Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 07-32752

54. TITULO "COMPOSICIONES MONOVALENTES PARA EL ENLACE DE CD40L Y METODOS DE USO"

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL C07K 16/28

71. SOLICITANTE DOMANTIS LIMITED

DOMICILIO CAMBRIDGE, INGLATERRA

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

72. BOGOTA, D.C. 30 MAR 2007

FW
Poder, Cesión, Actuación etc Cap I & II

(FORMA P 10)

Completado el folio 12-07-2007

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-032752- -00000-0000
Fec 2007-05-30 16:52:20 Dep 2020 NUEVAS SOLICITUDES
Tra 11 PATENTES II
Eve 379 FASE NACIONAL II
Act 411 PRESENTACION Folios 388

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

① SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I ☒ Capítulo II.

② SOLICITANTE (71)	Nombre **DOMANTIS LIMITED** Dirección: 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG, Inglaterra. Nacionalidad o Domicilio. Cambridge, Inglaterra. Lugar de Constitución Teléfono 3264270 Fax· 6069701 E-mail jllcco@lloredacamacho com	**IDENTIFICACION** C.C ☐ NIT ☐ C E ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
③ REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre **ALICIA LLOREDA RICAURTE** Dirección Calle 72 No 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia Teléfono 3264270 Fax· 6069701 E-mail. jllcco@lloredacamacho.com	C.C ☒ NIT ☐ C.E ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 39 690 713 TP 53 215
④ INVENTOR(ES) (72)	Nombre GRANT Steven; LIU Haiqun, MOULDER Kevin. Dirección 315 Cambridge Science Park, Cambridge, Cambridgeshire CB4 0WG, Inglaterra Nacionalidad o Domicilio: Inglaterra	

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No PCT/GB2005/003562 Fecha 16/09/05

Publicación Internacional No WO 2006/030220 A1 Fecha 23/03/06

⑥ Título (54) **"COMPOSICIONES MONOVALENTES PARA EL ENLACE DE CD40L Y METODOS DE USO"**

⑦ Clasificación Internacional (51) C07K 16/28

⑧ Prioridad SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	17/09/04	60/610,819
US	08/04/05	11/102,512

⑨ Comprobante de Pago No. 07 – 21 321 **Fecha:** 13/03/07

(10) ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Documento de Representación Legal
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones
- [ ] Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos, listado de secuencias)
- [ ] Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad
- [ ] Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] Arte Final 12X12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- [x] Otros: Reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción, opinión escrita con su traducción, capítulo reivindicatorio originalmente presentado en fase internacional con su traducción y anexo explicativo de modificaciones a las reivindicaciones.

(11) FIGURA CARACTERISTICA:

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA

C.C. 39 690 713 T.P 53 215

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-032752- -00000-0000
Fec 2007-03-30 10:52:20 Usu ZUZUNUECHEACUNES
Ire 11 PATENTES11
Eve 474 PAGENACIONAL11
Act 411 PRESENTACION Folios 389

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176009-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 21,321
FECHA : MARZO 13 DE 2007

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55730182	13/03/2007	5,070.000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL : $	482.000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud

(22) Fecha de solicitud 30-03-07

(30) Prioridad

(31) *No. Prioridad*	32) *Fecha*	(33) *País*
60/610,819	17-09-04	US
11/102,512	08-04-05	US

(51) Int Cl C07K 16/28

(71) Solicitante(s) **DOMANTIS LIMITED**

(72) Inventor(es) GRANT Steven, LIU Haiqun, MOULDER Kevin

(74) Apoderado **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(85) Fecha límite inicio fase nacional 17-04-07

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 16-09-05
No de solicitud ***PCT/GB2005/003562***

(87) Publicación internacional
Fecha 23-03-06
N° publicación ***WO 2006/030220 A1***

(54) Título **COMPOSICIONES MONOVALENTES PARA EL ENLACE DE CD40L Y METODOS DE USO**

Resumen - Reivindicación(es)

Reivindicación número 1.-

Uso de un polipéptido de anticuerpo que comprende un polipéptido de dominio variable sencillo en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un síntoma de enfermedad autoinmune, en donde dicho polipéptido de dominio variable sencillo antagoniza la actividad de CD40 o CD40L o ambos

3

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

4

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente	**PARA FUTURAS ACCIONES** ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuacion	
DOMBA/P33817PC		
Solicitud internacional No PCT/GB2005/003562	Fecha de registro internacional *(día/mes/año)* 16/09/2005	Fecha de Prioridad (Primera) *(día/mes/año)* 17/09/2004
Solicitante DOMANTIS LIMITED		

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

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 8 hojas

☒ También esta acompañado de una copia de cada documento tecnico anterior citado en este reporte

1 **Bases del reporte**

a Respecto al **lenguaje**, la busqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presento, a menos que se indique de otro modo en este ítem

☐ la busqueda internacional se llevo a cabo segun la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23 1(b))

b ☒ Respecto a una secuencia de **ácido nucleótido y/o amino revelado** en la solicitud internacional, ver Recuadro No I

2 ☒ **Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse** (Ver Recuadro II)

3 ☐ **Falta unidad de invención** (ver Recuadro III)

4 Respecto al **título**,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lea así

5 Respecto al **resumen**,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38 2(b), segun aparece en el Recuadro III El solicitante puede, un mes despues de la fecha de haber enviado por correo este reporte de busqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad

6 Respecto a los dibujos,

a La figura de los **dibujos** que se publicara con el resumen es la Figura No 2

☒ como lo sugirio el solicitante

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura

☐ como lo selecciono esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención-

b ☐ Ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No
PCT/GB2005/003562

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

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

a tipo de material

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

b formato de material

☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c tiempo de presentación/suministro

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

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

3 Comentarios adicionales:

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No
PCT/GB2005/003562

A CLASIFICACION DE MATERIA

C07K16/28 A61K39/395 A61P37/06

Segun la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o segun la clasificación nacional y la CPI

B CAMPOS BUSCADOS

Documentacion mínima buscada (sistema de clasificacion seguido de símbolos de clasificación)

C07K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea practico, buscar terminos usados)

EPO-Interno, BIOSIS, Dato WPI, EMBASE, Dato CHEM ABS, PAJ

C DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No
X	US 5 869 049 A (NOELLE ET AL) 9 de Febrero de 1999 (1999-02-09) oraciones 15-25, reivindicación 5 ----	1-6, 21, 27, 90-93
X	WO 01/68860 A (NOVARTIS AG, NOVARTIS-ERFINDUNGEN, DI PADOVA, FRANCO, E, SCHULER, WALT) 20 de Septiembre 2001 (2001-09-20) páginas 15,16, ejemplo 3 página 2 ----- -/--	1-106

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes

* Categorías especiales de documentos citados

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o despues de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicacion de otra citación u otra razon especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelacion oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentacion internacional pero despues de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invencion

'X' documento de relevancia particular, la invencion reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular, la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional	Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional
23 de Noviembre de 2005	05/12/2005

Nombre y dirección del correo de ISA/	Funcionario autorizado
European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel No (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax No (+31-70) 340-3016	Wagner, R

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No
PCT/GB2005/003562

C DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria *	Citacion de documento, con indicacion, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No
X	BRAMS PETER ET AL· "Un anticuerpo monoclonal CD154 anti-humano humanizado bloquea la activación de células B mediatizadas por CD154-CD40". INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, vol 1, no 2, Febrero 2001 (2001-02), páginas 277-294, XP002355661 ISSN. 1567-5769 página 285, figura 8	1-6, 21, 27, 90-93

X	WO 99/00143 A (BIOGEN, INC; THOMAS, DAVID, W) 7 de Enero de 1999 (1999-01-07) página 8,13	1-6, 21, 27, 90-93

P,X	WO 2005/035572 A (DOMANTIS LIMITED, TOMLINSON, IAN, BASRAN, AMRIK; JONES, PHILIP) 21 de Abril de 2005 (2005-04-21) página 813, figura 31	1-106

X	WO 02/18445 A (BIOGEN, INC, KARPUSAS, MICHAEL, HSU, YEN-MING, TAYLOR. FREDERICK, R, Z) 7 de Marzo de 2002 (2002-03-07) página 18, linea 4-8	21, 27, 90-93

A	MUYLDERMANS S ET AL. "Reconocimiento de antígenos por fragmentos de anticuerpo de dominio único" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES. ELSEVIER, HAYWARDS, GB, vol 26, no 4, 1 de Abril de 2001 (2001-04-01), páginas 230-235, XP004241851 ISSN· 0968-0004 todo el documento	1-106

A	HOLT L J ET AL "Dominios de anticuerpos proteínas para terapia" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE GB, vol 21, no 11, Noviembre 2003 (2003-11), páginas 484-490, XP004467495 ISSN 0167-7799 todo el documento	1-106

A	WO 2004/058822 A (DOMANTIS LIMITED, WINTER, GREG, TOMLINSON, IAN, IGNATOVICH, OLGA) 15 de Julio de 2004 (2004-07-15) todo el documento	1-106

A	WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED, WINTER, GREG, TOMLINSON, IAN, IGNATOVICH, OLGA, HOLT) 8 de Enero de 2004 (2004-01-08) todo el documento	1-106

1-109

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No
PCT/GB2005/003562

C DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicacion No
A	WO 2004/058821 A (DOMANTIS LIMITED, WINTER, GREG, TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA, WOOL) 15 de Julio de 2004 (2004-07-15) todo el documento	98-106
A	WO 95/06481 A (TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE, NOELLE, RANDOLPH, J, FOY, TERESA, M, DU) 9 de Marzo de 1995 (1995-03-09) the whole document	1-106
A	WO 02/06485 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS INC, KAPELLER-LIBERMANN, ROSANNA) 24 de Enero de 2002 (2002-01-24) todo el documento	1-106
A	WO 01/94586 A (IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION) 13 de Diciembre de 2001 (2001-12-13) todo el documento	1-106
A	DURIE F ET AL "Prevención de la artritis inducida por colágeno con un anticuerpo a gp39, el ligando para CD40" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol 261, no 5126, 3 September 1993 (1993-09-03), páginas 1328-1330, XP002013403 ISSN. 0036-8075 todo el documento	1-106

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No
PCT/GB2005/003562

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones·

1 ☒ Reivindicaciones Nos ·
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber

Aunque las reivindicaciones 1-20 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/ la composición.

2 ☐ Reivindicaciones Nos :
porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente

3 ☐ Reivindicaciones No :
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Norma 6 4(a)

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así.

1 ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables

2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.

3 ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos ·

4 ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones, está cubierto por las reivindicaciones Nos

Comentario sobre Protesta

☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante y, donde aplique, el pago de derechos de protesta

☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante pero el derecho de la protesta del solicitante no se pagó dentro del límite de tiempo especificado en la invitación

☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta

42

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No
PCT/GB2005/003562

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 5869049 A	09-02-1999	ZA 9406766 A	19-04-1995
WO 0168860 A	20-09-2001	AU 4835001 A	24-09-2001
		CA 2400106 A1	20-09-2001
		EP 1263959 A1	11-12-2002
		JP 2003526371 T	09-09-2003
		US 2004038293 A1	26-02-2004
WO 9900143 A	07-01-1999	AU 8266798 A	19-01-1999
WO 2005035572 A	21-04-2005	NONE	
WO 0218445 A	07-03-2002	AU 8867501 A	13-03-2002
		CA 2421055 A1	07-03-2002
		EP 1328548 A2	23-07-2003
		JP 2004517814 T	17-06-2004
WO 2004058822 A	15-07-2004	AU 2003290338 A1	22-07-2004
		CA 2511967 A1	15-07-2004
		EP 1585766 A2	19-10-2005
WO 2004003019 A	08-01-2004	CA 2492092 A1	08-01-2004
		CN 1678634 A	05-10-2005
		EP 1517921 A2	30-03-2005
WO 2004058821 A	15-07-2004	AU 2003290330 A1	22-07-2004
WO 9506481 A	09-03-1995	AT 188487 T	15-01-2000
		AT 167062 T	15-06-1998
		AU 3518397 A	30-10-1997
		AU 696235 B2	03-09-1998
		AU 7642994 A	22-03-1995
		AU 678532 B2	29-05-1997
		AU 7644594 A	22-03-1995
		CN 1149299 A	07-05-1997
		CN 1134113 A	23-10-1996
		DE 69411025 D1	16-07-1998
		DE 69411025 T2	07-01-1999
		DE 69422523 D1	10-02-2000
		DE 69422523 T2	12-10-2000
		DK 721469 T3	01-05-2000
		DK 721346 T3	22-03-1999
		EP 0721469 A1	17-07-1996
		EP 0721346 A1	17-07-1996
		ES 2143553 T3	16-05-2000
		ES 2120067 T3	16-10-1998
		FI 960978 A	29-04-1996
		FI 960980 A	30-04-1996
		GR 3027658 T3	30-11-1998
		GR 3033095 T3	31-08-2000
		HU 74246 A2	28-11-1996
		HU 74250 A2	28-11-1996
		IL 110855 A	11-04-1999
		JP 3098739 B2	16-10-2000
		JP 11189543 A	13-07-1999
		JP 2991499 B2	20-12-1999
		JP 9502096 T	04-03-1997
		JP 3007977 B2	14-02-2000

