina con un dAb seleccionado del grupo que consiste en DOM7h-11, DOM7h-11-3, DOM7h-11-12, DOM7h-11-15, DOM7h-14, DOM7h-14-10, DOM7h-14-18 y DOM7m-16.

En formas de realización concretas de los ligandos y antagonistas, el dAb se une a seroalbúmina humana y compite por la unión a albúmina con un dAb seleccionado del grupo que consiste en

MSA-16, MSA-26 (véase el documento WO04003019 para la divulgación de estas secuencias

DOM7m-16 (SEC ID N°: 473), DOM7m-12 (SEC ID N° 474), DOM7m-26 (SEC ID N° 475), DOM7m-1 (SEC ID N° 476), DOM7m-3 (SEC ID N° 477), DOM7m-4 (SEC ID N° 478), DOM7m-5 (SEC ID N° 479), DOM7m-7 (SEC ID N° 480), DOM7m-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), DOM7m-13 (SEC ID N° 497), DOM7m-14 (SEC ID N° 498), DOM7m-15 (SEC ID N° 499), DOM7m-16 (SEC ID N° 500), DOM7m-17 (SEC ID N° 501), DOM7m-18 (SEC ID N° 502), DOM7m-19 (SEC ID N° 503), DOM7m-20 (SEC ID N° 504), DOM7m-21 (SEC ID N° 505), DOM7m-22 (SEC ID N° 506), DOM7m-23 (SEC ID N° 507), DOM7m-24 (SEC ID N° 508), DOM7m-25 (SEC ID N° 509), DOM7m-26 (SEC ID N° 510), DOM7m-27 (SEC ID N° 511), DOM7m-28 (SEC ID N° 512), DOM7m-29 (SEC ID N° 513), DOM7m-30 (SEC ID N° 514), DOM7m-31 (SEC ID N° 515), DOM7m-32 (SEC ID N° 516), DOM7m-33 (SEC ID N° 517) (véase el documento WO2007080392 para la divulgación de estas secuencias; las SEC ID N° en este párrafo son las que aparecen en el documento WO2007080392),

dAb8 (dAb10), dAb 10, dAb36, dAb7r20 (DOM7r20), dAb7r21 (DOM7r21), dAb7r22 (DOM7r22), dAb7r23 (DOM7r23), dAb7r24 (DOM7r24), dAb7r25 (DOM7r25), dAb7r26 (DOM7r26), dAb7r27 (DOM7r27), dAb7r28 (DOM7r28), dAb7r29 (DOM7r29), dAb7r29 (DOM7r29), dAb7r31 (DOM7r31), dAb7r32 (DOM7r32), dAb7r33 (DOM7r33), dAb7r33 (DOM7r33), dAb7h22 (DOM7h22), dAb7h23 (DOM7h23), dAb7h24 (DOM7h24), dAb7h25 (DOM7h25), dAb7h26 (DOM7h26), dAb7h27 (DOM7h27), dAb7h30 (DOM7h30), dAb7h31 (DOM7h31), dAb2 (dAbs 4,7,41), dAb4, dAb7, dAb11, dAb12 (dAb7m12), dAb13 (dAb 15), dAb15, dAb16 (dAb21, dAb7m16), dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25 (dAb26, dAb7m26), dAb27, dAb30 (dAb35), dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38 (dAb54), dAb41, dAb46 (dAbs 47, 52 and 56), dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1 (DOM 7r1), dAb7r3 (DOM7r3), dAb7r4 (DOM7r4), dAb7r5 (DOM7r5), dAb7r7 (DOM7r7), dAb7r8 (DOM7r8), dAb7r13 (DOM7r13), dAb7r14 (DOM7r14), dAb7r15 (DOM7r15), dAb7r16 (DOM7r16), dAb7r17 (DOM7r17), dAb7r18 (DOM7r18), dAb7r19 (DOM7r19), dAb7h1 (DOM7h1), dAb7h2 (DOM7h2), dAb7h6 (DOM7h6), dAb7h7 (DOM7h7), dAb7h8 (DOM7h8), dAb7h9 (DOM7h9), dAb7h10 (DOM7h10), dAb7h11 (DOM7h11), dAb7h12 (DOM7h12), dAb7h13 (DOM7h13), dAb7h14 (DOM7h14), dAb7p1 (DOM7p1), y dAb7p2 (DOM7p2) (véase el documento WO2008096158 para la divulgación de estas secuencias). Los nombres alternativos se muestran entre paréntesis después del dAb, por ejemplo dAb8 tiene un nombre alternativo que es dAb10, es decir dAb8 (dAb10).

En ciertas formas de realización, el dAb se une a seroalbúmina humana y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% con la secuencia de aminoácidos de un dAb seleccionado del grupo que consiste en DOM7h-11, DOM7h-11-3, DOM7h-11-12, DOM7h-11-15, DOM7h-14, DOM7h-14-10, DOM7h-14-18 y DOM7m-16.

En ciertas formas de realización, el dAb se une a seroalbúmina humana y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% con la secuencia de aminoácidos de un dAb seleccionado del 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), DOM7m-1 (SEC ID N° 476), DOM7m-3 (SEC ID N° 477), DOM7m-4 (SEC ID N° 478), DOM7m-5 (SEC ID N° 479), DOM7m-7 (SEC ID N° 480), DOM7m-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), DOM7m-13 (SEC ID N° 497), DOM7m-14 (SEC ID N° 498), DOM7m-15 (SEC ID N° 499), DOM7m-16 (SEC ID N° 500), DOM7m-17 (SEC ID N° 501), DOM7m-18 (SEC ID N° 502), DOM7m-19 (SEC ID N° 503), DOM7m-20 (SEC ID N° 504), DOM7m-21 (SEC ID N° 505), DOM7m-22 (SEC ID N° 506), DOM7m-23 (SEC ID N° 507), DOM7m-24 (SEC ID N° 508), DOM7m-25 (SEC ID N° 509), DOM7m-26 (SEC ID N° 510), DOM7m-27 (SEC ID N° 511), DOM7m-28 (SEC ID N° 512), DOM7m-29 (SEC ID N° 513), DOM7m-30 (SEC ID N° 514), DOM7m-31 (SEC ID N° 515), DOM7m-32 (SEC ID N° 516), DOM7m-33 (SEC ID N° 517) (las SEQ ID No en este párrafo son aquéllas 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 seroalbúmina humana puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% con DOM7h-11-3 o DOM7h-14-10.

Por ejemplo, el dAb que se une a la seroalbúmina humana puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 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) or DOM7h-27 (SEC ID N° 495) (las SEC ID N° en este párrafo son aquéllas que aparecen en el documento WO2007080392), o

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 o dAb7h14.

En ciertas formas de realización, el dAb se une a seroalbúmina humana y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% con la secuencia de aminoácidos de un dAb seleccionado del 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) (the SEQ ID No's in this paragraph are those that appear in 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 formas de realización más concretas, el dAb es un V_k dAb que se une a la seroalbúmina humana y tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del 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) (las SEC ID N° en este párrafo son aquéllas 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 formas de realización más concretas, el dAb es un $V_{\square}$ dAb que se une a la seroalbúmina humana y tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de dAb7h30 and dAb7h31.

En formas de realización más concretas, el dAb es dAb7h11 o dAb7h14. En un ejemplo, el dAb es DOM7h-11-3. En otro ejemplo, el dAb es DOM7h-14-10.

En otras formas de realización, el dAb, ligando o antagonista se une a la seroalbúmina humana y comprende una, dos o tres de las CDR de cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriores, por ejemplo una, dos o tres de las CDR de DOM7h-11-3, DOM7h-14-10, dAb7h11 o dAb7h14.

V_{HH} de camélidos adecuadas que se unen a seroalbúmina incluyen las descritas en el documento WO 2004/041862 (Ablynx N.V.) y en el documento WO2007080392, tales como la Secuencia A (SEC ID N° 518), la secuencia B (SEC ID N° 519), La secuencia C (SEC ID N° 520), La secuencia D (SEC ID N° 521), La secuencia E (SEC ID N° 522), La secuencia F (SEC ID N° 523), la secuencia G (SEC ID N° 524), la secuencia H (SEC ID N° 525), la secuencia I (SEC ID N° 526), La secuencia J (SEC ID N° 527), la secuencia K (SEC ID N° 528), la secuencia L (SEC ID N° 529), la secuencia M (SEC ID N° 530), la secuencia N (SEC ID N° 531), la secuencia O (SEC ID N° 532), la secuencia P (SEC ID N° 533), la secuencia Q (SEC ID N° 534), en las que estos números de secuencia corresponden a los citados en los documentos WO2007080392 o WO 2004/041862 (Ablynx N.V.) En ciertas formas de realización, la V_{HH} de camélidos se une a seroalbúmina humana y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% con el ALB1 divulgado en el documento WO2007080392 o una cualquiera de las SEC ID N° 518-534, en las que estos números de secuencia corresponden a los citados en los documentos WO2007080392 o WO 2004/041862.

En algunas formas de realización, el ligando o antagonista comprende un dAb anti-seroalbúmina que compite con cualquier dAb anti-seroalbúmina divulgado en la presente memoria descriptiva por la unión a seroalbúmina (por ejemplo, seroalbúmina humana).

En una forma de realización alternativa, el antagonista o ligando comprende un resto de unión específico de SA (por ejemplo, SA humana), en el que el resto comprende secuencias no inmunoglobulínicas como las descritas en el documento WO2008096158.

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

En una forma de realización, un (uno o más) resto de extensión de la semivida (por ejemplo, albúmina, transferrina y fragmentos y análogos de los mismos) está conjugado o asociado con el polipéptido de unión a TNFR1, dAb o antagonista de la invención. Ejemplos de albúmina, fragmentos de albúmina o variantes de albúmina adecuados para usar en un formato de unión a TNFR1 se describen en el documento WO 2005077042. En particular, en la presente invención se pueden usar las siguientes albúminas, fragmentos de albúmina o variantes de albúmina:

- SEC ID N° 1 (como se divulga en el documento WO 2005077042, estando esta secuencia explícitamente incorporada en la presente divulgación por referencia);
- Fragmento o variante de albúmina que comprende o consta de los aminoácidos 1-387 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005077042;
- Albúmina o Fragmento o variante de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) los aminoácidos 54 a 61 of SEC ID N° 1 en el documento WO 2005077042; (b) los aminoácidos 76 a 89 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005077042; (c) los aminoácidos 92 a 100 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005077042; (d) los aminoácidos 170 a 176 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005077042; (e) los aminoácidos 247 a 252 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005077042; (f) los aminoácidos 266 a 277 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005077042; (g) los aminoácidos 280 a 288 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005077042; (h) los aminoácidos 362 a 368 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005077042; (i) los aminoácidos 439 a 447 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005077042 (j) los aminoácidos 462 a 475 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005077042; (k) los aminoácidos 478 a 486 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005077042; and (l) los aminoácidos 560 a 566 de la SEC ID N° 1 en el documento WO 2005077042.