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No
PCT/GB2005/003562

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9506481 A		JP 9502186 T	04-03-1997
		NO 960861 A	30-04-1996
		NO 960862 A	30-04-1996
		NZ 273207 A	22-09-1997
		NZ 273221 A	28-09-2001
		PT 721469 T	28-04-2000
		WO 9506666 A1	09-03-1995
		US 2002187135 A1	12-12-2002
		US 5747037 A	05-05-1998
WO 0206485 A	24-01-2002	AU 7345201 A	30-01-2002
		EP 1320590 A2	25-06-2003
WO 0194586 A	13-12-2001	AU 7522401 A	17-12-2001
		CA 2410188 A1	13-12-2001
		EP 1299542 A2	09-04-2003
		JP 2003535592 T	02-12-2003

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below
DOMBA/P33817PC		
International application No	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/GB2005/003562	16/09/2005	17/09/2004
Applicant		
DOMANTIS LIMITED		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18 A copy is being transmitted to the International Bureau

This International Search Report consists of a total of 8 sheets

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report

1 **Basis of the report**

a With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item

[ ] The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23 1(b))

b [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No I

2 [X] **Certain claims were found unsearchable** (See Box II)

3 [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box III)

4 With regard to the **title,**

[X] the text is approved as submitted by the applicant

[ ] the text has been established by this Authority to read as follows

5 With regard to the **abstract,**

[X] the text is approved as submitted by the applicant

[ ] the text has been established, according to Rule 38 2(b), by this Authority as it appears in Box No IV The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6 With regard to the **drawings,**

a the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No 2

[X] as suggested by the applicant

[ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

[ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b [ ] none of the figures is to be published with the abstract

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2005/003562 13

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of

a type of material

- [X] a sequence listing
- [ ] table(s) related to the sequence listing

b format of material

- [X] in written format
- [X] in computer readable form

c time of filing/furnishing

- [X] contained in the international application as filed
- [X] filed together with the international application in computer readable form
- [ ] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2 [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished

3 Additional comments

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB2005/003562 14

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/28 A61K39/395 A61P37/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	US 5 869 049 A (NOELLE ET AL) 9 February 1999 (1999-02-09) sentences 15-25; claim 5	1-6,21, 27,90-93
X	WO 01/68860 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS-ERFINDUNGEN; DI PADOVA, FRANCO, E; SCHULER, WALT) 20 September 2001 (2001-09-20) pages 15,16; example 3 page 2	1-106

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 November 2005	05/12/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Wagner, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	BRAMS PETER ET AL: "A humanized anti-human CD154 monoclonal antibody blocks CD154-CD40 mediated human B cell activation" INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, vol. 1, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 277-294, XP002355661 ISSN: 1567-5769 page 285; figure 8	1-6,21, 27,90-93
X	WO 99/00143 A (BIOGEN, INC; THOMAS, DAVID, W) 7 January 1999 (1999-01-07) pages 8,13	1-6,21, 27,90-93
P,X	WO 2005/035572 A (DOMANTIS LIMITED; TOMLINSON, IAN; BASRAN, AMRIK; JONES, PHILIP) 21 April 2005 (2005-04-21) page 813; figure 31	1-106
X	WO 02/18445 A (BIOGEN, INC; KARPUSAS, MICHAEL; HSU, YEN-MING; TAYLOR, FREDERICK, R; Z) 7 March 2002 (2002-03-07) page 18, lines 4-8	21,27, 90-93
A	MUYLDERMANS S ET AL: "Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARDS, GB, vol. 26, no. 4, 1 April 2001 (2001-04-01), pages 230-235, XP004241851 ISSN: 0968-0004 the whole document	1-106
A	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 the whole document	1-106
A	WO 2004/058822 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA) 15 July 2004 (2004-07-15) the whole document	1-106
A	WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; HOLT) 8 January 2004 (2004-01-08) the whole document	1-109

-/—

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	WO 2004/058821 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; WOOL) 15 July 2004 (2004-07-15) the whole document	98-106
A	WO 95/06481 A (TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE; NOELLE, RANDOLPH, J; FOY, TERESA, M; DU) 9 March 1995 (1995-03-09) the whole document	1-106
A	WO 02/06485 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS INC; KAPELLER-LIBERMANN, ROSANNA) 24 January 2002 (2002-01-24) the whole document	1-106
A	WO 01/94586 A (IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION) 13 December 2001 (2001-12-13) the whole document	1-106
A	DURIE F ET AL: "Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 261, no. 5126, 3 September 1993 (1993-09-03), pages 1328-1330, XP002013403 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-106

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2005/003562 17

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons

1 [X] Claims Nos
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely

Although claims 1-20 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2 [ ] Claims Nos
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically

3 [ ] Claims Nos
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6 4(a)

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows

1 [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims

2 [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee

3 [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos

4 [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB2005/003562

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5869049 A	09-02-1999	ZA 9406766 A	19-04-1995
WO 0168860 A	20-09-2001	AU 4835001 A	24-09-2001
		CA 2400106 A1	20-09-2001
		EP 1263959 A1	11-12-2002
		JP 2003526371 T	09-09-2003
		US 2004038293 A1	26-02-2004
WO 9900143 A	07-01-1999	AU 8266798 A	19-01-1999
WO 2005035572 A	21-04-2005	NONE	
WO 0218445 A	07-03-2002	AU 8867501 A	13-03-2002
		CA 2421055 A1	07-03-2002
		EP 1328548 A2	23-07-2003
		JP 2004517814 T	17-06-2004
WO 2004058822 A	15-07-2004	AU 2003290338 A1	22-07-2004
		CA 2511967 A1	15-07-2004
		EP 1585766 A2	19-10-2005
WO 2004003019 A	08-01-2004	CA 2492092 A1	08-01-2004
		CN 1678634 A	05-10-2005
		EP 1517921 A2	30-03-2005
WO 2004058821 A	15-07-2004	AU 2003290330 A1	22-07-2004
WO 9506481 A	09-03-1995	AT 188487 T	15-01-2000
		AT 167062 T	15-06-1998
		AU 3518397 A	30-10-1997
		AU 696235 B2	03-09-1998
		AU 7642994 A	22-03-1995
		AU 678532 B2	29-05-1997
		AU 7644594 A	22-03-1995
		CN 1149299 A	07-05-1997
		CN 1134113 A	23-10-1996
		DE 69411025 D1	16-07-1998
		DE 69411025 T2	07-01-1999
		DE 69422523 D1	10-02-2000
		DE 69422523 T2	12-10-2000
		DK 721469 T3	01-05-2000
		DK 721346 T3	22-03-1999
		EP 0721469 A1	17-07-1996
		EP 0721346 A1	17-07-1996
		ES 2143553 T3	16-05-2000
		ES 2120067 T3	16-10-1998
		FI 960978 A	29-04-1996
		FI 960980 A	30-04-1996
		GR 3027658 T3	30-11-1998
		GR 3033095 T3	31-08-2000
		HU 74246 A2	28-11-1996
		HU 74250 A2	28-11-1996
		IL 110855 A	11-04-1999
		JP 3098739 B2	16-10-2000
		JP 11189543 A	13-07-1999
		JP 2991499 B2	20-12-1999
		JP 9502096 T	04-03-1997
		JP 3007977 B2	14-02-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB2005/003562

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9506481 A		JP 9502186 T	04-03-1997
		NO 960861 A	30-04-1996
		NO 960862 A	30-04-1996
		NZ 273207 A	22-09-1997
		NZ 273221 A	28-09-2001
		PT 721469 T	28-04-2000
		WO 9506666 A1	09-03-1995
		US 2002187135 A1	12-12-2002
		US 5747037 A	05-05-1998
WO 0206485 A	24-01-2002	AU 7345201 A	30-01-2002
		EP 1320590 A2	25-06-2003
WO 0194586 A	13-12-2001	AU 7522401 A	17-12-2001
		CA 2410188 A1	13-12-2001
		EP 1299542 A2	09-04-2003
		JP 2003535592 T	02-12-2003

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

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación
23 de Marzo de 2006 (23.03.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/030220 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes[7]:
C07K 16/28 (2006 01) *A61P 37/06* (2006 01)
A61K 39/395 (2006 01)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/GB2005/003562

(22) Fecha de Registro Internacional: 16 de Septiembre de 2005 (16 09 2005)

(25) Idioma de registro: INGLES

(26) Idioma de Publicación: INGLES

(30) Información de Prioridad:
60/610,819 17 de Septiembre de 2004 (17 09 2004) US
11/105,512 8 de Abril de 2005 (08 04 2005) US

(71) Solicitante: (para todos los estados designados, excepto EU) **DOMANTIS LIMITED** [GB/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB)

(72) Inventores: e
(75) Inventores/solicitantes (para los EU únicamente) **GRANT Steven** [GB/GB], 315 Cambridge Science Park, Cambridge, Cambridgeshire CB4 0WG (GB) **LIU Haiqun** [CN/GB], 315 Cambridge Science Park, Cambridge, Cambridgeshire CB4 0WG (GB) **MOULDER Kevin** [GB/GB], 315 Cambridge Science Park, Cambridge, Cambridgeshire CB4 0WG (GB)

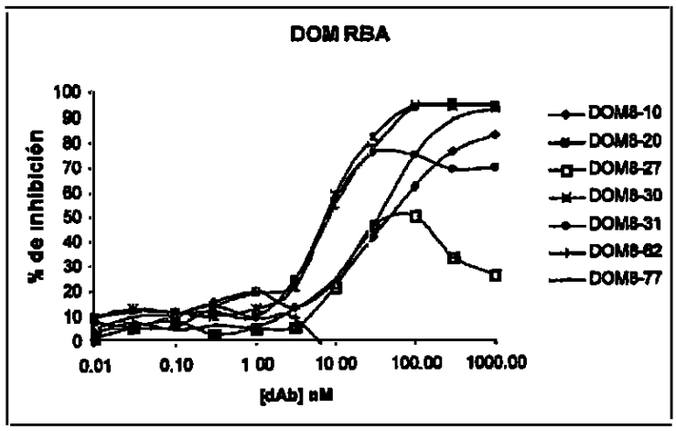
(74) Agente: **THOMAS, Philip**, Eric Potter Clarkson, Park View House, 58 The Ropewalk, Nottingham NG1 5DD, (GB)

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

(84) Estados Designados (*salvo que de otro modo indicado para cada clase de la protección regional disponible*) ARIPO (BW, GH,

[Continua en la próxima página]

(54) Título "COMPOSICIONES MONOVALENTES PARA EL ENLACE DE CD40L Y METODOS DE USO"



(57) **Resumen** La invención se relaciona con polipéptidos de anticuerpo que se enlazan monovalentemente a CD40L Los polipéptidos de anticuerpo que son monovalentes para el enlace a CD40L pueden inhibir la actividad de CD40L, mientras evitan los efectos indeseables potenciales que pueden ocurrir con anticuerpos de enlace divalente o multivalente de CD40L En un aspecto, un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente consiste de o comprende un dominio variable de inmunoglobulina sencillo que se enlaza específicamente y antagoniza la actividad de CD40L, preferiblemente sin agonizar sustancialmente la actividad de CD40 y/o CD40L En otro aspecto, el polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente es un polipéptido de anticuerpo humano La invención abarca además métodos para antagonizar las interacciones CD40/CD40L en un individuo y métodos para tratar enfermedades o trastornos que involucran a las interacciones CD40/CD40L, los métodos involucran la administración de un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente al individuo.

Declaración bajo la Regla 4.17:
__ de la calidad del inventor (Regla 4 17(iv)) para EU únicamente

Publicado:
__ *sin reporte de búsqueda internacional y para ser republicado con el recibido de este reporte*

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

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

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
23 March 2006 (23.03.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/030220 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/GB2005/003562

(22) International Filing Date:
16 September 2005 (16.09.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/610,819 17 September 2004 (17.09.2004) US
11/105,512 8 April 2005 (08.04.2005) US

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

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

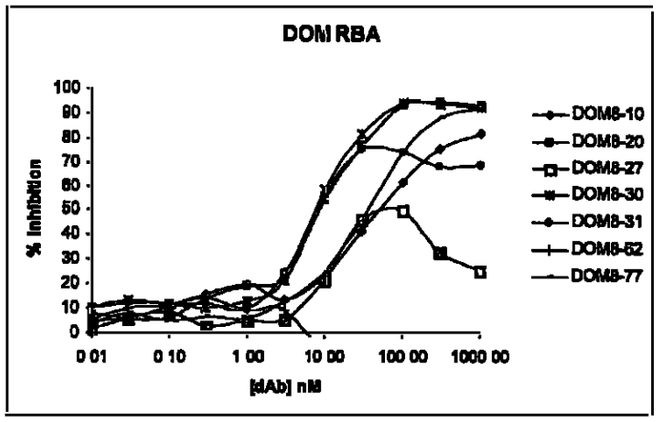
(74) Agent: THOMAS, Philip, Eric Potter Clarkson, Park View House, 58 The Ropewalk, Nottingham NG1 5DD (GB)

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

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH,

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS MONOVALENT FOR CD40L BINDING AND METHODS OF USE



(57) Abstract: The invention relates to antibody polypeptides that monovalently bind CD40L. Antibody polypeptides that are monovalent for binding of CD40L can inhibit CD40L activity while avoiding potential undesirable effects that can occur with antibodies capable of divalent or multivalent binding of CD40L. In one aspect, a monovalent anti-CD40L antibody polypeptide consists of or comprises a single immunoglobulin variable domain that specifically binds and antagonizes the activity of CD40L, preferably without substantially agonizing CD40 and/or CD40L activity. In another aspect, the monovalent anti-CD40L antibody polypeptide is a human antibody polypeptide. The invention further encompasses methods of antagonizing CD40/CD40L interactions in an individual and methods of treating diseases or disorders involving CD40/CD40L interactions, the methods involving administering a monovalent anti-CD40L antibody polypeptide to the individual.