Otros ejemplos de albúmina, fragmentos de albúmina y análogos de albúmina adecuados para usar en un formato de unión a TNFR1 se describen en el documento WO WO 03076567. En particular, en la presente invención se pueden usar las albúminas, fragmentos o variantes de albúmina siguientes:

- Seroalbúmina humana tal como se describe en el documento WO 03076567, por ejemplo, en la figura 3;
- Seroalbúmina humana (HA) constituida por polipéptido no glicosilado de cadena sencilla de 585 aminoácidos con un peso molecular de 66,500 (véase Meloun, et al., FEBS Letters 58:136 (1975); Behrens, et al., Fed. Proc. 34:591 (1975); Lawn, et al., Nucleic Acids Research 9:6102-6114 (1981); Minghetti, et al., J. Biol. Chem. 261:6747 (1986));
- Una variante o análogo o fragmento polimórfico de albúmina tal como se describe en Weitkamp, et al., Ann. Hum. Genet. 37:219 (1973);

- Un fragmento o variante de albúmina tal 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 tal 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 de 178 a 199.

5 Cuando (uno o más) restos de extensión de la semivida (por ejemplo, albúmina, transferrina y fragmentos y análogos de las mismas) se usan para formatear los polipéptidos de unión a TNFR1, dAb y antagonistas de la invención, se pueden conjugar usando cualquier procedimiento adecuado, tal como, mediante fusión directa con el resto de unión a TNFR1 (por ejemplo, dAb anti-TNFR1), por ejemplo usando una construcción de un único nucleótido que codifica una proteína de fusión, en la que la proteína de fusión está codificada en forma de una cadena polipeptídica sencilla con el resto de extensión de la semivida localizada en los extremos N o C del resto de unión a TNFR1. Como alternativa, la conjugación se puede realizar usando un enlazador peptídico entre los restos, por ejemplo un enlazador peptídico como se describe en los documentos WO 03076567 o WO 2004003019. Normalmente, un polipéptido que aumenta la semivida en suero in vivo es un polipéptido natural in vivo y que resiste la degradación o eliminación mediante mecanismos endógenos que eliminan el material no deseado del organismo (por ejemplo, ser humano). Por ejemplo, un polipéptido que aumenta la semivida en suero in vivo se puede seleccionar de proteínas de la matriz extracelular, proteínas encontradas en sangre, proteínas encontradas en la barrera hematoencefálica o en tejido neural, proteínas localizadas en el riñón, el hígado, los pulmones, el corazón, la piel o los huesos, proteínas de estrés, proteínas específicas de enfermedad o proteínas implicadas en el transporte de Fc.

20 En formas de realización de la invención descritas a lo largo de esta divulgación, en lugar del uso de un dominio variable sencillo anti-TNFR1 ("dAb") en un antagonista o ligando de la invención, se contempla que el destinatario experto pueda usar un polipéptido o dominio que comprenda una o más o todas 3 las CDR de un dAb de la invención que se une al TNFR1 (por ejemplo, CDR injertadas en un armazón o esqueleto proteico adecuado, por ejemplo, un affibody, un armazón SpA, un dominio de clase A del receptor de LDL o un dominio de EGF). La divulgación como un todo debe interpretarse de acuerdo con proporcionar divulgación de antagonistas que usan dichos dominios en lugar de un dAb. A este respecto, véase el documento WO2008096158 para los detalles de cómo producir diversas bibliotecas sobre la base de armazones proteicos y selección y caracterización de dominios de dichas bibliotecas).

30 Por tanto, en una forma de realización un antagonista de la invención comprende un dominio de variable sencillo de inmunoglobulina o anticuerpo de dominio (dAb) que tiene especificidad de unión por TNFR1 o las regiones determinantes de complementariedad de dicho dAb en un formato adecuado. El antagonista puede ser un polipéptido que consta de dicho dAb, o consta esencialmente de dicho 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 de tipo IgG, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂), o un ligando de especificidad doble que comprende un dAb que se une a TNFR1 y un segundo dAb que se une a otra proteína, antígeno o epítipo diana (por ejemplo, seroalbúmina).

40 Los polipéptidos, dAb y antagonistas de acuerdo con la invención se pueden formatear como varios formatos de anticuerpos adecuados que se conocen en la técnica, tales como formatos de tipo IgG, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpo, cadenas ligeras de anticuerpo, homodímeros y heterodímeros de las cadenas pesadas y/o las cadenas ligeras del anticuerpo de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, un fragmento Fv (por ejemplo, Fv de cadena sencilla(scFv), un Fv unido por disulfuro), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un dominio variable de anticuerpo sencillo (por ejemplo, un dAb, V_H, V_L), un dAb y versiones modificadas de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, modificados por la unión covalente de polialuilenglicol (por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol) u otro polímero adecuado).

45 En algunas formas de realización, la invención proporciona un ligando (por ejemplo, un antagonista anti-TNFR1) que es un formato de tipo IgG. Dichos formatos tienen la estructura convencional de cuatro cadenas de una molécula de IgG (2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras), en las que una o más de las regiones variables (V_H y/o V_L) se han sustituido con un dAb de la invención. En una forma de realización, cada una de las regiones variables (2 regiones V_H y 2 regiones V_L) está sustituida con un dAb o dominio variable sencillo, al menos uno de los cuales es un dAb anti-TNFR1 de acuerdo con la invención. Los dAb o dominios variables sencillos que están incluidos en un formato de tipo IgG pueden tener la misma o diferentes especificidades. En algunas formas de realización, el formato de tipo IgG es tetravalente y puede tener uno (sólo anti-TNFR1), dos (por ejemplo, anti-TNFR1 y anti-SA), tres o cuatro especificidades. Por ejemplo, el formato de tipo IgG puede ser monoespecífico y comprende 4 dAb que tienen la misma especificidad; biespecífico y comprende 4 dAb que tienen la misma especificidad y otro dAb que tiene una especificidad diferente; biespecífico y comprende 2 dAb que tienen la misma especificidad y dos dAb que 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 tercero dAb; o tetraespecífico y comprende 4 dAb cada uno con una especificidad diferente. Se pueden preparar fragmentos de unión a antígeno de formatos de tipo IgG (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scFv). En una forma de realización, los formatos de tipo IgG o fragmentos de unión a antígeno pueden ser monovalentes para TNFR1. Si se desea activación complementaria y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), el

ligando puede ser de un formato de tipo IgG1. Si se desea, el formato de tipo IgG puede comprender una región constante mutada (región constante de la cadena pesada de la IgG variante) para minimizar la unión a receptores Fc y/o capacidad para fijar el complemento. (véase e.g. Winter et al., GB 2,209,757 B; Morrison et al., WO 89/07142; Morgan et al., WO 94/29351, December 22, 1994).

Los ligandos de la invención (por ejemplo, polipéptidos, dAb y antagonistas) pueden formarse como una proteína de fusión que contiene un primer dominio variable sencillo de inmunoglobulina que está fusionado directamente con un segundo dominio variable sencillo de inmunoglobulina. Si se desea, dicho formato puede comprender además un resto de extensión de la semivida. Por ejemplo, el ligando puede comprender un primer dominio variable sencillo de inmunoglobulina que está fusionado directamente con un segundo dominio variable sencillo de inmunoglobulina que está fusionado directamente con un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se une a seroalbúmina.

En general, la orientación de los dominios polipeptídicos que tienen un sitio de unión con especificidad de unión por una diana y si el ligando comprende un enlazador es cuestión de elección del diseño. No obstante, algunas orientaciones, con o sin enlazadores, pueden proporcionar mejores características de unión que otras orientaciones. Todas las orientaciones (por ejemplo, dAb1-enlazador-dAb2; dAb2-enlazador-dAb1) están abarcados por la invención son ligandos que contienen una orientación que proporciona las deseadas características de unión y pueden identificarse fácilmente mediante cribado.

Los polipéptidos y dAb de acuerdo con la invención, incluidos los monómeros, dímeros y trímeros de dAb, pueden unirse a una región Fc de anticuerpo, que comprende uno o ambos dominios C_H2 y C_H3, y, opcionalmente una región bisagra. Por ejemplo, se pueden usar vectores que codifican ligandos como una secuencia de nucleótidos sencilla a una región Fc para preparar dichos polipéptidos.

La invención además proporciona dímeros, trímeros y polímeros de los monómeros dAb mencionados en lo que antecede.

Ejemplos

Las propiedades biofísicas de los fragmentos de anticuerpo desempeñan un papel fundamental en la determinación de si un fragmento de anticuerpo se puede desarrollar como terapéutica o no. Una de estas propiedades biofísicas es la estabilidad del fragmento de anticuerpo a la precipitación cuando se almacena. La prueba de estabilidad acelerada es una técnica usada para evaluar la estabilidad más rápidamente mediante incubación de la proteína a temperaturas elevadas durante periodos de tiempo prolongados y, después, determinación del nivel de precipitación. Por tanto, los autores han caracterizado siete dAb anti-TNFR1 por su estabilidad acelerada. Debido a las propiedades muy diferentes (especialmente T_m diferentes) de los dAb individuales a estudiar, los estudios de estabilidad acelerada de estos dAb se llevaron a cabo todos a 40°C.

El protocolo usado para la estabilidad acelerada es el siguiente: Todas las proteínas se intercambiaron con tampón en PBS y se ajustaron a una concentración de 1 mg/ml. Se prepararon cuatro alícuotas (correspondientes a 4 puntos de tiempo; 0h, 2h, 23h y 47h) de 250 µl en tubos eppendorf de 0,5 ml. Las primeras muestras (punto de tiempo 47 h) se introdujeron en una estufa a 40°C; 24 horas después se introdujeron en la estufa los segundos alícuotas de 250 µl (punto de tiempo 23 h); otras 20 horas después se introdujeron en la estufa los terceros alícuotas de 250 µl (punto de tiempo 2 h); los alícuotas de 0h se mantuvieron a 4°C durante este estudio. Todos los alícuotas se mantuvieron a 4°C hasta que se introdujeron en la estufa a 40°C. Tras un total de 47 h, todos los alícuotas se sacaron de la estufa y se centrifugaron a 16,100xg durante 10 min. La A280 de cada muestra se midió usando un lector de UV de placas de 96 pocillos para monitorizar la cantidad de proteína todavía en solución. Este dato se usó para calcular la concentración proteica para cada proteína en cada punto de tiempo y, esto, a su vez, se representó frente al tiempo para monitorizar la pérdida de proteína en el tiempo.

Ejemplo 1: Prueba de la estabilidad acelerada de dAb anti-TNFR1

Para los dAb anti-TNFR1, seis dAb anti-TNFR1 se evaluaron, es decir DOM1h-574-72, DOM1h-574-109, DOM1h-574-133, DOM1h-574-138, DOM1h-574-156 y DOM1h-574-180, así como los dAb DOM1h-131-206 anti-TNFR1 no relacionados. Construcciones genéticas de todos estos dAb clonados Sall/NotI en pDOM13 (un vector de expresión derivado de pBR322) se transformaron en *E. coli* HB2151, seguido por expresión de proteínas en el sobrenadante. Los dAb se purificaron del sobrenadante en una purificación de una sola etapa sobre Protein-A Streamline (GE Healthcare cat no. 17-1281-03), seguido por elución con glicina 100 mM a pH2,0 y neutralización con 200 mM Tris pH8. Tras concentración, los dAb se intercambiaron con tampón en PBS mediante diálisis y se analizó la estabilidad acelerada a 1 mg/ml. Los resultados de la estabilidad acelerada se muestran en la Tabla 1, en la que se indica la cantidad de dAb en solución en cada punto de tiempo en forma de un porcentaje de la cantidad de dAb presente a t= 0 h.

Tabla 1: Estabilidad acelerada para dAb anti-TNFR1 cuando se incubó a 1 mg/ml en PBS A 40°C. Los valores representan la cantidad de dAb en solución en cada punto de tiempo en forma de un porcentaje de la cantidad de dAb presentes a t= 0 h.

clon	% en solución			
	0,0h	2,3h	23,0h	47,0h
DOM1h-574-72	100%	91%	18%	9%
DOM1h-574-109	100%	86%	18%	8%
DOM1h-574-133	100%	101%	91%	80%
DOM1h-574-138	100%	100%	39%	18%
DOM1h-574-156	100%	84%	17%	9%
DOM1h-574-180	100%	73%	12%	8%
DOM1h-131-206	100%	102%	101%	100%

Los dAb anti-TNFR1 de la línea DOM1h-574, con al excepción de DOM1h-574-133, tienden a precipiar en las primeras 47 h, lo que tiene como resultado una cantidad sustancialmente reducida de proteína en la solución en ese punto de tiempo. En contraste con esto, el dAb anti-TNFR1 DOM1h-131-206 sí permanece en solución durante este periodo de tiempo. Por tanto, la estabilización del dAb para hacerlo más resistente a la precipitación en el estudio de estabilidad acelerada es beneficiosa.

Ejemplo 2: Selecciones y detección selectiva de dAb anti-TNFR1 de linaje DOM1h-574 para mejorar las propiedades biofísicas

Para identificar nuevos dAb con mejor resistencia a la precipitación tras incubación a temperaturas elevadas se construyeron bibliotecas de PCR propensa a error sobre la base de cinco dAb anti-TNFR1. DOM1h-574-156, DOM1h-574-109, DOM1h-574-138, DOM1h-574-162 and DOM1h-574-180. Las construyeron bibliotecas de PCR propensa a error se construyeron usando estos clones en el vector pDOM13 como molde y después se sometieron a dos ciclos de PCR propensa a error usando GeneMorph II (Stratagene, nº cat. 200550). En la primera ronda se amplificaron 50 ng del vector durante 30 ciclos en un volumen de 50 µl usando los oligonucleótidos AS9 y AS339 y el siguiente perfil de amplificación 2 min 95°C y, después, 30 ciclos de: 15 s a 95°C, 30 s a 50°C, 1 min a 72°C; y al final 10 min a 72°C

En la segunda ronda, se usaron 0.4 µl del primer producto de reacción de la PCR propensa a error como molde para la segunda ronda de mutagénesis con GeneMorph II (Stratagene) con un volumen de 200 µl usando los cebadores anidados AS639 y AS65 y un perfil de amplificación: 2 min 95°C y, después, 35 ciclos de: 15 s a 95°C, 30 s a 50°C, 1 min a 72°C; y al final 10 min a 72°C.

Los productos de la PCR se purificaron en geles E al 2% usando el kit de extracción Qiagen Gel Extraction y se cortaron con las endonucleasas de restricción Sal I and Not I (NEB). Los productos de la reacción de digestión se pasaron por geles E al 2% y los insertos del ADN codificador del dAb se purificaron de los geles E usando el kit Qiagen Gel Extraction. Los insertos purificados se ligaron en el vector de expresión en fago pDOM33 usando el kit de la T4 ADN ligasa (NEB):

40 µl de 30 nM 0,7 µg/µl de vector pDOM33 cortado con Sal I/Not I

30 µl de inserto 300 nM

400 µl de H₂O

50 µl de tampón 10x

15 µl de 400 U/µl de 4 ADN ligasa

Las reacciopnes se incubaron a 16°C durante 18 horas. Los productos de la reacción se extrajeron con fenol-cloroformo, se precipitaron en etanol y se disolvieron en 50 µl de H₂O, se añadieron a 400 µl de células *E. coli* TB1 electrocompetentes y se sometieron a electroporación usando Bio-Rad Gene Pulser II en un volumen de 100 µl, antes se dembrar en placas de agarosa con tetraciclina 2xTY. De media se obtuvieron 2,4x10⁸ transformantes individuales para cada una de las cinco bibliotecas. De media había aproximadamente tres mutaciones de aminoácidos por gen.

Antes de comenzar las selecciones según mejores propiedades biofísicas, las cinco bibliotecas de fagos propensas a error se pre-seleccionaron en TNFR1 humano soluble (R&D Systems), que había sido biotiniliado usando EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotina (Pierce Protein Research Products, Rockford Illinois, cat no. 21327), para enriquecer el fago

funcional con las propiedades de unión del TNFR1. La pre-selección se realizó usando el protocolo siguiente:

1. Bloqueo con 1 ml de M280 Streptavidin Dynabeads (Invitrogen) con 2% Marvel en PBS durante 1 h a temperatura ambiente.
2. Bloqueo de aproximadamente 10^{11} unidades transformantes (Tu) del fago para cada una de las bibliotecas en 0,5 ml de PBS con 2% de Marvel durante una hora a temperatura ambiente.
3. Adición de 0,53 μ l de 47 μ M TNFR1 humano soluble biotinilado hasta 0,5 ml del fago bloqueado. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Añadir a la solución del fago 200 μ l de Dynabeads bloqueadas. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar cinco veces con PBST (PBS con 0,1% de Tween 20)
6. Eluir el fago unido con 500 μ l de glicina 0,1M a pH=2.
7. Neutralizar el fago eluido con 100 μ l de 1 M Tris pH8.

Al final de la ronda de pre-selección se recuperó aproximadamente un 2% del fago Tu de entrada para cada biblioteca. Después de la pre-selección, las bibliotecas para los clones principales DOM1h-574-109, DOM1h-574-138, DOM1h-574-162 and DOM1h-574-180 se combinaron, formando la biblioteca A. La biblioteca B para DOM1h-574-156 se mantuvo por separado.

En esta etapa se adoptaron cuatro estrategias de selección de expresión en fagos para enriquecer para variantes DOM1h-574 con mejores propiedades biofísicas de estas bibliotecas de PCR propensa a error:

- 1) Estabilidad cinética a temperaturas elevadas (65 °C)
- 2) Reversibilidad de la desnaturalización térmica (80°C)
- 3) Resistencia a la digestión con proteasas
- 4) Reversibilidad de la desnaturalización inducida por pH bajo.

Selección de la biblioteca de expresión en fagos Ronda 1.

En la primera ronda de selección de expresión en fagos, las bibliotecas A y B se diluyeron hasta 5×10^{11} Tu/ml en PBS y alícuotas de 100 μ l se sometieron a pretratamiento térmico, con proteasas o con pH bajo. Para las selecciones térmicas (muestras 1 a 4, Tabla 2) se usaron temperaturas de 50°C a 80°C y periodos de incubación de 2 horas o 10 minutos, como se indica en la Tabla 2. La selección con tripsina (Promega, V511) (muestras 5 a 7) se realizó a 10-100 μ g/ml de tripsina durante 2 h a 37°C en PBS y las incubaciones control se efectuaron a temperatura ambiente durante 2 h en PBS (muestras 8 y 9). Tras incubación, a cada una de las muestras 5-9 se añadieron 50 ml de 2xComplete inhibidores de la proteasa (Roche 04 693 116 001). para las selecciones ácidas, las muestras de fago 10-13 se diluyeron 10 veces con respecto a la reserva del fago en 420 μ l de tampón HNC (HEPES 5 Mm, NaCl 5 mM, citrato 100 mM, pH= 3,2). Al final de la incubación (la longitud de la incubación ácida para cada muestra se indica en la Tabla 2), las muestras se neutralizaron con 80 μ l de tampón Tris.

Tras la incubación en estas condiciones de tensión, las bibliotecas de fagos se seleccionaron según los dAb funcionalmente activos mediante incubación con TNFR1 soluble humano biotinilado, como se ha descrito en lo que antecede en la etapa de pre-selección. El único cambio en el protocolo usado fue que se realizaron diez etapas de lavado usando un Kingfisher. Para todas las selecciones con las bibliotecas A y B se determinó el número de fagos recuperado y se muestra en la Tabla 2. Después, los fagos se amplificaron para una siguiente ronda de selección.

Tabla 2: Selecciones de la ronda 1 para mejores propiedades. Se indican las condiciones de selección usadas y el fago Tu recuperado de cada una de las dos bibliotecas tras la selección. El valor inicial todas las selecciones fue 5×10^{10} de fago Tu.

	Condiciones de selección	Biblioteca A	Biblioteca B
1	Incubar a 50°C durante 2 horas	4×10^7	1×10^8
2	Incubar a 55°C durante 2 horas	3×10^7	7×10^7
3	Incubación a 60°C durante 2 horas	1×10^7	2×10^7
4	Incubación a 80°C durante 10 minutos	5×10^6	1×10^7

5	Tripsina 10 µg/ml 37°C durante 2 horas en PBS	1x10 ⁵	1x10 ⁶
6	Tripsina 30 µg/ml 37°C durante 2 horas en PBS	3x10 ⁵	3x10 ⁶
7	Tripsina 100 µg/ml 37°C durante 2 horas en PBS	1x10 ⁶	1x10 ⁸
8	Temperatura ambiente durante 2 horas en PBS	1x10 ⁸	1x10 ⁸
9	Temperatura ambiente durante 2 horas en PBS	1x10 ⁸	1x10 ⁸
10	pH3,2 a 37°C durante 30 minutos	4x10 ⁷	1x10 ⁷
11	pH3,2 a 37°C durante 1 hora	5x10 ⁷	8x10 ⁶
12	pH3,2 a 37°C durante 2 horas	5x10 ⁶	1x10 ⁶
13	pH3,2 en hielo durante 1 min	1x10 ⁸	7x10 ⁷

En base a los niveles de recuperación, los resultados de las selecciones 3, 4, 5 y 12 para ambas bibliotecas (y selección 6 para la biblioteca A) se pasaron a una segunda ronda de selección. Los resultados de fagos se amplificaron mediante una ronda de infección de *E. coli* y se purificaron después y concentraron hasta 2x10¹⁴ Tu/ml.