WO 2006/030220 A1

Declaration under Rule 4.17:
— *of inventorship (Rule 4 17(iv)) for US only*

Published:
— *with international search report*

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

CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE INTERNACIONAL JUNTO CON SU TRADUCCION

REIVINDICACIONES ORIGINALES

1. Un método para antagonizar una actividad de CD40 o CD40L en un individuo, el método comprende administrar un polipéptido de anticuerpo que es monovalente para el enlace a CD40L (gp39) a dicho individuo, en donde dicho polipéptido antagoniza una actividad de CD40 o CD40L o ambas.

2. Un método para antagonizar el enlace de CD40 a CD40L en un individuo, el método comprende administrar un polipéptido de anticuerpo que es monovalente para el enlace a CD40L (gp39) a dicho individuo, en donde dicho polipéptido antagoniza el enlace de CD40 a CD40L en dicho individuo.

3. Un método para el tratamiento o prevención de un síntoma de enfermedad autoinmune en un individuo, el método comprende administrar un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente a dicho individuo en una cantidad efectiva para tratar o prevenir un síntoma de enfermedad autoinmune.

4. Un método para el tratamiento o prevención an autoinmune disease en un individuo, the método que comprende administrar un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente a dicho individuo en una cantidad efectiva para tratar o prevenir un síntoma de enfermedad autoinmune.

5. El método de la reivindicación 3, en donde dicha enfermedad autoinmune es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, Diabetes, rechazo de alointerto, rechazo de trasplante de xenoinjerto, y enfermedad injerto vs. hospedera.

6. El método de la reivindicación 3, en donde dicho polipéptido de anticuerpo inhibe el enlace de CD40L a CD40.

7. El método de la reivindicación 3, en donde dicho polipéptido de anticuerpo comprende una secuencia de amino ácido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NOs 7-82, SEQ ID NOs 246-360, y DOM8-24.

8 El método de la reivindicación 3, en donde dicho polipéptido de anticuerpo tiene una secuencia de amino ácido al menos 85% idéntica a una

secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs 7-82 y 246-360, cuyo polipéptido de anticuerpo se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L.

9. El método de la reivindicación 6, en donde dicho polipéptido de anticuerpo inhibe el enlace de CD40L a CD40 con un IC_{50} en el rango de 20 pM a 1.5 μM, inclusive.

10. El método de la reivindicación 3, en donde dicho polipéptido de anticuerpo está enlazado a PEG.

11. El método de la reivindicación 10, en donde dicho polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 24 kD.

12. El método de la reivindicación 10, en donde dicho PEG está enlazado a dicho anticuerpo a un residuo de cisteína o lisina.

13. El método de la reivindicación 10, en donde el tamaño total del PEG esde 20 a 60 kD, inclusive.

14. El método de la reivindicación 10, en donde dicho polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 200 kD.

15. El método de la reivindicación 10, en donde dicho polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG tiene una vida media in vivo aumentada con relación a la misma composición de polipéptido que carece de polietilen glicol enlazado

16. El método de la reivindicacion 15, en donde la vida media tα de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más.

17. El método de la reivindicación 15, en donde la vida media tα de la composición de polipéptido está en el rango de 0 25 minutos a 12 horas.

18. El método de la reivindicación 15 en donde la vida media tβ de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más.

19. El método de la reivindicación 15, en donde la vida media tβ está en el rango de 12 a 48 horas.

20. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho polipéptido de anticuerpo es un dominio V_{HH} camélido o de tiburón nodriza.

21 Un polipéptido de anticuerpo que es monovalente para el enlace a CD40L (gp39), en donde el enlace de dicho polipéptido de anticuerpo a CD40L no agoniza sustancualmente la actividad de CD40 y/o CD40L.

22. El anticuerpo de la reivindicación 21, en donde dicho polipéptido de anticuerpo inhibe el enlace de CD40 a CD40L, y no agoniza sustancialmente la señalización por CD40.

23. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 21, en donde el enlace de dicho polipéptido de anticuerpo a CD40L no induce sustancialmente la fosforilación JNK en las células T Jurkat.

24. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 21, en donde el enlace de dicho polipéptido de anticuerpo a CD40L no induce sustancialmente la secreción IFN-γ por células T Jurkat co-estimuladas con anticuerpo anti-CD3.

25. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 21, en donde la presencia de dicho polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaqueta estándar no produce la agregación de más del 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo.

26. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 21, en el cual dicho polipéptido de anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste de un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo, dAb, FAb, un scFv, un Fv, o un Fv enlazado a disulfuro.

27. Un polipéptido de anticuerpo que es monovalente para el enlace a CD40L (gp 39), en donde la presencia de dicho polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaqueta estándar no produce la agregación de más del 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo.

28. Un polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 21.

29 El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 28, que tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 24 kD.

30. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 28, en donde dicho PEG está enlazado a dicho anticuerpo en un residuo de cisteína o lisina

31. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 28, en donde el tamaño total del PEG es de 20 a 60 kD, inclusive.

32. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 28, que tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 200 kD.

33. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 28, que tiene una vida media in vivo aumentada con relación a la misma composición de polipéptido que no tiene polietilenglicol enlazado.

34 El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 33, en donde la vida media $t\alpha$ de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más.

35. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 33, en donde la vida media $t\alpha$ de la composición de polipéptido está en el rango de 0.25 minutos a 12 horas.

36. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 33, en donde la vida media $t\beta$ de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más.

37. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 33, en donde la vida media $t\beta$ está en el rango de 12 a 48 horas.

38. El anticuerpo de la reivindicación 21 que comprende una secuencia de

amino ácido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NOs 7-82 y 246-360.

39. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 21, que está libre de un dominio Fc.

40. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 39, en donde la presencia de dicho polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaqueta estándar no produce la agregación de más del 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo.

41. El anticuerpo de la reivindicación 21 que inhibe el enlace de CD40L a CD40 con un IC_{50} en el rango de 20 pM a 1.5 μM, inclusive.

42 Una composición que comprende el polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 21 y un segundo polipéptido de anticuerpo que se enlaza a un ligando diferente de CD40L, en donde dicho polipéptido de anticuerpo que se enlaza a un ligando diferente de CD40L se enlaza a un ligando seleccionado del grupo que consiste de HSA, TNFα, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN-γ, CD2, CD4, CD8, LFA1, LFA3, VLA4, CD80, B7-1, CD28, CD86, B7-2, CTLA-4, CD28, molécula co-estimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, ligando de molécula co-estimuladora inducible (ICOSL), OXL40, HVEM (Mediador de la Entrada del Virus del Herpes), LIGHT.

43. Un polipéptido de anticuerpo que tiene una secuencia de amino ácido al menos 85% idéntica a una secuencias seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS 7-82, SEQ ID NOs: 246-360, y DOM8-24, cuyo polipéptido de anticuerpo se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L.

44 Un polipéptido que se enlaza a antígeno, dicho polipéptido comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L, en donde dicho polipéptido inhibe sustancialmente el enlace de CD40L a CD40.

45. El polipéptido que se enlaza a antígeno de la reivindicación 44, que inhibe el enlace de CD40 a CD40L con un IC_{50} en el rango de 20 pM a 1.5 μM,

inclusive.

46. El polipéptido que se enlaza a antígeno de la reivindicación 44, en donde el enlace de dicho polipéptido a CD40L no agoniza sustancialmente la actividad de CD40 y/o CD40L.

47. El polipéptido que se enlaza a antígeno de la reivindicación 44, en donde el enlace de dicho polipéptido a CD40L no induce sustancialmente la fosforilación JNK en las células T Jurkat.

45. El polipéptido que se enlaza a antígeno de la reivindicación 44, en donde el enlace de dicho polipéptido de anticuerpo a CD40L no induce sustancialmente la secreción IFN-γ por células T Jurkat co-estimuladas con anticuerpo anti-CD3.

46 El polipéptido que se enlaza a antígeno de la reivindicación 44, en donde la presencia de dicho polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaqueta estándar no produce la agregación de más del 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo.

47. El polipéptido que se enlaza a antígeno de la reivindicación 44, en el cual dicho polipéptido que se enlaza a antígeno se selecciona del grupo que consiste de un polipéptido de dominio variable sencillo, dAb, FAb, un scFv, un Fv, o un Fv enlazado a disulfuro.

48. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 21 o 44, en donde el dominio variable anti-CD40L o dAb comprende una o más regiones de marco que comprenden una secuencia de amino ácido que es la misma secuencia de amino ácido de una región de marco correspondiente codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal, o la secuencia de amino ácido de una o más de dichas regiones de marco que comprenden colectivamente hasta 5 diferencias de amino ácido con relación a la secuencia de amino ácido de dicha región de marco correspondiente codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal.

49. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 21 o 44, en donde las secuencias de amino ácido de FW1, FW2, FW3 y FW4 del dominio variable

anti-CD40L o dAb son las mismas que las secuencias de aminoácido de regiones de marco correspondientes codificadas por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal, o las secuencias de amino ácido de FW1, FW2, FW3 y FW4 colectivamente contienen hasta 10 diferencias de amino ácido con relación a las secuencias de amino ácido de las regiones de marco correspondientes codificadas por dicho segmento de gen de anticuerpo de línea germinal.

50. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 49, en donde las secuencias de amino ácido de dichos FW1, FW2 y FW3 del dominio variable anti-CD40L o dAb son las mismas que las secuencias de amino ácido de regiones de marco correspondientes codificadas por segmentos de gen de anticuerpo de línea germinal humana.

51. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 49, en donde dicho segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana se selecciona del grupo que consiste de DP47, DP45, DP48 y DPK9.

52. Un polipéptido que se enlaza a antígeno, enlazado a PEG, que comprende un dominio variable de inmunoglobulina sencillo que se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L.

53. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 52, que tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 24 kD.

54. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 52, en donde dicho PEG está enlazado a dicho anticuerpo en un residuo de cisteína o lisina.

55. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 52, en donde el tamaño total del PEG es de 20 a 60 kD, inclusive.

56. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 52, que tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 200 kD.

57. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 52, que tiene una vida media in vivo aumentada con relación a la misma composición de polipéptido que no tiene polietilenglicol enlazado.

58. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 52, en donde la vida media tα de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más.

59. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 52, en donde la vida media tα de la composición de polipéptido está en el rango de 0.25 minutos a 12 horas.

60. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 52, en donde la vida media tβ de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más.

61. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 60, en donde la vida media tβ está en el rango de 12 a 48 horas.

62. Un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina, dicho polipéptido comprende un dominio variable de inmunoglobulina sencillo que se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L, y que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs 7-82, y SEQ ID NOs 246-360, y DOM 8-24

63. Un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina que tiene una secuencia de amino ácido al menos 85% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs 7-82, y SEQ ID NOs 246-360 y DOM8-24, cuyo polipéptido se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L.

64. El polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina de la reivindicación 63, que comprende un dominio variable de inmunoglobulina sencillo que se enlaza específicamente y covalentemente a CD40L.

65. El polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina de la reivindicación 63 que antagoniza el enlace de CD40L.

66. El polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina de la reivindicación 63, que inhibe el enlace de CD40 a CD40L, y que tiene un IC50 en el rango de 20 pM a 1.5 μM, inclusive.

67 El polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina de la reivindicación 63, en donde dicho polipéptido que se enlaza a antígeno inhibe la interacción de CD40 con CD40L, pero no agoniza significativamente la señalización por CD40.

68. Una composición que comprende el polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina de la reivindicación 63 y un segundo polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina que se enlaza a otro ligando diferente de CD40L.

69. La composición de la reivindicación 68, en donde dicho polipéptido de anticuerpo que se enlaza a un ligando diferente de CD40L, se enlaza a un ligando seleccionado del grupo que consiste de HSA, TNFα, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN-γ, CD2, CD4, CD8, LFA1, LFA3, VLA4, CD80, B7-1, CD28, CD86, B7-2, CTLA-4, CD28, molécula co-estimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, ligando de molécula co-estimuladora inducible (ICOSL), OXL40, HVEM (Mediador de la Entrada del Virus del Herpes), LIGHT.

70. Una formulación farmacéutica de liberación prolongada que comprende un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente.

71. La formulación farmacéutica de liberación prolongada de la reivindicación 70, en donde dicho polipéptido de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un dAb, Fab, scFv, Fv, o un Fv enlazado a disulfuro.

72. La formulación de la reivindicación 70, en donde dicho polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente comprende un dominio variable de imunoglobulina sencillo que se enlaza a CD40L

73. Un polipéptido de dominio variable sencilo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, dicho polipéptido comprende la secuencia de DOM8-24.

74. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el polipéptido tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de DOM8-24, o difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y

tiene una secuencia que es al menos 80% homóloga a la secuencia de DOM8-24.

75. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el polipéptido tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la DOM8-24, o difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24.

76. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el polipéptido tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de DOM8-24, o difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24.

77. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el polipéptido tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la DOM8-24, o difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

78. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el dAb tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de DOM8-24, o difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24, y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24.

79 Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el dAb tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de DOM8-24, o difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2

de DOM8-24, y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

80. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el dAb tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de DOM8-24, o difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24, y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

81. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el dAb tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de DOM8-24, o difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24, y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24, y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

82 Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24.

83. Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24.

84. Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

85. Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24, y una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24.

86. Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24, y una secuencia

de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

87. Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24, y una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24

88. Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24, y una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24, y una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

89. El antagonista de CD40L de la reivindicación 104, en donde dicho antagonista es un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo, dAb, FAb, un scFv, un Fv o un Fv enlazado a disulfuro.

90. Un polipéptido de anticuerpo que inhibe el enlace de DOM8-24 a CD40L.

91 Un polipéptido de anticuerpo que se enlaza al mismo epítopo de CD40L enlazado por DOM8-24.

92. Un método para tratar o prevenir un síntoma de enfermedad autoinmune en un individuo, el método comprende administrar el polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 90 o 91 a dicho individuo en una cantidad efectiva para tratar o prevenir un síntoma de enfermedad autoinmune.

93. Un polipéptido de anticuerpo que se enlaza al mismo epítopo de CD40L unido mediante un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 7-82 y 246-360.

94 Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de DOM8-24.

95. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 7-82 y 246-360.

96. El polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo de la reivindicación 94, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de dos o más de CDR1, CDR2, o CDR3 de DOM8-24.

97. El polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo de la reivindicación 95, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de dos o más de CDR1, CDR2, o CDR3 de un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 7-82 y 246-360.

98. Un ligando específico dual que comprende un primer dominio variable sencillo de inmunoglobulina que tiene una especificidad de enlace a un primer antígeno y un segundo dominio variable sencillo que tiene una actividad de enlace a un segundo antígeno, en donde el primer antígeno es CD40L y el segundo dominio variable sencillo es un antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno, o un antígeno de superficie de célula T.

99. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 98, en donde el antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno se selecciona de uno del grupo que consiste de antígenos de superficie de macrógafo activado, antígenos de superficie de célula B activados, antígenos de superficie de la ruta se señalización co-estimuladora, y MHC

100. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 99, en donde el MHC es clase II.

101. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 100, en donde el MHC clase II es alfa.

102. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 100, en donde el MHC clase II es beta.

103. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 99, en donde el antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno se selecciona de uno del grupo que consiste de CD28, molécula co-estimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, ligando de molécula co-estimuladora inducible (ICOSL), OXL40, CD80, CD86, HVEM (Mediador de la Entrada del Virus del Herpes) y LIGHT.

104. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 99, en donde el antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno se selecciona de uno del grupo que consiste de CD28, molécula co-estimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69 y CD3.

105. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 99, en donde el antígeno de superficie es un antígeno de superficie del gen B7.

106. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 105, en donde el antígeno de superficie del gen B7 es B7-2, o B7-1.

CLAIMS

1. A method of antagonizing an activity of CD40 or CD40L in an individual, the method comprising administering an antibody polypeptide that is monovalent for binding to CD40L (gp39) to said individual wherein said polypeptide antagonizes an activity of CD40 or CD40L or both.

2. A method of antagonizing the binding of CD40 to CD40L in an individual, the method comprising administering an antibody polypeptide that is monovalent for binding to CD40L (gp39) to said individual, wherein said polypeptide antagonizes the binding of CD40 to CD40L in said individual.

3. A method of treating or preventing a symptom of autoimmune disease in an individual, the method comprising administering a monovalent anti-CD40L antibody polypeptide to said individual in an amount effective to treat or prevent a symptom of autoimmune disease.

4. A method of treating or preventing an autoimmune disease in an individual, the method comprising administering a monovalent anti-CD40L antibody polypeptide to said individual in an amount effective to treat or prevent a symptom of autoimmune disease

5. The method of claim 3, wherein said autoimmune disease is a disease selected from the group consisting of systemic lupus erythematosis, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, Diabetes, allograft rejection, xenograft transplant rejection, and graft vs. host disease.

6 The method of claim 3, wherein said antibody polypeptide inhibits the binding of CD40L to CD40.

7. The method of claim 3, wherein said antibody polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7-82, SEQ ID NOs 246-360, and DOM8-24.

8. The method of claim 3, wherein said antibody polypeptide has an amino acid sequence at least 85% identical to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7-82 and 246-360, which antibody polypeptide specifically and monovalently binds CD40L.

9. The method of claim 6, wherein said antibody polypeptide inhibits binding of CD40L to CD40 with an IC_{50} in the range of 20 pM to 1 5 μM, inclusive.

10. The method of claim 3, wherein said antibody polypeptide is PEG-linked.

11. The method of claim 10, wherein said PEG-linked antibody polypeptide has a hydrodynamic size of at least 24 kD.

12. The method of claim 10 wherein said PEG is linked to said antibody at a cysteine or lysine residue.

13. The method of claim 10 wherein the total PEG size is from 20 to 60 kD, inclusive.

14 The method of claim 10 wherein said PEG-linked antibody polypeptide has a hydrodynamic size of at least 200 kD.

15 The method of claim 10 wherein said PEG-linked antibody polypeptide has an increased in vivo half-life relative to the same polypeptide composition lacking linked polyethylene glycol.

16 The method of claim 15 wherein the tα-half life of the polypeptide composition is increased by 10% or more.

17. The method of claim 15 wherein the tα-half life of the polypeptide composition is in the range of 0.25 minutes to 12 hours.

18. The method of claim 15 wherein the tβ-half life of the polypeptide composition is increased by 10% or more.

19 The method of claim 15 wherein the tβ-half life is in the range of 12 to 48 hours.

20. The method of claim 1 or 2 wherein said antibody polypeptide is a camelid or nurse shark V_{HH} domain.

21. An antibody polypeptide that is monovalent for binding to CD40L (gp39), wherein binding of said antibody polypeptide to CD40L does not substantially agonize CD40 and/or CD40L activity.

22. The antibody of claim 21 wherein said antibody polypeptide inhibits the binding of CD40 to CD40L, and does not substantially agonize signaling by CD40.

23. The antibody polypeptide of claim 21 wherein binding of said antibody polypeptide to CD40L does not substantially induce JNK phosphorylation in Jurkat T-cells.

24. The antibody polypeptide of claim 21 wherein binding of said antibody polypeptide to CD40L does not substantially induce IFN-γ secretion by Jurkat T-cells co-stimulated with anti-CD3 antibody.

25. The antibody polypeptide of claim 21 wherein the presence of said antibody polypeptide in a standard platelet aggregation assay does not result in aggregation of more than 25% over the aggregation observed in a negative control assay.

26. The antibody polypeptide of claim 21 in which said antibody polypeptide is selected from the group consisting of an antibody single variable domain polypeptide, dAb, FAb, an scFv, an Fv, or a disulfide-bonded Fv.

27. An antibody polypeptide that is monovalent for binding to CD40L (gp39), wherein the presence of said antibody polypeptide in a standard platelet aggregation assay does not result in aggregation of more than 25% over the aggregation observed in a negative control assay

28 A PEG-linked antibody polypeptide of claim 21.

29. The PEG-linked antibody polypeptide of claim 28 which has a hydrodynamic size of at least 24 kD.

30. The PEG-linked antibody polypeptide of claim 28 wherein said PEG is linked to said antibody at a cysteine or lysine residue.

31. The PEG-linked antibody polypeptide of claim 28 wherein the total PEG size is from 20 to 60 kD, inclusive

32. The PEG-linked antibody polypeptide of claim 28 which has a hydrodynamic size of at least 200 kD.

33 The PEG-linked antibody polypeptide of claim 28 which has an increased in vivo half-life relative to the same polypeptide composition lacking linked polyethylene glycol.

34. The PEG-linked antibody polypeptide of claim 33 wherein the tα-half life of the polypeptide composition is increased by 10% or more

35. The PEG-linked antibody polypeptide of claim 33 wherein the tα-half life of the polypeptide composition is in the range of 0.25 minutes to 12 hours.

36. The PEG-linked antibody polypeptide of claim 33 wherein the tβ-half life of the polypeptide composition is increased by 10% or more.

37 The PEG-linked antibody polypeptide of claim 33 wherein the tβ-half life is in the range of 12 to 48 hours.

38. The antibody of claim 21 which comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7-82 and 246-360.

39. The antibody polypeptide of claim 21 which is free of an Fc domain.

40. The antibody polypeptide of claim 39 wherein the presence of said antibody polypeptide in a standard platelet aggregation assay does not result in aggregation of more than 25% over the aggregation observed in a negative control assay.

41. The antibody of claim 21 which inhibits binding of CD40L to CD40 with an IC_{50} in the range of 20 pM to 1.5 μM, inclusive.

42 A composition comprising the antibody polypeptide of claim 21 and a second antibody polypeptide which binds a ligand other than CD40L, wherein said antibody polypeptide which binds a ligand other than CD40L binds a ligand selected from the group consisting of HSA, TNFα, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN-γ, CD2, CD4, CD8, LFA1, LFA3, VLA4, CD80, B7-1, CD28, CD86, B7-2, CTLA-4 CD28, Inducible costimulatory molecule (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, Inducible costimulatory molecule ligand (ICOSL), OX40L, HVEM (Herpes Virus Entry Mediator), LIGHT.

43. An antibody polypeptide which has an amino acid sequence at least 85% identical to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7-82, SEQ ID NOs 246-360, and DOM8-24, which antibody polypeptide specifically and monovalently binds CD40L.

44. An antigen-binding polypeptide, said polypeptide comprising a immunoglobulin single variable domain which specifically and monovalently binds CD40L, wherein said polypeptide substantially inhibits the binding of CD40L to CD40.

45. The antigen-binding polypeptide of claim 44 which inhibits the binding of CD40 to CD40L with an IC_{50} in the range of 20 pM to 1.5 μM, inclusive

46. The antigen-binding polypeptide of claim 44 wherein binding of said polypeptide to CD40L does not substantially agonize CD40 and/or CD40L activity.

47. The antigen-binding polypeptide of claim 44 wherein binding of said polypeptide to CD40L does not substantially induce JNK phosphorylation in Jurkat T-cells.

45. The antigen-binding polypeptide of claim 44 wherein binding of said polypeptide to CD40L does not substantially induce IFN-γ secretion by Jurkat T-cells co-stimulated with anti-CD3 antibody.

46. The antigen-binding polypeptide of claim 44 wherein the presence of said antibody polypeptide in a standard platelet aggregation assay does not result in aggregation of more than 25% over the aggregation observed in a negative control assay.

47. The antigen-binding polypeptide of claim 44 in which said antigen-binding polypeptide is selected from the group consisting of an antibody single variable domain polypeptide, dAb, FAb, an scFv, an Fv, or a disulfide-bonded Fv

48. A polypeptide according to claim 21 or 44, wherein the anti-CD40L variable domain or dAb comprises one or more framework regions comprising an amino acid sequence that is the same as the amino acid sequence of a corresponding framework region encoded by a human germline antibody gene segment, or the amino acid sequence of one or more of said framework regions

collectively comprises up to 5 amino acid differences relative to the amino acid sequence of said corresponding framework region encoded by a human germline antibody gene segment.

49. A polypeptide according to claim 21 or 44, wherein the amino acid sequences of FW1, FW2, FW3 and FW4 of the anti-CD40L variable domain or dAb are the same as the amino acid sequences of corresponding framework regions encoded by a human germline antibody gene segment, or the amino acid sequences of FW1, FW2, FW3 and FW4 collectively contain up to 10 amino acid differences relative to the amino acid sequences of corresponding framework regions encoded by said human germline antibody gene segment.

50. The polypeptide according to claim 49, wherein the amino acid sequences of said FW1, FW2 and FW3 of the anti-CD40L variable domain or dAb are the same as the amino acid sequences of corresponding framework regions encoded by human germline antibody gene segments.

51. The polypeptide according to claim 49, wherein said human germline antibody gene segment is selected from the group consisting of DP47, DP45, DP48 and DPK9.

52 A PEG-linked antigen-binding polypeptide comprising a single immunoglobulin variable domain which specifically and monovalently binds CD40L.

53. The PEG-linked polypeptide of claim 52 which has a hydrodynamic size of at least 24 kD.

54. The PEG-linked polypeptide of claim 52 wherein said PEG is linked to said antibody at a cysteine or lysine residue.

55. The PEG-linked polypeptide of claim 52 wherein the total PEG size is from 20 to 60 kD, inclusive.

56 The PEG-linked polypeptide of claim 52 which has a hydrodynamic size of at least 200 kD

57. The PEG-linked polypeptide of claim 52 which has an increased in vivo half-life relative to the same polypeptide composition lacking linked polyethylene glycol.

58 The PEG-linked polypeptide of claim 52 wherein the tα-half life of the polypeptide composition is increased by 10% or more.

59. The PEG-linked polypeptide of claim 52 wherein the tα-half life of the polypeptide composition is in the range of 0.25 minutes to 12 hours

60 The PEG-linked polypeptide of claim 52 wherein the tβ-half life of the polypeptide composition is increased by 10% or more.

61. The PEG-linked polypeptide of claim 60 wherein the tβ-half life is in the range of 12 to 48 hours.

62. An immunoglobulin variable domain polypeptide, said polypeptide comprising a single immunoglobulin variable domain which specifically and monovalently binds CD40L, and which comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7-82, SEQ ID NOs 246-360, and DOM8-24

63. An immunoglobulin variable domain polypeptide which has an amino acid sequence at least 85% identical to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7-82, SEQ ID NOs 246-360, and DOM8-24, which polypeptide specifically and monovalently binds CD40L.

64. The immunoglobulin variable domain polypeptide of claim 63 which comprises a single immunoglobulin variable domain which specifically and monovalently binds CD40L

65. The immunoglobulin variable domain polypeptide of claim 63 which antagonizes the binding of CD40L.

66 The immunoglobulin variable domain polypeptide of claim 63 which inhibits the binding of CD40 to CD40L and which has an IC50 in the range of 20 pM to 1.5 μM, inclusive.