5 Selección de la biblioteca de expresión en fagos Ronda 2.

Los resultados de la primera ronda de selecciones de la sbibliotecas A y B se diluyeron hasta 5x10¹¹ de Tu/ml en PBS a y se usaron alícuotas de 100 µl de cada una para la segunda ronda de selección. Aunque se usó el mismo protocolo, las condiciones de selección se modificaron como se resume en la Tabla 3.

10 Tabla 3: Entradas de selección en la ronda 2, condiciones y recuperación. Entrada se refiere a la referencia de la condición de selección usada en la ronda 1. Para la biblioteca A, los resultados de selección para las condiciones 5 y 6 en la ronda 1 se combinaron y la combinación se usó cuando se indica con un "**". Las condiciones de selección incluyeron controles negativos para la unión de fondo en ausencia de ligando. La entrada para todas las selecciones fue 5x10¹⁰ de fago Tu.

	Entrada procedente de la selección en la ronda 1	Condiciones de selección	Tu recuperado de la biblioteca A	Tu recuperado de la biblioteca B
1	3	Incubar a 65°C durante 2 horas	3x10 ⁸	1x10 ⁸
2	3	Temperatura ambiente, recuperación con ligando	1,5x10 ¹⁰	3,5x10 ¹⁰
3	3	Temperatura ambiente, recuperación sin ligando	0	0
4	4	Incubación a 80°C durante 10 minutos	1,5x10 ¹⁰	3,5x10 ⁹
5	4	Temperatura ambiente, recuperación con ligando	1,5x10 ¹⁰	2,5x10 ¹⁰
6	4	Temperatura ambiente, recuperación sin ligando	0	0
7	5	Tripsina 10 µg/ml 37°C durante 2 horas en PBS	* 3x10 ⁹	3x10 ⁹
8	5	Tripsina 30 µg/ml 37°C durante 2 horas en PBS	* 1,5x10 ⁹	2x10 ⁹
9	5	Tripsina 100 µg/ml 37°C durante 2 horas en PBS	* 1,5x10 ⁹	2x10 ⁹
10	5	Temperatura ambiente, recuperación con ligando	* 4x10 ¹⁰	5x10 ¹⁰
11	5	Temperatura ambiente, recuperación sin ligando	* 0	0
12	12	pH3,2 a 37°C durante 4 horas	1,5x10 ⁹	1x10 ⁹

13	12	pH3,2 a 37°C durante la noche	1×10^7	5×10^6
14	12	Temperatura ambiente, recuperación con ligando	5×10^{10}	$2,5 \times 10^{10}$
15	12	Temperatura ambiente, recuperación sin ligando	5×10^4	0

Los resultados de fagos se purificaron y concentraron hasta 1×10^{13} Tu/ml. Los resultados de las selecciones 1, 4, 9 y 12 para ambas bibliotecas se pasaron a la siguiente ronda de selección. Los resultados de fagos se amplificaron mediante una ronda de infección de *E. coli* y se purificaron después y concentraron hasta 2×10^{14} Tu/ml.

5 Selección de la biblioteca de expresión en fagos Ronda 3.

Los resultados de la primera ronda de selecciones de las bibliotecas A y B se diluyeron hasta 5×10^{11} de Tu/ml en PBS a y se usaron alícuotas de 100 μ l de cada una para la tercera ronda de selección. Aunque se usó el mismo protocolo, las condiciones de selección se modificaron como se resume en la Tabla 4.

10 Tabla 4: Entradas de selección en la ronda 3, condiciones y recuperación. Entradas se refiere a la referencia de la condición de selección usada en la ronda 2. Las condiciones de selección incluyeron controles negativos para la unión de fondo en ausencia de ligando. La entrada para todas las selecciones fue 5×10^{10} de fago Tu, las recuperaciones se produjeron en un volumen de 0,5 ml y los resultados se expresaron en Tu/ml.

	Entrada procedente de la selección en la ronda 2	Condiciones de selección	Tu recuperado de la biblioteca A	Tu recuperado de la biblioteca B
1	1	Incubar a 60°C durante 6 horas	0	100
2	1	Incubar a 60°C durante 18 horas	30	100
3	1	Temperatura ambiente, recuperación con ligando	1×10^{11}	5×10^{10}
4	1	Temperatura ambiente, recuperación sin ligando	0	0
5	4	Incubación a 80°C durante 20 minutos	8	20
6	4	Temperatura ambiente, recuperación con ligando	1×10^{10}	3×10^{10}
7	4	Temperatura ambiente, recuperación sin ligando	0	4×10^3
8	9	Tripsina 100 μ g/ml 37°C durante 6 horas en PBS	1×10^9	3×10^8
9	9	Tripsina 100 μ g/ml 37°C durante 18 horas en PBS	2×10^7	3×10^3
10	9	Temperatura ambiente, recuperación con ligando	5×10^{10}	3×10^{10}
11	9	Temperatura ambiente, recuperación sin ligando	0	1000
12	12	pH3,2 a 37°C durante 6 horas	3×10^9	3×10^9
13	12	pH3,2 a 37°C durante 18 horas	5000	3×10^3
14	12	Temperatura ambiente, recuperación con ligando	1×10^{11}	5×10^{10}
15	12	Temperatura ambiente, recuperación sin ligando	2×10^3	$1,0 \times 10^3$

15 Los resultados de fagos de la ronda 2 y la ronda 3 se amplificaron y se purificaron después y concentraron hasta 1×10^{13} Tu/ml. Cultivos bacterianos (100 ml), infectados con el fago de los resultados de selección, se cultivaron y se usaron para recuperar ADN bicatenario de fago usando columnas de purificación Qiagen Midi DNA (Qiagen).

20 Los insertos de dAb de las selecciones 1 y 4 de la ronda 2 de las bibliotecas A y B, así como de las selecciones 2, 5, 9, 12, 13 de la ronda 3 de la biblioteca A y las selecciones 1, 2, 5, 8, 9, 12 y 13 de la biblioteca B se amplificaron mediante PCR respecto a las alícuotas para preparación de fagos usando la Taq polimerasa con los cebadores CE2 y CE3. Los productos de amplificación se purificaron en gel y se cortaron con las enzimas de restricción Sal I and Not I antes de clonarse en el vector pDOM13 para su secuenciación y expresión.

Análisis de los resultados de selección:

El análisis de las combinaciones de las secuencias de ADN de las variantes de DOM1h-574 seleccionadas tras la ronda 3 de la biblioteca B usando las selecciones en fagos mencionadas en lo que antecede reveló que diferentes presiones de selección habían enriquecido de forma preferencial diferentes grupos de mutaciones, como se resume en la tabla 5. Ciertas mutaciones observadas también están presentes en los dAb usados como punto de partida para las selecciones, es decir 30V y 62A están presentes en DOM1h-574-180, 30V está presente en DOM1h-574-109 y 100A está presente en DOM1h-574-138.

Tabla 5: Resumen que indica las posiciones y los cambios más frecuentes para cada condición de selección. El número de '+' es indicativo de la frecuencia relativa de dicho resto de aminoácido. Numeración de acuerdo con Kabat.

	30D 30S	30V	37I	62A	94V	100E	100A
65°C	++ ++	++		+		++	++
80°C	++					++	
Tripsina			+++		+++		+++
pH	+++					++	+

Ejemplo 3 Caracterización de los dAb seleccionados

Usando la información del análisis de la secuencia de ADN se seleccionó un subgrupo de dAb anti-TNFR1, se resumió en la tabla 6, que combinó con diferentes mutaciones como se muestra en la figura 1. Para su caracterización posterior, estos dAb se expresaron en *E. coli*, se purificaron del sobrenadante usando unión discontinua a Protein-A Streamline e intercambio de tampón a PBS. Para facilitar el procedimiento de detección selectiva, las pruebas de estabilidad acelerada se modificaron ligeramente para el procedimiento descrito en lo que antecede.

Para las pruebas de estabilidad acelerada, las reacciones se llevaron a cabo en placa de PCR, se incubaron en ciclador térmico durante el periodo de tiempo deseado.

d) 100 µl del dAb 1 mg/ml en PBS se dispensan en los pocillos de una placa de PCR.

e) La proteína se incuba durante 40 horas a 40°C o 50°C.

f) Se extrae un alícuota de 50 µl y se mide la DO₃₂₀ en un lector de microplacas (Molecular Devices) y, tras la medición, se devolvió al vaso de reacción. Lecturas más elevadas indican formación de agregados. La determinación de la DO₃₂₀ se usa porque es la que mejor está adaptada para la determinación de precipitación y agregación, mientras que la DO₂₈₀ se usa mejor para la determinación de la concentración de proteína en la solución.

Los resultados de esta prueba se resumen en la tabla 6. Este análisis destaca los numerosos dAb con significativos incrementos de la estabilidad acelerada con respecto a DOM1h-574-156 cuando se mide a 40°C. Mientras que el clon de partida DOM1h-574-156 da una absorbancia de 1,07 a 320 nm tras 40 h a 40°C, lo que indica precipitación de una cantidad significativa de proteína, muchos de los sAb nuevos tienen lecturas bajas (<0,5), lo que indica que una gran porción de la proteína todavía está en solución. Los incrementos más pronunciados en la estabilidad acelerada a 40°C durante 40 h se observan para DOM1h-574-188, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206 y DOM1h-574-208.

Tabla 6: Nuevos dAb en los que se ha analizado la estabilidad acelerada. Para cada dAb se indica de qué biblioteca procede, así como las condiciones de selección usadas para identificar este dAb. Los dAb purificados (1 mg/ml) se analizó la estabilidad acelerada mediante incubación a 40°C o 50°C durante 40 h en una placa de PCR. Tras la incubación se determinó la DO₃₂₀ para cada dAb, estableciendo el nivel de precipitación en cada pocillo. Cuanto menos es el número, más estable es el dAb.

Clon	Biblioteca	Presión de selección:	DO ₃₂₀ , 40h 40°C	DO ₃₂₀ , 48h 50°C
PBS			0,15	0,15
DOM1h-574-156		Clon padre	1,08	2
DOM1h-574-188	B	65°C	0,37	

DOM1h-574-189	B	80°C	0,7	
DOM1h-574-190	B	tripsina	0,94	2
DOM1h-574-191	B	pH 3,2, 6h	0,37	1,6
DOM1h-574-192	B	pH 3,2, 18h	0,4	2
DOM1h-574-193	B	65°C, 18h	2,0	
DOM1h-574-194	B	65°C, 18h	1,3	
DOM1h-574-195	B	65°C	0,87	
DOM1h-574-196	B	pH 3,2	0,35	
DOM1h-574-201	A	80°C	0,31	1,9
DOM1h-574-202	A	80°C	0,57	
DOM1h-574-203	A	80°C	0,52	2,25
DOM1h-574-204	A	tripsina	0,25	
DOM1h-574-205	A	pH 3,2, 6h	0,24	1,6
DOM1h-574-206	A	pH 3,2, 6h	0,28	2,1
DOM1h-574-208	A	80°C	0,38	1,65
DOM1h-574-209	A	trypsin		1,98
DOM1h-574-211	A	pH 3,2, 18h		2
DOM1h-574-212	A	pH 3,2, 6h		2,1
DOM1h-574-213	A	pH 3,2, 18h		1,5
DOM1h-574-214	A	pH 3,2, 18h		0,4

DOM1h-574-207 se analizó en un tampón de Tris-glicina y fue más estable que DOM1h-574-156.

Ejemplo 4 Los dAb anti-TNFR1 estables son funcionalmente activos

- 5 Para confirmar el incremento de la estabilidad acelerada también se caracterizaron cuatro dAb nuevos con el protocolo más extenso descrito en el ejemplo 1. En este protocolo, los dAb se incuban hasta 48 h a 40°C, se centrifugan y los dAb restantes en solución se cuantifican usando DO280. Los dAb analizados fueron DOM1h-574-188, DOM1h-574-196, DOM1h-574-208 and DOM1h-574-214 y los resultados se resumen en la tabla 7. Claramente, estos dAb son significativamente más estables en comparación con el dAb de partida DOM1h-574-156 (datos históricos), dado que no se observa pérdida de proteína durante las primeras 48 h a 40°C. Para verificar que el incremento de estabilidad no se produce a expensas de la actividad anti-TNFR1 funcional del dAb, la afinidad de unión al TNFR1 de los dAb se determinó mediante BIAcore, usando TNFR1 biotinilado capturado en un chip de BIAcore SA. Aunque la afinidad del TNFR1 de estos dAb nuevos es ligeramente menor que la descrita anteriormente para el dAb DOM1h-574-156 (150 pM), permanece dentro de 4 veces la del dAb parental. Por tanto, estos dAb combinan un incremento de la estabilidad acelerada sin comprometer mucho la afinidad del dAb por TNFR1.
- 10
- 15 Tabla 7: Estabilidad acelerada y afinidad por TNFR1 humano para nuevos dAb anti-TNFR1. El dAb purificado se incubó a 1 mg/ml en PBS a 40°C para las cantidades indicadas de tiempo. Después de este tiempo, se determinó el porcentaje de proteína residual mediante DO280. La afinidad por sTNFR1 se determinó mediante BIAcore usando sTNFR1 e inyectando el dAb como se ha descrito.

dAb	% en solución				BIAcore
	0,0 h	2h	24h	48h	Kd (nM)
DOM1h-574-188	100	98	102	101	0,35

DOM1h-574-196	100	102	98	100	0,47
DOM1h-574-208	100	98	103	100	0,27
DOM1h-574-214	100	99	100	99	0,58

Ejemplo 5: Construcción de fusiones genéticas de dAb anti-TNFR1 estables con AlbudAbs

Para extender la semivida en suero de los dAb anti-TNFR1 se fusionaron con el dAb de unión a albúmina DOM7h-11-3. Los cuatro dAb anti-TNFR1 estables escogidos fueron DOM1h-574-188, DOM1h-574-196, DOM1h-574-208 y DOM1h-574-214 y la fusión con DOM7h-11-3 usó como enlazador la secuencia Ala-Ser-Thr. La construcción de estas moléculas de fusión se realizó en dos etapas. En primer lugar, los dAb anti-TNFR1 se amplificaron mediante PCR usando los cebadores AS9 y OA154, el producto de la reacción purificado se digirió después con Sall/NheI, se purificó en gel y se ligó en el vector pDOM13 digerido con Sall/NheI que contenía el enlazador y DOM7h-11-3. Después de la ligadura, el ADN se transformó en células XL10-Gold (Stratagene) y se escogieron colonias para el análisis de la secuencia. Después de confirmar la secuencia de este construcción, se realizó la segunda etapa de la construcción amplificando el casete anti-TNFR1/anti-Albúmina usando los oligonucleótidos JAL102 y AS65. Los productos de la reacción se digirieron con las enzimas de restricción Nde I/Not I y se pasaron en un gel de agarosa y se purificaron mediante extracción en gel. El fragmento de ADN purificado que contenía el producto de fusión se clonó después en el vector pET30a cortado con Nde I/Not I (Merck). La clonación en este vector se efectuó para permitir la expresión de la proteína usando inducción con IPTG en un fermentador y tendrá como resultado el procesamiento del dAb sin ningún resto de aminoácido principal. Esto contrasta con el vector pDOM13, que añadirá Ser-Thr en el extremo N de todos los dAb expresados en este vector. Las siguientes fusiones dAb anti-TNFR1 /DOM7h-11-3 se construyeron en pET30a:

Nombre del clon	dAb anti-TNFR1	enlazador	dAb anti-albúmina
DMS5535	DOM1h-574-196	Ala-Ser-Thr	DOM7h-11-3
DMS5541	DOM1h-574-208	Ala-Ser-Thr	DOM7h-11-3
DMS5542	DOM1h-574-214	Ala-Ser-Thr	DOM7h-11-3
DMS5544	DOM1h-574-188	Ala-Ser-Thr	DOM7h-11-3

Para la expresión, los constructos se transformaron en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) con pECO-1pgl como se describe en Aon y col. 2008. Los cuatro construcciones se expresaron después en un fermentador usando crecimiento a 23°C tras la inducción y se indujo la expresión con IPTF 0,01 mM. Todas las fermentaciones se realizaron a una densidad celular alta en medio mínimo a la escala de 5L.

El extracto periplásmico se preparó del siguiente modo: Pasta celular congelada se descongeló y mezcló con 0,5M GuHCl, 200mM Tris pH8, 10mM de EDTA a 37°C durante la noche antes de centrifugar durante 1 hora a 4500 g y desechar el sedimento. La purificación del periplasma se realizó mediante unión discontinua a proteína A, seguida por la elución con 100mM Glicina pH2 y neutralización con 200 mM Tris pH8. La proteína eluida se intercambió con tampón a PBS Y se concentró antes de la caracterización funcional.

Ejemplo 6: Caracterización de las fusiones anti-TNFR1/anti-albúmina

La proteína purificada para DMS5535, DMS5541, DMS5542 y DMS5544 se caracterizó en una serie de pruebas para demostrar que estas moléculas son estables y tienen una buena actividad anti-TNFR1.

Caracterización de la estabilidad acelerada

Para evaluar las propiedades físicas de las moléculas, se analizó la estabilidad acelerada de las proteínas de fusión. Dado que cabe esperar que las moléculas sean significativamente más estables, las pruebas de la estabilidad acelerada se realizaron a 1 mg/ml en PBS durante 28 días a 40°C, en lugar de 2 días. Los resultados se resumen en la tabla 8. A partir de los resultados se puede concluir que todas las construcciones son muy estables sin pérdida de proteína, determinado por la DO280 tras 28 días. El ligero incremento de la proteína observado es más probable que se deba al error dentro de este procedimiento de detección y no es significativo.

Tabla 8: Resumen de la estabilidad acelerada y caracterización funcional de las fusiones genéticas anti-TNFR1/anti-albúmina. La estabilidad acelerada se cuantificó como el porcentaje de proteína-fusión en solución tras 28 días a 40°C determinado mediante la DO280. Las afinidades con BIAcore™ affinities (KD) se determinaron inyectando al

menos seis concentraciones diferentes de of anti-TNFR1/AlbudAb™ (un AlbudAb es un dAb anti-seroalbúmina). Este procedimiento se realizó en dos experimentos independientes y se realizó la media los valores de estos experimentos, egendrando la desviación estándar citada (SD). La potencia de las fusiones anti-TNFR1/Albudab se determinó en el ensayo con células HUVEC. Los valores medios de CE50 se calcularon a partir de un total de 7 experimentos para todas las fusiones anti-TNFR1/Albudab SE= error estándar de la media

Nombre del clon	% en solución tras 28 días a 40°C	KD (pM) ± SD	CE50 media (nM) ± SE
DMS5535	104	277 ± 62	5,79 ± 0,69
DMS5541	106	163 ± 74	3,58 ± 0,45
DMS5542	103	202 ± 30	6,23 ± 1,05
DMS5544	108	180 ± 24	4,83 ± 0,94

Caracterización funcional de proteína anti-TNFR1/anti-albúmina

Para garantizar que la actividad funcional anti-TNFR1 de la molécula no se ha alterado se analizaron las cuatro fusiones genéticas de anti-TNFR1/anti-albúmina en ensayos funcionales para determinar su afinidad por el TNFR1 y su potencia al inhibir la señalización inducida por TNF α .

Afinidad por TNFR1- BIAcore

La afinidad de las fusiones anti-TNFR1/AlbudAb por el TNFR1 humano se determinó mediante BIAcore. BREVEMENTE, las moléculas anti-TNFR1 se inyectaron sobre un chip BIAcore con estreptavidina sobre el que se había inmovilizado TNFR1 humano biotinilado. La asociación y disociación se determinaron a diferentes concentraciones del anti-TNFR1 inyectado. Los resultados de esta caracterización se resumen en la Tabla 8 e indican que las moléculas son aglutinantes de alta afinidad del TNFR1 humano (KD <280 pM). La afinidad por el TNFR1 humano determinada mediante BIAcore de la fusión anti-TNFR1/AlbudAb es ligeramente superior que la determinada para el dAb anti-TNFR1 sencillo usado en cada uno de los construcciones de combinación.

Potencia en el ensayo celular HUVEC

Un segundo ensayo funcional para determinar la actividad anti-TNFR1 de los dAb es el ensayo HUVEC. Brevemente, en este ensayo, las células HUVEC se pre-incuba durante 1 hora con el dAb, seguido por estimulación con 1 ng/ml de TNF α . Esta estimulación produce un incremento de la expresión de VCAM en la célula, que puede determinarse. El nivel de inhibición de la expresión de VCAM □ inducida por TNF□□ proporcionada por el dAb se determina representando la concentración de dAb frente a la expresión de VCAM. Los resultados se resumen en la tabla 8 y demuestran que las fusiones anti-TNFR1/AlbudAb tienen una potencia de un dígito nM en este ensayo HUVEC.