67. The immunoglobulin variable domain polypeptide of claim 63 wherein said antigen-binding polypeptide inhibits the interaction of CD40 with CD40L, but does not substantially agonize signaling by CD40.

68. A composition comprising the immunoglobulin variable domain polypeptide of claim 63 and a second immunoglobulin variable domain polypeptide which binds a ligand other than CD40L.

69. The composition of claim 68 wherein said antibody polypeptide which binds a ligand other than CD40L binds a ligand selected from the group consisting of HSA, TNFα, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN-γ, CD2, CD4, CD8, LFA1, LFA3, VLA4, CD80, B7-1, CD28, CD86, B7-2, CTLA-4 CD28, Inducible costimulatory molecule (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, Inducible costimulatory molecule ligand (ICOSL), OX40L, HVEM (Herpes Virus Entry Mediator), LIGHT.

70. An extended release pharmaceutical formulation comprising a monovalent anti-CD40L antibody polypeptide.

71. The extended release pharmaceutical formulation of claim 70, wherein said antibody polypeptide is selected from the group consisting of a dAb, Fab, scFv, Fv, or a disulfide bonded Fv

72. The formulation of claim 70 wherein said monovalent anti-CD40L antibody polypeptide comprises a single immunoglobulin variable domain that binds CD40L.

73. An antibody single variable domain polypeptide that binds to CD40L, said polypeptide comprising the sequence of DOM8-24.

74. An antibody single variable domain polypeptide that binds to CD40L, wherein the polypeptide has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of DOM8-24, or differs from the amino acid sequence of DOM8-24 at no more than 25 amino acid positions and has a sequence that is at least 80% homologous to the sequence of DOM8-24.

75. An antibody single variable domain polypeptide that binds to CD40L, wherein the polypeptide has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of DOM8-24, or differs from the amino acid sequence of DOM8-24 at no more than 25 amino acid positions and has a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of DOM8-24

76. An antibody single variable domain polypeptide that binds to CD40L, wherein the polypeptide has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of DOM8-24, or differs from the amino acid sequence of DOM8-24 at no more than 25 amino acid positions and has a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of DOM8-24.

77. An antibody single variable domain polypeptide that binds CD40L, wherein the polypeptide has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of DOM8-24, or differs from the amino acid sequence of DOM8-24 at no more than 25 amino acid positions and has a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of DOM8-24.

78 An antibody single variable domain polypeptide that binds CD40L, wherein the dAb has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of DOM8-24, or differs from the amino acid sequence of DOM8-24 at no more than 25 amino acid positions and has a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of DOM8-24 and has a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of DOM8-24 .

79 An antibody single variable domain polypeptide that binds CD40L, wherein the dAb has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of DOM8-24, or differs from the amino acid sequence of DOM8-24 at no more than 25 amino acid positions and has a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of DOM8-24 and has a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of DOM8-24

80. An antibody single variable domain polypeptide that binds CD40L, wherein the dAb has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of DOM8-24, or differs from the amino acid sequence of DOM8-24 at no more than 25 amino acid positions and has a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of DOM8-24 and has a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of DOM8-24 .

81. An antibody single variable domain polypeptide that binds CD40L, wherein the dAb has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of DOM8-24, or differs from the amino acid sequence of DOM8-24 at no more than 25 amino acid positions and has a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of DOM8-24 and has a CDR2

sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of DOM8-24 and has a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of DOM8-24.

82 A CD40L antagonist having a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of DOM8-24.

83. A CD40L antagonist having a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of DOM8-24.

84. A CD40L antagonist having a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of DOM8-24.

85. A CD40L antagonist having a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of DOM8-24 and a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of DOM8-24.

86. A CD40L antagonist having a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of DOM8-24 and a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of DOM8-24.

87. A CD40L antagonist having a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of DOM8-24 and a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of DOM8-24.

88. A CD40L antagonist having a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of DOM8-24 and a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of DOM8-24 and a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of DOM8-24.

89. The CD40L antagonist of claim 88, wherein said antagonist is an antibody single variable domain polypeptide selected from the group consisting of an antibody single variable domain polypeptide, dAb, FAb, an scFv, an Fv, or a disulfide-bonded Fv.

90. An antibody polypeptide that inhibits the binding of DOM8-24 to CD40L.

91. An antibody polypeptide that binds to the same epitope of CD40L bound by DOM8-24.

92. A method of treating or preventing a symptom of autoimmune disease in an individual, the method comprising administering the antibody polypeptide of claim 90 or 91 to said individual in an amount effective to treat or prevent a symptom of autoimmune disease.

93. An antibody polypeptide that binds to the same epitope of CD40L bound by an antibody single variable domain polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos: 7-82 and 246-360.

94. An antibody single variable domain polypeptide comprising the sequence of CDR1, CDR2, and/or CDR3 of DOM8-24.

95. An antibody single variable domain polypeptide comprising the sequence of CDR1, CDR2, and/or CDR3 of an antibody single variable domain polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 7-82 and 246-360.

96. The antibody single variable domain polypeptide of claim 94, wherein said polypeptide comprises the sequence of two or more of CDR1, CDR2, or CDR3 of DOM8-24.

97. The antibody single variable domain polypeptide of claim 95, wherein said polypeptide comprises the sequence of two or more of CDR1, CDR2, or CDR3 of an antibody single variable domain polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 7-82 and 246-360.

98. A dual specific ligand comprising a first immunoglobulin single variable domain having a binding specificity to a first antigen and a second single variable domain having a binding activity to a second antigen, wherein the first antigen is CD40L and the second single variable domain is an Antigen Presenting Cell surface antigen or a T cell surface antigen.

99. A ligand according to claim 98 wherein the Antigen Presenting Cell surface antigen is selected from one of the group consisting of, activated macrophage surface antigens, activated B cell surface antigens, co-stimulatory signal pathway surface antigens, and MHC.

100. A ligand according to claim 99 wherein the MHC is class II.

101. A ligand according to claim 100 wherein the MHC class II is alpha.

102. A ligand according to claim 100 wherein the MHC class II is beta.

103. A ligand according to claim 99 wherein the Antigen Presenting Cell surface antigen is selected from the group consisting of CD28, Inducible costimulatory molecule (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, Inducible costimulatory molecule ligand (ICOSL), OX40L, CD80, CD86, HVEM (Herpes Virus Entry Mediator), and LIGHT.

104. A ligand according to claim 99 wherein the Antigen Presenting Cell surface antigen is selected from the group consisting of CD28, Inducible costimulatory molecule (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, and CD3

105. A ligand according to claim 99 wherein the surface antigen is a B7 gene surface antigen.

106. A ligand according to claim 105 wherein the B7 gene surface antigen is B7- 2, or B7-1.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para: ver forma PCT/ISA/220	**PCT** **OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43*bis*.1)**

	Fecha de envío por correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda página)
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220	**PARA FUTURAS ACCIONES** Ver el párrafo 2 a continuación

Solicitud Internacional No	Fecha de registro internacional (día/mes/año)	Fecha de prioridad (día/mes/año)
PCT/GB2005/003562	16.09 2005	17 09.2004

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC
C07K16/28, A61K39/395, A61P37/06

Solicitante
DOMANTIS LIMITED

1 Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems.

- ☒ Casilla No I Bases del Reporte
- ☒ Casilla No II Prioridad
- ☒ Casilla No III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial
- ☐ Casilla No IV Falta de unidad de invención
- ☒ Casilla No V Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43*bis* 1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial, citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación
- ☐ Casilla No VI Ciertos documentos citados
- ☐ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional
- ☐ Casilla No VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

2 **ACCIONES FUTURAS**

Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA") Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66 1*bis*(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad Examinadora Preliminar

Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde

Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220

3 Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220

Nombre y dirección de correo de ISA	Funcionario Autorizado
Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel (+49-89) 2399 – 0, Tx 523656 epmu d Fax. (+49- 89) 2399- 4465	Wagner, R Teléfono No. +49 89 2399-7357

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No PCT/GB2005/003562

Casilla No. I. Bases de la opinión

1 Respecto al **idioma**, esta opinión ha sido establecida con base en.

☐ Esta opinión se ha establecido según una traducción del idioma original al siguiente idioma, que es el idioma de una traducción proporcionada para la búsqueda internacional (bajo las Reglas 12 3 y 23 1(b))

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

a tipo de material

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

b formato de material.

☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c tiempo de presentación/suministro·

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

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

4 Comentarios adicionales.

Casilla No. II Prioridad

1 ☒ No se ha considerado la validez de la reivindicación de la prioridad porque la Autoridad de Búsqueda Internacional no tiene una copia de la solicitud anterior cuya prioridad se ha reivindicado o, cuando sea necesario, una traducción de esa solicitud anterior Sin embargo, esta opinión se ha establecido con base en el hecho de que la fecha relevante (Reglas 43*bis* 1 y 64..1). es la fecha de la prioridad reivindicada

2. ☐ Esta opinión se ha establecido como si ninguna prioridad se hubiese reivindicado debido al hecho de que se ha encontrado que la reivindicación de la prioridad no es válida (Reglas 43*bis*.1 y 64..1) Por consiguiente, para los propósitos de esta opinión, se considera que la fecha de la presentación internacional indicada anteriormente es la fecha relevante

3 Observaciones adicionales, si es necesario

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No. **PCT/GB2005/003562**

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

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

☐ toda la solicitud internacional,

☒ reivindicaciones Nos 1 - 20 respecto a la aplicabilidad industrial, 95 y 97 ambas en parte

porque

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos 1-20 se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):
ver hoja separada

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*):

☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa

☒ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos 95 y 97 ambas en parte

☐ El nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida no cumple con el estándar proporcionado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que

la forma escrita	☐ no se ha proporcionado
	☐ no cumple con el estándar
el formato legible por computador	☐ no se ha proporcionado
	☐ no cumple con el estándar

☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-*bis* de las Instrucciones Administrativas

☐ Ver la hoja separada para más detalles

Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Articulo 43bis.1 (a) (i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1 Afirmación

Novedad (N)	Sí	Reivindicaciones	7, 8, 10-20, 22-26, 28-43, 45-89, 94, 95 en parte, 96, 97, en parte, 98-106
	No	Reivindicaciones	1-6, 9, 21, 27, 44, 90-93
Nivel inventivo (IS)	Si	Reivindicaciones	
	No	Reivindicaciones	1-94, 95 en parte, 96, 97 en parte, 98-106
Aplicabilidad industrial (IA)	Si	Reivindicaciones	21-106
	No	Reivindicaciones	

2 Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

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

Solicitud Internacional No. PCT/GB2005/003562

Re Item III

No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

1. Las reivindicaciones 95 y 97 están dirigidas a un anticuerpo de dominio sencillo definido por una o más CDRs de las CDRs 573 de los 191 anticuerpos de dominio sencillo identificados por su listado de secuencia. Estos anticuerpos de dominio sencillo no están limitados por ninguna característica estructural común ni ninguna característica funcional común porque la solicitud no provee ninguna base para la hipótesis que una o dos CDRs son suficientes para inducir un efecto técnico (p.e., enlace específico a un objetivo definido). La definición de anticuerpos de dominio sencillo por 570 CDRs y todas las posibles combinaciones de los mismos no es clara hasta el punto que la presentación de la reivindicación confunde la materia objeto para la cual se busca protección. Basados en los datos experimentales con relación al efecto técnico de inhibición del enlace de CD40L a CD40, están dados en la descripción solamente para los anticuerpos de dominio sencillo listados en la Tabla 7. En consecuencia, la reivindicación 95, 97 fue buscada solamente para las CDRs de anticuerpos de dominio sencillo listados en la Tabla 7 en la página 142. Solamente la materia objeto que ha sido buscada es examinada en la presente opinión de búsqueda. (Regla 66.1 (e) PCT).

2. Las reivindicaciones 1-20 se relacionan con la materia objeto considerada por esta autoridad como cubierta por las provisiones de la Regla 67.1 (iv) PCT En consecuencia, no se formulará opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 64 (4)(a)(I) PCT).

Re Item V:

Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que soportan tal declaración

1 Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: US-A-5 869 049 (NOELLE EL AL) Febrero 9 de 1999 (1999-02-09)

D2: WO 01/68860 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS-ERFINDUNGEN; DI PADOVA, FRANCO, E; SCHULLER, WALT) Septiembre 20 de 2001 (2001-09-20)

D3: BRAMS PETER ET AL: "A humanized anti-human CD154 monoclonal antibody blocks CD154-CD40 mediated human B cell activation" (Un anticuerpo monoclonal CD154 anti-humano humanizado bloquea la activación de célula B humana mediada por CD154-CD40) IMMUNOPHARMACOLOGY, vol. 1, no. 2, Febrero 2001 (2001-02), páginas 277-294, XP002355661 ISSN: 1567-5769.

D4. WO 99/00143 A (BIOGEN, INC; THOMAS, DAVID, W) Enero 7 de 1999 (1999-01-07)

D5: WO 02/18445 A (BIOGEN, INC; KARPUSAS, MICHAEL; HSU, YEN-MING; TAYLOS, FREDERIK, R; Z) Marzo 7 de 2002 (2002-03-07)

D6: MUYLDERMANS S ET AL: "Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains" (Reconocimiento de antígenos mediante fragmentos de anticuerpo de domino sencillo: el lujo supérfluo de dominios pares) TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARDS, GB, vol. 26, no. 4, Abril 1 de 2001 (2001-04-01), páginas 230-235, XP004241851 ISSN: 0968-0004

D7: HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" (Anticuerpos de dominio: proteínas para terapia) TRENDS ON BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB., vol. 21, no. 11, Noviembre de 2003 (2003-11), páginas 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799

D8: WO 2004/058822 A (DOMANTIS LIMITED; WINRWE, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA) Julio 15 de 2004 (2004-07-15)

D9: WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINRWE, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA) Enero 8 de 2004 (2004-01-08)

D10: WO 2004/058821 A (DOMANTIS LIMITED; WINRWE, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA) Julio 15 de 2004 (2004-07-15)

2. Todas las reivindicaciones están relacionadas con polipéptidos de anticuerpo, que son monovalentes para el enlace a CD40L (CD154) y que son antagonistas para la actividad de CD40.