En conclusión, realizando selecciones de expresión de fagos de bibliotecas mutantes en condiciones de selección duras, hemos podido identificar nuevos dAb anti-TNFR1. Estos dAb combinan la alta afinidad por TNFR1, determinada mediante BIAcore, con incremento de la estabilidad acelerada. Además, las propiedades de unión se mantienen cuando estos dAb se fusionan con otra proteína o péptido, como se pone de ejemplo con DOM7h-11-3 AlbudAb, y la estabilidad se incrementa más. Estos dAb representan una mejora significativa y las nuevas propiedades de los dAb deberían mejorar la capacidad para desarrollar estos dAb como agentes terapéuticos.

Protocolo de BIAcore

Las afinidades de unión por la unión a TNFR1 humano recombinante se evaluaron mediante análisis BIAcore™. El análisis se llevó a cabo usando chips recubiertos con estreptavidina (SA) (BIAcore, nº de cat. BR-1000-32). Un chip de SA se reubrió a una densidad baja usando hTNFR1 biotinilado. Las moléculas analizadas se inyectaron sobre esta superficie a siete concentraciones, es decir a 32, 16 (dos veces), 8, 4, 2, 1 y 0,5 nM, en orden aleatorio usando un caudal de 50 μ l/min. Entre las inyecciones individuales, la superficie se regeneró de nuevo al valor basal usando 10mM glicina pH 2,0. Los datos se corrigieron según los artefactos del instrumento usando referencia doble. Los experimentos se llevaron a cabo en una máquina BIAcore™ 3000 y los datos se analizaron usando el software BIAevaluation, versión 4,1, las k_{on} y k_{off} se ajustaron de forma simultánea usando un modelo de unión de Langmuir 1:1. Para el fin de ajustar, el intervalo de concentración 1-32 nM se usó para los monómeros, mientras que para las moléculas de fusión AlbudAb se usó 0,5-16 nM. Los datos de unión se ajustaron bien al modelo 1:1 de todas las moléculas analizadas. Todos los valores de KD se calcularon a partir de las tasas k_{on} y k_{off} . Los ciclos de BIAcore™ se realizaron a 25°C.

Protocolo del ensayo con células HUVEC

Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) responden al tratamiento con TNF- α mediante regulación por aumento de la expresión de VCAM-1. Los dAb anti-TNFR-1 inhiben la acción de TNF- α , por tanto, se puede observar una reducción de la expresión de VCAM-1 por las células HUVE en presencia de dAb anti-TNFR1. Para evaluar esta inhibición, brevemente, células HUVEC normales combinadas ((Promocell # C-12203) se siembran en placas de microtitulación de 96 pocillos revestidas con gelatina (VWR # 734-0403) (4x10⁴ células/pocillo) en medio de crecimiento de células endoteliales (Promocell # C-22110). Las células se dejan adherir durante la noche (37°C/5%CO₂) antes de añadir un intervalo de dosis de dAb o sólo medio a las células y las placas se dejan a 37°C/5%CO₂ durante una hora. Una concentración fija de TNF- α (1ng/ml, Peprotech # 300-01A) se añade después a las células, que se incuban durante 23 horas más (37°C/5%CO₂). Como control negativo, las células se incuban con medio solo y para control positivo las células se incuban con TNF- α solo.

Tras la incubación, el sobrenadante del cultivo celular se aspira y las células se lavan tres veces en PBS helado. Las células se lisan mediante la adición de 75µl/pocillo de tampón de lisis glicerol-Tris helado (40mM Tris, 274mM NaCl, 2% Triton-X-100, 20% Glycerol, 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 1x comprimido de inhibidor de la proteasa por 10mls (Roche # 11-836-170-001)) y se incuban durante 15 min en hielo. Después, los lisados celulares se transfieren a un ELISA de tipo sándwich con VCAM-1.

Para el ELISA de tipo sándwich con VCAM-1, inmunoplasmas F96 Maxisorp Nunc # 439454) se revisten durante la noche a 4°C con mAb anti-VCAM-1 (R&D systems # MAB809, 2ug/ml), 100ul/pocillo en PBS. Al día siguiente, las placas se lavan y bloquean con 1% de BSA/PBS (200ul/pocillo) durante 1 hora antes de la adición de los lisados celulares de HUVE (50ul/pocillo). Las placas se incuban con los lisados durante 2 horas y se lavan de nuevo antes de la adición del Ab policlonal anti-VCAM1 biotinilado (R&D systems # BAF809) 0,4 0.4ug/ml en 0,1% BSA/PBS, 0.05% Tween-20, 100ul/pocillo e incubación durante otra hora. Las placas se lavan de nuevo antes de la adición de estreptavidina-HRP (diluida de acuerdo con las instrucciones del fabricante en 0,1% BSA/PBS, 0,05% Tween), 100ul/pocillo. La estreptavidina-HRP unida se visualiza mediante la adición de sustrato de TMB-1 peroxidasa Sureblue (KPL-# 52-00-00) y la reacción se detiene mediante la adición de HCl 1M. La absorbancia se lee inmediatamente en un lector de placas SpectraMax M5e (Molecular Devices) a 450 nm.

Los valores brutos de la DO se exportan a Microsoft Excel y los valores de fondo de DO (células incubadas solo con medio) se restan de todos los puntos de datos. Para calcular la inhibición de la regulación por incremento de VCAM-1 inducida por TNF- α por las células, se calcula el porcentaje de inhibición de la expresión máxima de VCAM-1 (como muestra el control positivo) a cada concentración de dAb usando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ inhibición de regulación por incremento máxima de VCAM-1} = 100 - (\text{valor de DO en una dilución concreta de dAb} / \text{valor de DO del control positivo}) * 100$$

Después, los valores de la concentración de dAb se representan frente al porcentaje de inhibición en GraphPad Prism y las curvas del efecto de la concentración y los valores de la potencia (CE₅₀) se determinan usando una curva de respuesta a la dosis sigmoide con una pendiente variable.

La concentración de TNF- α usada para estimular las células es de aproximadamente 70% (CE₇₀) de la respuesta máxima al TNF- α por las células.

Referencias:

Aon JC, Caimi RJ, Taylor AH, Lu Q, Oluboyede F, Dally J, Kessler MD, Kerrigan JJ, Lewis TS, Wysocki LA, Patel PS. Suppressing posttranslational gluconoylation of heterologous proteins by metabolic engineering of Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 2008 Feb;74(4):950-8. Epub 2007 Dec 14.

LISTADO DE SECUENCIAS

Todas las secuencias de nucleótidos se escriben de 5' a 3' y todas las secuencias de aminoácidos se escriben del extremo N al extremo C.

DOM1h-131-206 se divulga en el documento WO2008149148..

5 Oligonucleótidos usados:

AS9: CAGGAAACAGCTATGACCATG

AS339: TTCAGGCTGCGCAACTGTTG

AS639: CGCCAAGCTTGCATGCAAATTC

AS65: TTGTAAAACGACGGCCAGTG

10 CE2: CTAAACAGCTTGATACCG

CE3: GACAGCCCTCATAGTTAG

OA154: TTCTTTTGCTAGCGCTCGAGACGGTGACCAGGGTTC

JAL102:

15 GGAATTCCATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATG
GCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGG

Secuencias de nucleótidos:

>DOM1h-574-188

20 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTGATAAGTATTCAATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGGTA
TATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-189

25 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGGTA
TATACTGGGCGTTGGGAGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-190

30 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTTCGATGGGGTGGATCCGCCAGGCTCCAGGTAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGGTA
TATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

35 >DOM1h-574-191

40 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACATTTTCAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
CACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
ATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-192

45 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
CACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
ATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGAACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-193

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTCCGTCTCTCCTGTGCAGCCT

CCGGATTACACCTTTGATAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCAACTCCCGCGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATA
TATACTGGGCGTTGGGAGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

5 >DOM1h-574-194

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACACCTTTTGAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
CACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
10 ATATACTGGGCGTTGGGTGCCATTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-195

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
15 ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATA
TATACTGGGCGCTGGGAGCCTTTTGAGTACTGGGGACAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-196

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
CACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
20 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
ATATACTGGGCGTTGGGAGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-201

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACACCTTTTGATAAGAATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
CACAGATATCGGATACAGCTGATCGTACATACTACGCACACTCACTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
25 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
ATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-202

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTATC
ACAGATATCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
30 ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGGTA
TATACGGGTCGGTGGGCGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-203

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACG
35 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGCGCGATA
TATACGGGTCGGTGGGCGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-204

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
40 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATA
TATACGGGTCAGTGGGCGCCTTATGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTTCGAGCG

>DOM1h-574-205

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTGATAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGATCTAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTTCGGATACTGCTGACCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
50 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATAT
ATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGAACTGGGGTCACGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-206

GAGGTGCAGTTGTTGGATTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCT
CCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACTCACCCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
ATTCCGGGAACACGCTGAATCTGCAAATGACCCCCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATA
5 TATACTGGGCGTTGGGAGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-207

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCATGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCATCC
TCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTCCGATACTGCTGATCTTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
10 ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGAATATTACTGTGCGATA
TATACGGGTCGGTGGGCGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCaCCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-208 (SEC ID N° 25)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTGATAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT
15 CACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
ATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-209

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
20 ACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGTCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATA
TATACGGGTCAGTGGGCGCCTTATGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-211

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTGCTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT
25 CACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
ATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-212

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT
CACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
30 AATTCCAAGAACACACTGTACCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
ATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-213

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTCCGTCTCTCCTGTGCAGCCT
CCGGATTACCTTTTGATAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
40 ACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTAAGGGCCGGTTCACCATCACCCGCGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATA
TATACTGGGCGTTGGGAGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-214

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT
45 CACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
ATACACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DMS5535

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT
50 CACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
ATATACTGGGCGTTGGGAGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACC
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGG

AAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTTT
GGAATTCCTGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCG
CCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

5 >DMS5541 (SEC ID N° 32)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTGATAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT
CACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
10 ATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGTAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACC
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGC
AAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTGT
GGAATTCCTGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCG
15 CCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>DMS5542

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCCGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTCCAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT
CACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
20 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
ATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGTAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACC
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGC
AAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTTT
GGAATTCCTGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
25 ATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCG
CCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>DMS5544

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
30 TCCGGATTACCTTTTGAAGTATTCAATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATA
TATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGTAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACC
ACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCA
35 AGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTTTG
GAATTCCTGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCGG
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>DOM1h-574-72