La técnica previa revela varios anticuerpos y fragmentos monovalentes de los mismos, que se enlazan a CD40L y que son antagonistas para la actividad de CD40.

D1 revela un anticuerpo depositado llamado MR1 dirigido contra gp39=CD40L (col. 24), que es un antagonista de gp39 (col. 5, línea 15-25). D1 revela también que se pueden producir los fragmentos Fab' (que son monovalentes). D1 revela en la col. 3 que el

anticuerpo se puede usar para prevenir el rechazo de trasplante. Por lo tanto, D1 anticipa las reivindicaciones 1-6, 21.

D2 revela un anticuerpo anti-CD154, que es llamado ABI793. Dicho anticuerpo antagoniza el enlace de CD154 a CD40 y tiene un IC50 de 75 ng/ml. D2 revela el tratamiento de un número de enfermedades inmunes como uso médico (paginas 15, 16). ABI793 enlaza a un epítopo diferente a los anticuerpos anti-CD154 conocidos 5c8 y 24-31 (ejemplo 3) D2 revela en la página 2, línea 5 que la molécula de enlace anti-CD154 puede ser un dominio variable de cadena pesada sencillo. Por lo tanto D2 anticipa la materia objeto de las reivindicaciones 1-6, 9, 21, 44 (Artículo 33(2) PCT)

D3 revela un fragmento Fab'1 de un anticuerpo anti-CD154 humanizado llamado Idec-131. Dicho anticuerpo bloquea el enlace de CD154 a CD40 (ver resumen) e inhibe la diferenciación de célula B dependiente de célula T. D3 declara que el fragmento Fab'1, que es monovalente, tiene una actividad biológica equivalente a la del anticuerpo entero (ver también la figura 8). En la página 285, D3 revela que el Idec-131 tiene un IC50 de 1 □g/ml, que corresponde a aproximadamente 20 nM para el Fab. Así, D3 anticipa la materia objeto de las reivindicaciones 1-6, 21 (Artículo 33(2) PCT).

D4 revela el anticuerpo anti-CD154 llamado 5c8. Dicho anticuerpo bloquea el enlace de CD40:CD154 (página 8, líneas 5-10; página 13, líneas 1-2) y se propone para el tratamiento de enfermedades inmunes (página 12). D4 indica que los agentes bloqueadores de CD154 pueden ser fragmentos Fab de anticuerpos. El fragmento Fab de 5c8 está revelado en D5 y mostró enlace a un epítopo tridimensional de CD154 (página 18, líneas 4-8). Así, D4 anticipa la materia objeto de las reivindicaciones 1-6, 21 (página 33(2) PCT).

La reivindicación independiente 27 está dirigida a un péptido anticuerpo, que se enlaza monovalentemente a CD40L y que no incluye un cierto grado de agregación de plaqueta. De acuerdo con la descripción (páginas 72-73), los polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L bivalentes tienden a agregar plaquetas mientras que los anti-CD40L monovalentes no inducen la agregación de plaquetas. La presente solicitud no prevee ningún dato experimental para soportar esta declaración Como D1-D4 revelan fragmentos de anticuerpo monovalentes, ellos anticipan inherentemente la materia objeto de la reivindicación 27 (Artículo 33(2) PCT)

Las reivindicaciones 90 y 91 están dirigidas anticuerpos, que inhiben el enlace del anticuerpo de dominio sencillo DOM8-24, o que se enlazan al mismo epítopo que DOM8-24. La presente solicitud no define el epítopo de enlace. La técnica previa revela un número de anticuerpos anti-CD40L para el tratamiento de enfermedades autoinmunes que inhiben el enlace de CD40L a CD40. Como el espacio de enlace disponible que induce la inhibición de enlace a CD40 es limitado y como los anticuerpos de la técnica previa ya enlazan al menos dos epítopos diferentes (ver ejemplo 3 de D2), la materia objeto de las reivindicaciones 90-93 no se considera novedosa (Artículo 33(2) PCT) porque la presente solicitud no muestra que DOM8-24 enlaza dos epítopos diferentes que los anticuerpos de la técnica previa.

La Reivindicación 43 está dirigida a un anticuerpo, que se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L, y que está caracterizado además por tener una secuencia de amino ácido que tiene al menos 85% de identidad con un gran número de secuencias correspondientes a anticuerpos de dominio sencillo. Se puede considerar que la materia objeto de dicha reivindicación es nueva (Artículo 33(2) PCT). La producción de anticuerpos contra un objetivo conocido (p.e., CD40L) no involucra un nivel inventivo y no se puede atribuir efecto técnico adicional a las limitaciones estructurales de la reivindicación 43. Así, la reivindicación 43 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT).

Las reivindicaciones 62,63 están dirigidas a anticuerpos de dominio sencillo, que se enlazan específicamente y monovalentemente a CD40L y que están caracterizados además por una secuencia de amino ácido a ser seleccionada entre 191 secuencias. La materia objeto de las reivindicaciones 62 y 63 se puede considerar nueva (Artículo 33(2) PCT), pero la provisión de anticuerpos de dominio sencillo contra el objeto CD40L conocido no involucra in nivel inventivo por las siguientes razones: D2 sugiere la producción de anticuerpos de dominio sencillo contra CD40L (ver anteriormente) y los métodos para producir anticuerpos de dominio sencillo son bien conocidos en la técnica (ver, e.g., D6-D9). No se puede atribuir efecto técnico adicional a ninguna de las 191 secuencias, por lo tanto, la materia objeto de las reivindicaciones 62 y 63 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT).

La reivindicación independiente 70 está dirigida a una formulación farmacéutica de liberación prolongada que comprende un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente. La materia objeto de la reivindicación 70 es novedosa (Artículo 33(2) PCT). El anti-CD40L monovalente está revelado en

la forma de un anticuerpo de dominio sencillo en D2 (ver anterior). D2 revela el uso médico de CD40L y por lo tanto, la provisión de una forma de liberación prolongada, que es práctica estándar en el campo farmacéutico, no requiere habilidades inventivas y por lo tanto, la materia objeto de la reivindicación 70 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT). Las características adicionales de las reivindicaciones dependientes 71 y 72 son inherentemente parte de la revelación de D2, y entones, no confieren un nivel inventivo en la materia objeto (Artículo 33(3) PCT).

La reivindicación 73 está dirigida a un polipéptido de dominio variable sencillo que se enlaza a CD40L, caracterizado por la Seq. Id. No. 26 (que parece corresponder con DOM8-24). Los datos experimentales de la tabla 7 en las páginas 142 y 143 muestran que dicho anticuerpo tiene un IC50 de 0.417 nM. El IC50 del anticuerpo total anti-CD40L IDEC-131 de la técnica previa está en 1 □g/ml para el anticuerpo total, (D3, página 285), que correspondería a aproximadamente 7 nM para el fragmento Fab. D3 afirma que el fragmento Fab tiene una potencia similar que el anticuerpo total (página 286). D2 (página 13) revela que el anticuerpo ABI793, tiene un IC50 de aproximadamente75 ng/ml. D2 revela también que se pueden producir los fragmentos Fab y los anticuerpos de cadena sencilla. Un fragmento Fab tendría un IC50 de aproximadamente 5 nM, debido al menor peso molecular. Como un anticuerpo de dominio sencillo con una potencia equivalente que tiene solamente aproximadamente un cuarto del peso molecular de un fragmento Fab, se puede esperar que el IC50 de un anticuerpo de dominio sencillo equivalente es aproximadamente 1-2 nM. D2 sugiere la producción de anticuerpos de dominio sencillo, y las técnicas para producir anticuerpos de dominio sencillo son bien conocidas en la técnica (ver D6-D9). La provisión de anticuerpos de dominio sencillo con un IC50 que es equivalente al IC50 para anticuerpos totales, teniendo en cuenta el menor peso molecular de los anticuerpos de dominio sencillo, no requiere una habilidad inventiva. Por lo tanto, la materia objeto de la reivindicación 73 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT).

Las reivindicaciones 74-89 están todas dirigidas a anticuerpos de dominio sencillo o antagonistas de CD40L que se enlazan a CD40L y que tienen cierto grado de identidad de secuencia con DOM8-24. La materia objeto de dichas reivindicaciones puede considerarse nuevo (Artículo 33 (2) PCT). Como la producción de anticuerpos de dominio sencillo o anticuerpos contra un objetivo bien conocido no involucra habilidades inventivas (ver D6-D9), y como no se puede correlacionar un efecto técnico

sorprendente con la identidad estructural parcial con el anticuerpo no inventivo DOM8-24, la materia objeto de las reivindicaciones 74-89 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT).

La materia objeto de las reivindicaciones 94 y 95 es nueva (Artículo 33(2) PCT) porque la técnica previa no revela anticuerpos de dominio sencillo que comprenden una de las CDRs de DOM8-24. Como no se mostró que ningún efecto técnico estuviera asociado con ninguna de las CDRs solas o un par de CDRs, no se reconoce nivel inventivo para la materia objeto de la reivindicación 94 (Artículo 33(39 PCT).

La materia objeto de las reivindicaciones 95 y 97 (hasta donde se buscó, ver item III-1) es novedosa (Artículo 33(2) PCT), porque la técnica previa disponible no revela anticuerpos de dominio sencillo que comprenden una de las CDRs. Como no se mostró que ningún efecto técnico estuviera asociado con ninguna de las CDRs solas o un par de CDRs, no se reconoce nivel inventivo para la materia objeto de las reivindicaciones 95, 97 (Artículo 33(3) PCT).

La reivindicación 98 está dirigida a un ligando biespecífico que comprende un primer dominio variable sencillo que se enlaza a CD40L y un segundo dominio variable sencillo que se enlaza a un antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno, o un antígeno de superficie de célula T. D2 revela un anticuerpo de dominio sencillo contra CD40L (página 2, líneas 5-7), que se combinará con anticuerpos que afectan la inmunomodulación y que está dirigido contra MHC, CD28, CTLA4 (página 17). La diferencia entre D2 y la reivindicación 98 se basa en el hecho que en D2 los anticuerpos son administrados como anticuerpos aislados, mientras que en la reivindicación 98, estos son parte de una construcción biespecífica. El problema técnico a ser resuelto es la provisión de un método alternativo para administrar el anticuerpo anti-CD40L con otros anticuerpos inmunosupresores. La administración en la forma de un anticuerpo de dominio sencillo biespecífico es una alternativa obvia en vista de D10, que revela cómo producir anticuerpos de dominio sencillo biespecíficos y que demuestra que mantienen sus propiedades de enlace Por lo tanto, la materia objeto de la reivindicación 98 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT). Las características adicionales de las reivindicaciones dependientes 99-106 no parecen ser responsables de ningún efecto sorprendente y por ende, no confieren un nivel inventivo a la materia objeto de dichas reivindicaciones (Artículo 33(3) PCT)

Las reivindicaciones dependientes 7 y 8 no son anticipadas por la técnica previa disponible, sin embargo, la

limitación por las características estructurales del anticuerpo de dominio no confieren un nivel inventivo del método (Artículo 33(3) PCT).

La reivindicación dependiente 9 restringe además el polipéptido de anticuerpo mediante un amplio rango de concentraciones de IC50, que cubre los IC50 de los anticuerpos de la técnica previa (ver D2). Dicha característica adicional no confiere un nivel inventivo a la materia objeto de la reivindicación 9. Las reivindicaciones dependientes 10-19 se refieren a un aumento de vida media en suero del polipéptido-anticuerpo anti-CD40L mediante el enlace del mismo a PEG y no están reveladas en la técnica previa. Como PEG está revelado en la página 488 de D7 para alcanzar exactamente el mismo efecto en los anticuerpos de dominio sencillo, la materia objeto de las reivindicaciones 10-19 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT). El mismo razonamiento aplica para la reivindicación independiente 52 y para las reivindicaciones dependientes 28-37, 53-61.

Parece que las características adicionales de las nuevas reivindicaciones dependientes 20, 22-26, 38-42, 45-51, 64-69, cuando se consideran solas o en combinación, no generan ningún efecto sorprendente que podría servir como una base para un razonamiento de nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT).

Observaciones Adicionales:

3 Las reivindicaciones que se refieren a DOM8-24 no son claras (Artículo 6 PCT), porque DOM8-24 es una denominación interna, que no es generalmente aceptada en el campo. El anticuerpo de dominio sencillo DOM8-24 debe haber sido identificado por su secuencia. Parece que DOM8-24 corresponde al DOM24 identificado por la Seq Id. No. 26.

4. Para la evaluación de las reivindicaciones presentes 1-20 sobre la pregunta si son aplicables industrialmente, no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes de PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero pueden permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para primer uso en tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

5. El orden de las reivindicaciones 95 y 96 deben haber sido invertidas para evitar una falta de claridad

(Artículo 6 PCT). La reivindicación 96 no depende de la reivindicación 95 sino de la reivindicación 94.

Re Item VI
Ciertos documentos citados

Como el documento de prioridad para la presente solicitud no está disponible al momento del examen preliminar, se considera que dicha prioridad es válida. Por lo tanto, el documento publicado (Regla 70.10)

Solicitud No. Patente No.	Fecha de publicación (día/mes/año)	Fecha de radicación (día/mes/año)	Fecha de prioridad (día/mes/año)
WO05/035572	21.04.2005	08.10.2004	08.10.2003

no se considera como parte de la técnica previa (Regla 64.1 PCT). Sin embargo, este documento puede ser de importancia con respecto a la novedad en una fase nacional/regional posterior.

Sr case Dcmbc P33917cc Domantis

63

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis* 1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/GB2005/003562	16 09.2005	17.09 2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C07K16/28, A61K39/395, A61P37/06

Applicant
DOMANTIS LIMITED

1 This opinion contains indications relating to the following items

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

2 **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66 1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered

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

For further options, see Form PCT/ISA/220

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

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office
D-80298 Munich
Tel +49 89 2399 - 0 Tx 523656 epmu d
Fax +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Wagner, R

Telephone No +49 89 2399-7357

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No
PCT/GB2005/003562

Box No. I Basis of the opinion

1 With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item

☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12 3 and 23 1(b))

2 With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of

a type of material

☒ a sequence listing

☐ table(s) related to the sequence listing

b format of material

☒ in written format

☒ in computer readable form

c time of filing/furnishing

☒ contained in the international application as filed

☒ filed together with the international application in computer readable form

☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

3 ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished

4 Additional comments

Box No. II Priority

1 ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis* 1 and 64 1) is the claimed priority date

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis* 1 and 64 1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3 Additional observations, if necessary

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No
PCT/GB2005/003562

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

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

☐ the entire international application,

☒ claims Nos 1-20 regarding industrial applicability, 95 and 97 both in part

because

☒ the said international application, or the said claims Nos 1-20 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination *(specify)*

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*

☐ the claims, or said claims Nos are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos 95,97 both in part

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that

the written form
☐ has not been furnished
☐ does not comply with the standard

the computer readable form
☐ has not been furnished
☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions

☐ See separate sheet for further details

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No
PCT/GB2005/003562

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

1 Statement

Novelty (N)	Yes	Claims	7,8,10-20,22-26,28-43,45-89,94,95 in part, 96, 97 in part, 98-106
	No	Claims	1-6,9,21,27,44,90-93
Inventive step (IS)	Yes	Claims	
	No	Claims	1- 94, 95 in part, 96, 97 in part, 98-106
Industrial applicability (IA)	Yes	Claims	21-106
	No	Claims	

2 Citations and explanations

see separate sheet

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No
PCT/GB2005/003562

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1 Claim 95 and 97 are directed to a single domain antibody defined by one or more CDRs from the 573 CDRs of the 191 single domain antibodies identified by their sequence listing. These single domain antibodies are neither limited by any common structural feature nor by any common functional feature because the application does not provide any basis for the hypothesis that one or two CDRs are sufficient for inducing a technical effect (e.g. specific binding to a defined target) The definition of single domain antibodies by 570 CDRs and all the possible combinations thereof is unclear to the extent that the presentation of the claim obscures the subject-matter for which protection is sought Founded experimental data in relation with the technical effect of inhibition of Cd40L binding to CD40 is given in the description only for the single domain antibodies listed in Table 7. Consequently claim 95, 97 were searched only for the CDRs of the single domain antibodies listed in table 7 on page 142. Only the subject-matter which has been searched is examined in the present search opinion (Rule 66 1 (e) PCT)

2. Claims 1-20 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Reference is made to the following documents:
D1: US-A-5 869 049 (NOELLE ET AL) 9 February 1999 (1999-02-09)

D2. WO 01/68860 A (NOVARTIS AG, NOVARTIS-ERFINDUNGEN; DI PADOVA, FRANCO, E, SCHULER, WALT) 20 September 2001 (2001-09-20)

D3 BRAMS PETER ET AL. "A humanized anti-human CD154 monoclonal antibody blocks CD154-CD40 mediated human B cell activation" INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, vol. 1, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 277-294, XP002355661 ISSN· 1567-5769

D4 WO 99/00143 A (BIOGEN, INC. THOMAS, DAVID, W) 7 January 1999 (1999-01-07)

D5: WO 02/18445 A (BIOGEN, INC, KARPUSAS, MICHAEL; HSU, YEN-MING; TAYLOR, FREDERICK, R; Z) 7 March 2002 (2002-03-07)

D6 MUYLDERMANS S ET AL "Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARDS, GB, vol. 26, no. 4, 1 April 2001 (2001-04-01), pages 230-235, XP004241851 ISSN: 0968-0004 ·

D7: HOLT L J ET AL: "Domain antibodies· proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 484-490, XP004467495 ISSN. 0167-7799

D8: WO 2004/058822 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA) 15 July 2004 (2004-07-15)

D9: WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG, TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA, HOLT) 8 January 2004 (2004-01-08)

D10: WO 2004/058821 A (DOMANTIS LIMITED, WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN, IGNATOVICH, OLGA; WOOL) 15 July 2004 (2004-07-15)

2. All claims are related to antibody polypeptides, which are monovalent for binding to CD40L (CD154) and which are antagonists for the activity of CD40.

The prior art discloses several antibodies and monovalent fragments thereof, which bind to CD40L and which are antagonists for the activity of CD40.

D1 discloses a deposited antibody called MR1 directed against gp39=CD40L (col. 24), which is an gp39 antagonist (col 5, line 15-25). D1 discloses also that Fab' fragments (which are monovalent) can be produced D1 discloses in col. 3 that the

antibody can be used to prevent transplant rejection. Therefore D1 anticipates claims 1-6, 21.

D2 discloses an anti-CD154 antibody, which is called ABI793. Said antibody antagonises the binding of CD154 to CD40 and has an IC50 of 75 ng/ml D2 discloses the treatment of a number of autoimmune diseases as medical use (pages 15,16) ABI793 binds a different epitope than the known anti-CD154 antibodies 5c8 and 24-31 (example 3) D2 discloses on page 2, line 5 that the anti-CD154 binding molecule can be a single heavy chain variable domain. Therefore D2 anticipates the subject-matter of claims 1-6,9, 21,44 (Article 33(2) PCT)

D3 discloses a Fab'1 fragment of a humanized anti-CD154 antibody called Idec-131. Said antibody blocks binding of CD154 to CD40 (see abstract) and inhibits T-cell dependent B cell differentiation. D3 states that the Fab'1 fragment, which is monovalent has an equivalent biological activity to that of the whole antibody (see also figure 8). On page 285 D3 discloses that the Idec-131 has an IC50 of 1 µg/ml, which corresponds to approximately 20nM for the Fab Thus D3 anticipates the subject-matter of claims 1-6,21 (Article 33(2) PCT).

D4 discloses the anti-CD154 antibody called 5c8. Said antibody blocks the binding of CD40:CD154 (page 8, line 5-10; page 13, lines 1-2) and is proposed for the treatment of autoimmune diseases (page 12) D4 indicates that the CD154 blocking agents can be Fab fragments of antibodies. The Fab-fragment of 5c8 is disclosed in D5 and was shown to binds to a three dimensional epitope of CD154 (page 18, lines 4-8). Thus D4 anticipates the subject-matter of claims 1-6, 21 (Article 33(2) PCT)

Independent claim 27 is directed to an antibody peptide, which monovalently binds to CD40L and which does not induce a certain degree of platelet aggregation. According to the description (pages 72-73), bivalent anti-CD40L tend to aggregate platelets whereas monovalent anti-CD40L antibody polypeptides do not induce platelet aggregation The present application does not provide any experimental data to support this statement. As D1-D4 disclose monovalent antibody fragments, they inherently anticipate the subject-matter of claim 27 (Article 33(2) PCT).

Claims 90 and 91 are directed to antibodies, which inhibit the binding of the single domain antibody DOM8-24 or which bind to the same epitope as DOM8-24. The present application does not define the binding epitope The prior art discloses a number of anti-CD40L antibodies for the treatment of autoimmune diseases which inhibit the binding of CD40L to CD40. As the available binding space inducing an inhibition of binding to CD40 is limited and as the prior art antibodies bind already to at least two different epitopes (see example 3 of D2), the subject-matter of claims 90-93 is considered as being not novel (Article 33(2) PCT) because the present application does not show that DOM8-24 binds to different epitopes than the prior art antibodies.

Claim 43 is directed to an antibody, which specifically and monovalently binds CD40L, and which is further characterised by having an amino acid sequence having at least 85 % identity with a large number of sequences corresponding to single domain antibodies. The subject-matter of said claim can be considered to be new (Article 33(2) PCT). The production of antibodies against a known target (i.e. CD40L) does not involve an inventive step and no further technical effect can be attributed to the structural limitations of claim 43. Thus, claim 43 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

Claims 62, 63 are directed to single domain antibodies, which specifically and monovalently bind to CD40L and which are further characterised by an amino acid sequence to be selected among 191 sequences. The subject-matter of claims 62 and 63 can be considered as new (Article 33(2) PCT), but the provision of single domain antibodies against the known target CD40L does not involve an inventive step for the following reasons. D2 suggests the production of single domain antibodies against CD40L (see above) and the methods for producing single domain antibodies are well known in the art (see e.g. D6-D9). No additional technical effect can be attributed to all of the 191 sequences, therefore the subject-matter of claims 62 and 63 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT)

Independent claim 70 is directed to an extended release pharmaceutical formulation comprising a monovalent anti-CD40L antibody polypeptide. The subject-matter of claim 70 is novel (Article 33(2) PCT). The monovalent anti-CD40L is disclosed in the

form of a single domain antibody in D2 (see above). D2 discloses the medical use of CD40L and therefore the provision of an extended release form, which is standard practice in the pharmaceutical field does not require inventive skills and thus the subject-matter of claim 70 doe not involve an inventive step (Article 33(3) PCT) The additional features of dependent claims 71 and 72 are inherently part of the disclosure of D2 and thus do not confer an inventive step on the subject-matter (Article 33(3) PCT)

Claim 73 is directed to a single variable domain polypeptide binding to CD40L, characterised by Seq. Id No. 26 (which appears to correspond to DOM8-24) The experimental data in table 7 on pages 142 and 143 show that said antibody has an IC50 of 0 417 nM. The IC50 of the prior art anti-CD40L full antibody IDEC-131 is at 1 µg/ml for the complete antibody, (D3, page 285), which would correspond to approximately 7 nM for the Fab fragment. D3 states that the Fab-fragment has a similar potency than the full antibody (page 286). D2 (page 13) discloses that the antibody ABI793, has an IC50 of approximately 75 ng/ml. D2 discloses also that Fab fragments and single domain antibodies can be produced. A Fab fragment would have an IC50 of approximately 5 nM, due to the smaller molecular weight As a single domain antibody with an equivalent potency having only approximately a quarter of the molecular weight of an Fab-fragment it can be expected that the IC50 of an equivalent single domain antibody lies around 1-2 nM. D2 suggests the production of single domain antibodies and the techniques for producing single domain antibodies are well known in the art (see D6-D9). The provision of single domain antibodies with an IC50 which is equivalent to the IC50 for full antibodies, taking into account the smaller molecular weight of the single domain antibodies, does not require an inventive skill. Therefore the subject-matter of claim 73 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT)

Claims 74-89 are all directed to single domain antibodies or CD40L antagonists binding to CD40L and having a certain degree of sequence identity with DOM8-24. The subject-matter of said claims can be considered as new (Article 33(2) PCT). As the production of single domain antibodies or antibodies against a well known target does not involve inventive skills (see D6-D9) and as no surprising technical effect can

be correlated with the partial structural identity with the non-inventive antibody DOM8-24, the subject-matter of claims 74-89 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

The subject-matter of claims 94 and 95 is new (Article 33(2) PCT) because the prior art does not disclose single domain antibodies comprising one of the CDRs of DOM8-24. As no technical effect was shown to be associated with any of the single CDRs or with a pair of CDRs, an inventive step is not acknowledged for the subject-matter of claim 94 (Article 33(3) PCT).

The subject-matter of claims 95 and 97 (as far as searched, see item III-1) is novel (Article 33(2) PCT) , because the available prior art does not disclose single domain antibodies comprising one of the CDRs. As no technical effect was shown to be associated with any of the single CDRs or with a pair of CDRs, an inventive step is not acknowledged for the subject-matter of claim 95,97 (Article 33(3) PCT).

Claim 98 is directed to a bispecific ligand comprising a first single variable domain binding to CD40L and a second single variable domain binding to an Antigen Presenting Cell surface antigen or a T cell surface antigen D2 discloses a single domain antibody against CD40L (page 2, lines 5-7), which is to be combined with antibodies affecting immunomodulation and which directed against MHC, CD28, CTLA4 (page 17). The difference between D2 and claim 98 lies in the fact that in D2 the antibodies are administered as isolated antibodies, whereas in claim 98 they are part of a bispecific construct. The technical problem to be solved is the provision of an alternative method of administering the anti-CD40L antibody with other immunosuppressive antibodies. The administration in the form of a bispecific single domain antibody is an obvious alternative in view of D10, which discloses how to produce bispecific single domain antibodies and which demonstrates that they keep their binding properties. Therefore the subject-matter of claim 98 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT). The additional features of the dependent claims 99-106 do not appear to be responsible for any surprising effects and thus do not confer an inventive step on the subject-matter of said claims (Article 33(3) PCT)

Dependent claims 7 and 8 are not anticipated by the available prior art, however the

limitation by structural features of the domain antibody does not confer an inventive step on the method (Article 33(3) PCT).
Dependent claim 9 further restricts the antibody polypeptide by a wide range of IC50 concentrations, which cover the IC50s of the antibodies of the prior art (see D2). Said additional feature does not confer an inventive step on the subject-matter of claim 9
Dependent claims 10-19 refer to an increase of the serum half-life of the anti-CD40L antibody-polypeptide by linking it to PEG and are not disclosed in the prior art As PEG is disclosed on page 488 of D7 to achieve exactly the same effect in single domain antibodies, the subject-matter of claims 10-19 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT) The same reasoning applies to independent claim 52 and to dependent claims 28-37, 53-61
It appears that the additional features of the novel dependent claims 20, 22-26, 38-42, 45-51, 64-69 when considered alone or in combination do not generate any surprising effects which could for a basis for an inventive step reasoning (Article 33(3) PCT).