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
40 TCCGGATTACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT
CACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
ATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGTAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

45 >DOM1h-574-109

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT
CACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
50 ATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGTAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-133

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCT
CACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
55 ATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGTCTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-138

5 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATA
TATACGGGTCGGTGGGCGCCTTTTGAAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-156

10 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATA
TATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

15

>DOM1h-574-180

20 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTGAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
CACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAT
ATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-162

25 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCC
TCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTC
ACAGATTTTCGGATACTGCTGATCGTACATACTACTCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATA
TATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

DOM7h-11-3 (SEC ID Nº 42)

30 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC G
GGCAAGTCG TCCGATTGGG ACGACGTTAA GTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GA
TCCTTTGG AATTCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCA
CTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTAATA CTGTGCGCAG GCTGGGACGC ATCCTA
CGAC GTTCGGCCAA GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

35

Secuenciasde aminoácidos:

>DOM1h-574-188

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFYWGQGLTVTVSS

40 >DOM1h-574-189

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVYTGRWEPFYYWGQGLTVTVSS

>DOM1h-574-190

45 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVYTGRWAPFYYWGQGLTVTVSS

>DOM1h-574-191

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFYWGQGLTVTVSS

>DOM1h-574-192

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFENWGQGLTVTVSS

>DOM1h-574-193

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTNSRDNS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWEPFEYWGQGLTVTVSS

>DOM1h-574-194

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHAVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFYWGQGLTVTVSS

10 >DOM1h-574-195

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWEPFEYWGQGLTVTVSS

>DOM1h-574-196

15 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWEPFEYWGQGLTVTVSS

>DOM1h-574-201

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKNSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFYWGQGLTVTVSS

>DOM1h-574-202

20 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVYTGWRWAPFEYWGQGLTVTVSS

>DOM1h-574-203

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWAPFEYWGQGLTVTVSS

25 >DOM1h-574-204

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAIYTGQWAPYEWGQGLTVTVRA

>DOM1h-574-205

30 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKDLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFENWGHGTLTVTVSS

>DOM1h-574-206

EVQLLDGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYSPSVKGRFTISRDNNG
NTLNLQMTPLRAEDTAVYYCAIYTGWRWEPFEYWGQGLTVTVSS

>DOM1h-574-207

35 EVQLLESGGGMVQPGGSLRLSCASSGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADLTYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAEYYCAIYTGWRWAPFEYWGQGLTVTVSS

>DOM1h-574-208 (SEC ID N° 59)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHAVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFYWGQGLTVTVSS

40 >DOM1h-574-209

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAIYTGQWAPYEWGQGLTVTVSS

>DOM1h-574-211

45 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHAVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFYWGQGLTVTVSS

>DOM1h-574-212

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGTLLTVSS

>DOM1h-574-213

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTITRDNSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFEYWGQGTLLTVSS

>DOM1h-574-214

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYADSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGTLLTVSS

10 >DMS5535

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFEYWGQGTLLTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTT
LSWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS5541 (SEC ID N° 66)

15 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHAVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGTLLTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTT
LSWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS5542

20 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYADSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGTLLTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTT
LSWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS5544

25 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGTLLTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTT
LSWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DOM1h-574-72

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGTLLTVSS

30 >DOM1h-574-109

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGTLLTVSS

>DOM1h-574-133

35 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYDHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGTLLTVSS

>DOM1h-574-138

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGTLLTVSS

>DOM1h-574-156

40 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGTLLTVSS

>DOM1h-574-180

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHAVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGTLLTVSS

45 >DOM1h-574-162

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYSHSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRVWPFYWGQGLTVTVSS

DOM7h-11-3 (SEC ID N° 76)

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPITGLSWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Glaxo Group Limited Inusha DE SILVA Armin SEPP Adriaan Allart STOOP

<120> ANTAGONISTAS ANTI-TNFR1 ESTABLES

<130> AGS/DB63980 WO

10 <150> 61/255235

<151> 2009-10-27

<160> 76

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1

15 <211> 21

<212> ADNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

20 <400> 1

caggaaacag ctatgaccat g 21

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

<400> 2

ttcaggctgc gcaactgttg 20

30 <210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Cebador para PCR

<400> 3

cgccaagctt gcatgcaaat tc 22

<210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 4
 ttgtaaaacg acggccagtg 20
 <210> 5
 10 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 15 <400> 5
 cttaaacagc ttgataccg 19
 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para PCR
 <400> 6
 gacagccctc atagttag 18
 25 <210> 7
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador para PCR
 <400> 7
 ttcttttgct agcgctcgag acggtgacca gggttc 36
 <210> 8
 <211> 102
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador para PCR

<400> 8

```
ggaattccat atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc 60
ccagccggcg atggccgagg tgcagctgtt ggagtctggg gg 102
```

<210> 9

5 <211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

10 <400> 9

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagtattcaa tgggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactgggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 10

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 10

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tgggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggttt attactgtgc ggtatataact 300
gggcgttggg agccttttga gtactgggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 11

20 <211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

25 <400> 11

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tgggggtggat ccgccaggct 120
ccaggtaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc ggtatatacg 300
ggtcgggtggg cgccttttga gtactgggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 12

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 12

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacatthttcc aagtattcga tgggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagt ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaaggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgcctthtga gtactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 13

<211> 357

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 13

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctthttcc aagtattcga tgggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagt ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaaggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgcctthtga gaactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

15

<210> 14

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 14

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctccgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctthtgat aagtattcga tgggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtccagagt ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaaggccg gttcaccaac tcccgcgaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg agcctthtga gtactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 15

25 <211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 15

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgtt aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacacgcgg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcggttggg tgccatttga gtactggggg cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 16

<211> 357

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 16

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
cctgggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgcttggg agccttttga gtactgggga cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

10

<210> 17

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 17

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcggttggg agccttttga gtactggggg cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 18

20

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

25

<400> 18

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagaattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atatcggata cagctgatcg tacatactac 180
gcacactcac tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcggttggg tgccatttga gtactggggg cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 19

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 19

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccgatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtatcacag atatcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc ggtatatacg 300
ggtcgggtggg cgccttttga gtactgggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 20

10 <211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

15 <400> 20

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccgatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgacg attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg cgccgaggac accgcggtat attactgcgc gatataatcg 300
ggtcgggtggg cgccttttga gtactgggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 21

<211> 357

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 21

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccgatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataatcg 300
```

25 ggtcagtggt cgccttatga gtactgggggt caggaaccc tggtcaccgt tcgagcg 357

<210> 22

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 22

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagtattcga tgggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaaag atctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgaccg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagctctgc tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgccttttga gaactggggg cacggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

5 <210> 23

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 23

```
gaggtgcagt tgttggattc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tgggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaaag gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
tcaccctccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccgggaa cacgctgaat 240
ctgcaaatac ccccccctgc tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg agccttttga gtactggggg cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 24

<211> 357

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 24

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc atggtacagc cgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcat cctccggatt cacctttttc aagtattcga tgggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaaag gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatct tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggac accgcggaat attactgtgc gatataact 300
ggtcggtggg cgccttttga gtactggggg cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

20

<210> 25

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 25

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacacgcgg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatac acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggg caggaaccc ttggtaccgt ctcgagc 357

```

<210> 26

<211> 357

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 26

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
ggtcagtggg cgccttatga gtactggggg caggaaccc ttggtaccgt ctcgagc 357

```

10

<210> 27

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 27

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacacgcgg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggg caggaaccc ttggtaccgt ctcgagc 357

```

<210> 28

20 <211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

25 <400> 28

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacactgtac 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggg caggaaccc ttggtaccgt ctcgagc 357

```

<210> 29

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 29

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctccgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg taaagggccg gttcaccatc acccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgctgaggac acccgggat attactgtgc gatatact 300
gggcgttggg agccttttga gtactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 30

10 <211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

15 <400> 30

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagggc ttggtacagc ccgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggac acccgggat attactgtgc gatatact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 31

<211> 690

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 31

```
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgctgaggac acccgggat attactgtgc gatatact 300
gggcgttggg agccttttga gtactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcgt 360
agcaccgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagaccgt 420
gtcaccatca cttgccgggc aagtcgtccg attgggacga cgttaagttg gtaccagcag 480
aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc ctttgggaatt cccgtttgca aagtggggtc 540
ccatcacgtt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagctcg 600
caacctgaag attttgctac gtactactgt gcgcaggctg ggacgcaccc tacgacgttc 660
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgg 690
```

25 <210> 32

<211> 690

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

5 <400> 32

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccgatt cacctttgat aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagt ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacacgcgg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatactac 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcgct 360
agcaccgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagaccgt 420
gtcaccatca cttgccgggc aagtcgtccg attgggacga cgttaagttg gtaccagcag 480
aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc ctgtggaatt cccgtttgca aagtgggggc 540
ccatcacgtt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagctcg 600
caacctgaag attttgctac gtactactgt gcgcaggctg ggacgcatcc tacgacgttc 660
ggccaaggga ccaagtgga aatcaaacgg

```

<210> 33

<211> 690

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 33

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ccgggggggc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccgatt caccttttcc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagt ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gatatactac 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcgct 360
agcaccgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagaccgt 420
gtcaccatca cttgccgggc aagtcgtccg attgggacga cgttaagttg gtaccagcag 480
aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc ctttggaatt cccgtttgca aagtgggggc 540
ccatcacgtt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagctcg 600
caacctgaag attttgctac gtactactgt gcgcaggctg ggacgcatcc tacgacgttc 660
ggccaaggga ccaagtgga aatcaaacgg

```

15 <210> 34

<211> 690

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 34

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagtattcaa tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcgct 360
agcaccgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagaccgt 420
gtcaccatca cttgccgggc aagtcgtccg attgggacga cgtaaagttg gtaccagcag 480
aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc ctttgggaatt cccgtttgca aagtggggtc 540
ccatcacggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagtcgt 600
caacctgaag attttgctac gtactactgt gcgcaggctg ggacgcaccc tacgacgttc 660
ggccaaggga ccaagtgga aatcaaaccg 690

```

<210> 35

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 35

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgtt aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcgaata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

```

10 <210> 36

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 36

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgtt aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

```

<210> 37

<211> 357

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 37

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgtt aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gatcactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gatatactac 300
ggtcggttggg agccttttgt ctactggggg cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

```

<210> 38

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 38

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gatatactac 300
ggtcggttggg cgccttttga gtactggggg cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

```

10 <210> 39

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 39

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatactac 300
gggcggttggg tgccttttga gtactggggg cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

```

<210> 40

<211> 357

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 40

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgtt aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacacgcgg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatactac 300
gggcggttggg tgccttttga gtactggggg cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

```

25

<210> 41

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 41

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacccttttc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
tcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cagcgtgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357
```

<210> 42

<211> 324

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 42

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtcg tccgattggg acgacgttaa gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatccttttg aattcccgtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtgcgcag gctgggacgc atcctacgac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324
```

15

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 43

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Tyr
20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100     105     110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
```

<210> 44

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 44

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Phe	Lys	Tyr
			20					25					30		
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	His	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Val	Tyr	Thr	Gly	Arg	Trp	Glu	Pro	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> 45

10 <211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

15 <400> 45

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Phe	Lys	Tyr
			20					25					30		
Ser	Met	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	His	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Val	Tyr	Thr	Gly	Arg	Trp	Ala	Pro	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> 46

<211> 119

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 46

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
 20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
 50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

```

<210> 47

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

10 <400> 47

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
 20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
 50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Asn Trp Gly Gln Gly
 100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

```

<210> 48

<211> 119

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 48

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Tyr
 20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
 50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Asn Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Glu Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 49

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 49

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Val Lys Tyr
 20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ala Val
 50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

10 <210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 50

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Lys Tyr
 20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val

```

```

      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Glu Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 51

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 51

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
      20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Glu Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

```

10 <210> 52

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 52

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Asn
      20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Leu
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 53

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Lys Tyr
          20          25          30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
 50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Val Tyr Thr Gly Arg Trp Ala Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 54

10 <211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

15 <400> 54

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Lys Tyr
          20          25          30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
 50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Ala Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 55

<211> 119

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 55

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Lys Tyr
 20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
 50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Gln Trp Ala Pro Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Arg Ala
 115

```

<210> 56

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

10 <400> 56

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Tyr
 20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
 50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Asn Trp Gly His Gly
 100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

```

<210> 57

<211> 119

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 57

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Phe	Lys	Tyr
		20						25					30		
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Val
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Leu	Asn
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Thr	Pro	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90						95	
Ala	Ile	Tyr	Thr	Gly	Arg	Trp	Glu	Pro	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100				105						110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> 58

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 58

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Met	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ser	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Lys	Tyr
		20						25					30		
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Ala	His	Ser	Val
		50				55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys
			85					90						95	
Ala	Ile	Tyr	Thr	Gly	Arg	Trp	Ala	Pro	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100				105						110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

10

<210> 59

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 59

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Lys	Tyr
			20					25					30		
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	His	Ala	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Ile	Tyr	Thr	Gly	Arg	Trp	Val	Pro	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> 60

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 60

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Phe	Lys	Tyr
			20					25					30		
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	His	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Val	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Ile	Tyr	Thr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Tyr	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

10 <210> 61

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 61

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ala	Lys	Tyr
			20					25					30		
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	His	Ala	Val
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Ile	Tyr	Thr	Gly	Arg	Trp	Val	Pro	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> 62

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 62

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Lys	Tyr
			20					25					30		
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	His	Ser	Val
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Ile	Tyr	Thr	Gly	Arg	Trp	Val	Pro	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

10 <210> 63

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 63

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Lys	Tyr
			20					25					30		
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	His	Ser	Val
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Ile	Tyr	Thr	Gly	Arg	Trp	Glu	Pro	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> 64

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 64

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Lys	Tyr
			20					25					30		
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Ile	Tyr	Thr	Gly	Arg	Trp	Val	Pro	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

10

<210> 65

<211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 65

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Glu Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln
 115 120 125
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 130 135 140
 Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Gly Thr Thr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln
 145 150 155 160
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Leu Trp Asn Ser Arg Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 180 185 190
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 195 200 205
 Tyr Cys Ala Gln Ala Gly Thr His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 210 215 220
 Lys Val Glu Ile Lys Arg
 225 230

<210> 66

<211> 230

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 66

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Tyr
 20 25 30
 Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ala Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln
 115 120 125
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 130 135 140
 Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Gly Thr Thr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln
 145 150 155 160
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Leu Trp Asn Ser Arg Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 180 185 190
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 195 200 205
 Tyr Cys Ala Gln Ala Gly Thr His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 210 215 220
 Lys Val Glu Ile Lys Arg
 225 230

10

<210> 67

<211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 67

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
 20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln
115      120      125
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
130      135      140
Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Gly Thr Thr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln
145      150      155      160
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Leu Trp Asn Ser Arg Leu
165      170      175
Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
180      185      190

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
195      200      205
Tyr Cys Ala Gln Ala Gly Thr His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
210      215      220
Lys Val Glu Ile Lys Arg
225      230

```

<210> 68

10 <211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

15 <400> 68

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Tyr
      20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln
      115      120      125
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
      130      135      140
Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Gly Thr Thr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln
      145      150      155      160
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Leu Trp Asn Ser Arg Leu
      165      170      175
Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
      180      185      190
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
      195      200      205
Tyr Cys Ala Gln Ala Gly Thr His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
      210      215      220
Lys Val Glu Ile Lys Arg
      225      230

```

<210> 69

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 69

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Val Lys Tyr
      20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asn Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

```

10

<210> 70

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 70

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Val Lys Tyr
 20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
 50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 71

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

10 <400> 71

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Val Lys Tyr
 20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Asp His Ser Val
 50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Glu Pro Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
          Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 72

<211> 119

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 72

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Lys Tyr
      20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Ala Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 73

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 73

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Lys Tyr
      20      25      30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

```

10 <210> 74

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 74

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Val	Lys	Tyr
			20					25					30		
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	His	Ala	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Ile	Tyr	Thr	Gly	Arg	Trp	Val	Pro	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> 75

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 75

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Phe	Lys	Tyr
			20					25					30		
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ser	His	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Ile	Tyr	Thr	Gly	Arg	Trp	Val	Pro	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

10 <210> 76

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Derivado de una secuencia de la línea germinal humana

<400> 76

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Arg	Pro	Ile	Gly	Thr	Thr
			20					25					30		
Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile

ES 2 552 177 T3

35					40					45					
Leu	Trp	Asn	Ser	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
50					55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	His	Pro	Thr
85					90					95					
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg				
100					105										

REIVINDICACIONES

1. Un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNF α de tipo 1 (TNFR1; p55) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 59.

2. Un ligando multiespecífico que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de la reivindicación 1.

3. Un ligando multiespecífico que comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina de la reivindicación 1 y al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se une específicamente a seroalbúmina (SA).

4. Un ligando multiespecífico de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que el ligando comprende (i) un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNF α de tipo 1 (TNFR1; p55) de acuerdo con la reivindicación 1, (ii) al menos un dominio variable sencillo de inmunoglobulina anti-seroalbúmina (SA) que específicamente se une a la SA, en el que el dominio variable sencillo anti-SA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos, un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica o 100% idéntica a la secuencia de SEC ID N° 76 y (iii) opcionalmente, en el que se proporciona un enlazador entre el dominio variable sencillo anti-TNFR1 y el dominio variable sencillo anti-SA.

5. El ligando de la reivindicación 4, en el que el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos AST, (opcionalmente ASTSGPS), o en el que el enlazador es AS(G₄S)_n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, por ejemplo AS(G₄S)₃.

6. Un ligando multiespecífico que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 66.

7. Un ligando multiespecífico que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 66.

8. Un antagonista del receptor de tipo 1 de TNF α (TNFR1; p55) que comprende un dominio variable sencillo o ligando multiespecífico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

9. Un antagonista del receptor de tipo 1 de TNF α (TNFR1; p55) que comprende un dominio variable sencillo o ligando multiespecífico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en terapia.

10. El antagonista de TNFR1 para su uso en terapia de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el antagonista se administra por vía oral, se administra en el tracto GI de un paciente, se administra por vía pulmonar, se en los pulmones de un paciente o se administra por vía sistémica.

11. El antagonista de TNFR1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 en el tratamiento y/o profilaxis de una afección inflamatoria.

12. El antagonista de TNFR1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 en el tratamiento de artritis, artritis reumatoide o artritis reumatoide juvenil.

13. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 % y 100% idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 32, en el que la secuencia codifica un ligando multiespecífico de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7.

14. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor de tipo 1 anti-TNF α (TNFR1; p55) de acuerdo con la reivindicación 1.

15. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNF α de tipo 1 (TNFR1; p55) de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos es, al menos, un 90, 95, 96, 97, 98 o 99% o 100% idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 25.

16. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 14 o 15 que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable sencillo de inmunoglobulina del receptor anti-TNF α de tipo 1 (TNFR1; p55) de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos es la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 25.

17. Un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13, 14, 15 o 16.

18. Una célula huésped (opcionalmente una célula embrionaria no humana) que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 17.

19. Una composición farmacéutica que comprende a) un antagonista del receptor de TNFTNF α de tipo 1 (TNFR1; p55) como se define en la reivindicación 8 y b) uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Resto de Kabat	E	V	Q	L	L	5	E	S	G	G	10	L	V	Q	P	G	15	G	S	L	R	20
DOM1h-574-156	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-188	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-189	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-190	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-191	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-192	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-193	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-194	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-195	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-196	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-201	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-202	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-203	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-204	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-205	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-206	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-207	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-208	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-209	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-211	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-212	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-213	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-214	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

FIGURA 1A

Resto de Kabat	S	C	A	A	S	G	F	T	F	30	K	Y	S	M	G	35	W	V	R	Q	40	A
DOM1h-574-156	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-188	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-189	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.
DOM1h-574-190	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-191	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-192	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-193	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-194	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-195	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-196	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-196	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-201	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-202	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-202	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-203	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-204	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-204	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-205	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-205	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-206	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-206	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-207	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-207	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-208	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-208	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-209	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-211	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-211	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-212	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-212	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-213	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-213	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOM1h-574-214	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

FIGURA 1B

[illegible]

FIGURA 1C

Resto de Kabat	A	H	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y
DOM1h-574-156	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-188	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-189	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-192	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-193	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-194	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-196	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-205	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	N
DOM1h-574-207	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-213	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-214	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIGURA 1D

Resto de Kabat	L	Q	M	N	82b	S	L	R	A	E	86	D	T	A	V	Y	91	C	A	I	Y	96	T
DOMlh-574-156	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-188	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-189	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-190	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-191	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-192	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-193	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-194	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-195	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-196	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-201	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-202	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-203	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-204	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-205	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-206	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-207	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-208	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-209	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-211	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-212	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-213	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DOMlh-574-214	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

FIGURA 1E

Resto de Kabat	G	R	W	V	E	F	P	100a	E	Y	W	G	104	Q	G	T	L	V	109	T	V	S	S
DOM1h-574-156	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-188	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-189	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-192	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-193	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-194	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-196	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-205	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-207	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-213	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOM1h-574-214	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIGURA 1F