Further Remarks:

3. The claims referring to DOM8-24 are not clear (Article 6 PCT), because DOM8-24 is an internal denomination, which is not generally accepted in the field. The single domain antibody DOM8-24 should have been identified by its sequence. It appears that DOM8-24 corresponds to DOM24 identified by Seq. Id No. 26.

4. For the assessment of the present claims 1-20 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

5 The order of claims 95 and 96 should have been inverted to avoid a lack of clarity

(Article 6 PCT) Claim 96 is not dependent on claim 95 but on claim 94.

Re Item VI
Certain documents cited

As the priority document for the present application is not available at the moment of the preliminary examination, said priority is considered to be valid. Therefore the published document (Rule 70.10)

Application No Patent No	Publication date *(day/month/year)*	Filing date *(day/month/year)*	Priority date *(valid claim)* *(day/month/year)*
WO05/035572	21.04 2005	08 10.2004	08.10.2003

is considered as not being part of the prior art (Rule 64.1 PCT). However this document may be of importance regarding novelty in a subsequent national/regional phase.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)
(PCT Artículc 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente DOMBA/P33817PC	**PARA FUTURAS ACCIONES** Ver Forma PCT/IPEA/416	
Solicitud internacional No PCT/GB2005/003562	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 16.09.2005	Fecha de prioridad (día/mes/año) 17 09 2004

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC
INV C07K16/28 A61K39/395 A61P37/06

Solicitante

DOMANTIS LIMITED

1 Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y trasmitido al solicitante de conformidad con el Artículo 36

2 Este REPORTE consta de un total de 16 hojas, incluyendo esta carátula.

3. Este reporte también es acompañado por ANEXOS, que comprenden:

a ☒ *(enviado al solicitante y a la Oficina Internacional)* un total de _ 1-13 hojas, como sigue

☐ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70 16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas)

☒ hojas que reemplazan hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se presentó, como se indicó en el ítem 4 de la Casilla No 1 y la Casilla Suplementaria

b ☐ *enviado únicamente a la Oficina Internacional)* un total de (indicar tipo y número de medio(s) electrónico(s)) __ , que contienen un listado de secuencias y/o tablas con ello, únicamente en una forma legible en computador, como se indicó en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas).

4 Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems

☒	Casilla No I	Bases del reporte
☒	Casilla No II	Prioridad
☒	Casilla No III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial
☐	Casilla No IV	Falta de unidad de invención
☒	Casilla No V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial, citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación
☒	Casilla No VI	Ciertos documentos citados
☐	Casilla No VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional
☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

Fecha de presentación de la demanda 17 07 2006	Fecha de terminación de este reporte 20 12 2006
Nombre y dirección de correo de la autoridad internacional de examen preliminar Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel (+49-89) 2399-0, Tx 523656 epmu d Fax. (+49-89) 2399-4465	Funcionario autorizado Wagner, René Teléfono No +49 89 2399- 7357

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud Internacional No PCT/GB2005/003562

Casilla No. I Bases del reporte

1 Respecto al **idioma**, este reporte se basó en la solicitud internacional en el idioma en el cual fue presentada, a menos que se indique lo contrario según este ítem

☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual fue presentada

☐ una traducción del idioma original, el cual es el idioma de una traducción suministrada para los propósitos de

☐ búsqueda internacional (según la Regla 12 3 y 23 1 (b))

☐ publicación de la solicitud internacional (según la Regla 12 4)

☐ examen preliminar internacional (según las Reglas 55 2 y/o 55 3)

2 Respecto a los **elementos** de la solicitud internacional este Reporte se basó en (hojas reemplazadas que has sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación según Artículo 14, son referidas en este reporte como "originalmente presentadas" y no son anexadas a este reporte):

Descripción, Páginas

1-288 como se presentaron originalmente

Listados de Secuencias en parte de la descripción, Páginas

1-217 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, No.

105, 106 como se presentaron originalmente
1-104 recibidas el 18 07 2006 con carta de 17.07 2006

Dibujos, Hojas

1/14-14/14 como se presentaron originalmente

☒ listado de secuencia y/o alguna tabla(s) - ver Casilla Suplementaria en relación al Listado de Secuencia

3 ☐ Las modificaciones resultaron en la cancelación de

☐ la descripción, páginas
☐ las reivindicaciones, Nos.
☐ los dibujos, hojas/figuras
☐ listado de secuencia (*especificar*)
☐ cualquier tabla(s) relacionadas con la serie de listados (*especificar*)

4 ☒ Este reporte ha sido establecido como si (alguno de) los anexos corregidos a este reporte y numerado antes no ha sido hecho, desde que ellos han sido considerados a través de la presentación original, como esta indicado en la Casilla Suplementaria (Regla 70.2(c))

☐ la descripción, páginas
☒ las reivindicaciones, Nos 1-12, 13-33, 68-88
☐ los dibujos, hojas/figuras
☐ secuencia que enumera (*especificar*).
☐ alguna tabla(s) relatada al listado de secuencia (*especificar*)

* Si el Item 4 aplica, algunas o todas aquellas hojas pueden ser marcadas "reemplazadas"

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud Internacional No
PCT/GB2005/003562

Casilla No. II Prioridad

1 ☐ Este reporte ha sido establecido como si no se hubiera reclamado prioridad debido a que no se proporcionó en el tiempo límite establecido

☐ la copia solicitada de la solicitud más antigua de la cual se reclama prioridad (Regla 66 7(a))

☐ la traducción solicitada de la solicitud más antigua cuya prioridad ha sido reclamada (Regla 66 7(b))

2 ☐ Este reporte ha sido establecido como si no se hubiera reclamado prioridad debido al hecho de que la reclamación de prioridad ha sido encontrada inválida (Regla 64 1) Debido a esto, para los propósitos de este reporte, la fecha de presentación internacional indicada arriba será considerada como la fecha relevante

3. Observaciones adicionales, si son necesarias

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

1 Las cuestiones de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucrar nivel inventivo (ser no obvia) o ser industrialmente aplicable no han sido examinadas respecto a

☐ toda la solicitud internacional

☒ las reivindicaciones Nos 1-20 (IA), 95 (en parte)

porque

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos 1-20 (IA) se relacionan con la siguiente materia objeto las cuales no requieren examen preliminar internacional (*especificar*)

ver hoja separada

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*):

☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa

☒ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos 95 (en parte)

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

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

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

☐ pagó la tarifa de suministro tardío para el suministro de un listado de secuencia en respuesta a una invitación de acuerdo con las Reglas 13*ter* 1(a) o (b) y 13*ter* 2.

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

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

☐ Ver hoja separada para detalles adicionales

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud Internacional No
PCT/GB2005/003562

Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Articulo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1 Afirmación

Novedad (N)	Si	Reivindicaciones	7-20, 22-26, 28-94, 95 (en parte), 96-104
	No	Reivindicaciones	1-6, 21, 27
Nivel Inventivo (IS)	Si	Reivindicaciones	
	No	Reivindicaciones	1-94, 95 (en parte), 96-104
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si	Reivindicaciones	21-94, 95 (en parte), 96-104
	No.	Reivindicaciones	

2 Citaciones y explicaciones (Regla 70.7)

ver hoja separada

Casilla No. VI Algunos documentos citados

1 Algunos documentos publicados (Reglas 43*bis* 1 y 70 10)
y/o

2 Escritos no revelados (Reglas 43*bis* 1 y 70 9)

ver forma 210

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud internacional No. PCT/GB2005/003562

Casilla Suplementaria con respecto al listado de secuencias

Continuación de la casilla I, Item 2:

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

   a tipo de material

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

   b formato de material

   ☒ en formato escrito
   ☒ en formato legible por computador

   c tiempo de presentación/suministro

   ☒ contenido en la solicitud internacional según se registró
   ☒ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
   ☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda y/o examinación
   ☐ recibida por esta Autoridad como una enmienda* en

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

3. Comentarios adicionales

* si el Item 4 en la casilla No I aplica, el listado y/o tabla(s) relacionados con ello, el cual forma parte de las bases del reporte, pueden ser marcadas "reemplazadas"

Re Item I
Bases del reporte

1. Las modificaciones realizadas introducen nueva materia objeto y no cumplen con los requerimientos del Artículo 34(2)(b) PCT. Las reivindicaciones agregadas 1-12 y reivindicaciones 13-33, 86-88 fueron limitadas además por la introducción de la característica "en donde dicho polipéptido comprende un polipéptido de dominio variable simple". Las bases indicadas por el solicitante no revelan un polipéptido de dominio variable simple en general, sino que siempre se refieren a un dominio variable de inmunoglobulina simple, o a un dominio variable simple de anticuerpo. Esta limitación a inmunoglobulinas o anticuerpos no aparece en la característica introducida en las reivindicaciones. Al omitir la referencia a anticuerpos o inmunoglobulinas se introdujo un alcance intermedio, entre polipéptidos como se reveló en las reivindicaciones originales, dominios variables de inmunoglobulina simple o anticuerpo, como se reveló en la descripción en los pasajes propuestos como una base para las modificaciones, y no se pueden ver bases para esta limitación intermedia en los pasajes propuestos como base por el solicitante.

   Por lo tanto, las reivindicaciones nuevamente introducidas 1-12 no se tienen en cuenta para esta opinión. Lo mismo aplica a las reivindicaciones modificadas 13-33, 86-88. Por no considerarse las reivindicaciones 1-12, la numeración de reivindicaciones corresponde a la numeración de las reivindicaciones originales, excepto para los cambios debidos a la eliminación de reivindicaciones originales 96 y 97. Las reivindicaciones posteriores (98-106) se consideran renumeradas desde 96 a 104.

Re Item II
Prioridad

Parece que la prioridad de la presente solicitud está reivindicada válidamente. Los anticuerpos de dominio simple de la tabla 7 están presentes en el primer documento de prioridad.

Re Item III
No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

2. La reivindicación 95 como se presentó originalmente fue buscada solamente con

respecto a las CDRs de los anticuerpos de dominio simple listados en la Tabla 7 de la página 142. Solamente la materia objeto que ha sido buscada es examinada en el presente reporte preliminar. Aunque se realizaron modificaciones en la reivindicación 95, el examen debe aún estar limitado a la materia objeto buscada solamente.

La objeción surgida contra la reivindicación original 95 fue la siguiente: la Reivindicación 95 está dirigida a un anticuerpo de dominio simple definido por una o más DCRs de las 573 CDRs de los 191 anticuerpos de dominio simple identificados por su listado de secuencia. Estos anticuerpos de dominio simple no están limitados por ninguna característica estructural común ni por ninguna característica funcional común porque el solicitante no provee ninguna base para la hipótesis que una o dos CDRs son suficientes para inducir un efecto técnico (p e , enlace específico a un objetivo definido). La definición de anticuerpos de dominio simple mediante 570 CRDs y todas las combinaciones posibles de los mismos no es clara en la medida que la presentación de la reivindicación hace confusa la materia objeto para la cual se busca protección. Datos experimentales fundamentados en relación con el efecto técnico de inhibición del enlace de CD40L a CD40 están dados en la descripción solamente para los anticuerpos de dominio simple listados en la Tabla 7. En consecuencia, la reivindicación 95 fue buscada solamente para las CDRs de los anticuerpos de cadena simple listadcs en la Tabla 7 de la página 142. Solamente la materia objeto que fue buscada se examina en el presente reporte. (Regla 66.1 (e) PCT).

3. Las reivindicaciones 1-20 se relacionan con la materia objeto considerada por esta autoridad como cubierta por las provisiones de la Regla 67.1 (iv) PCT. En consecuencia, no se formulará opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34 (4)(a)(I) PCT)

Re Item V:
Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que soportan tal declaración

1 Se hace referencia a los siguientes documentos.
D1. US-A-5 869 049 (NOELLE EL AL) Febrero 9 de 1999 (1999-02-09)
D2· WO 01/68860 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS-ERFINDUNGEN; DI PADOVA,

FRANCO, E; SCHULLER, WALT) Septiembre 20 de 2001 (2001-09-20)

D3. BRAMS PETER ET AL: "A humanized anti-human CD154 monoclonal antibody blocks CD154-CD40 mediated human B cell activation" (Un anticuerpo monoclonal CD154 anti-humano humanizado bloquea la activación de célula B humana mediada por CD154-CD40) IMMUNOPHARMACOLOGY, vol. 1, no. 2, Febrero 2001 (2001-02), páginas 277-294, XP002355661 ISSN: 1567-5769.

D4: WO 99/00143 A (BIOGEN, INC; THOMAS, DAVID, W) Enero 7 de 1999 (1999-01-07)

D5: WO 02/18445 A (BIOGEN, INC; KARPUSAS, MICHAEL; HSU, YEN-MING; TAYLOS, FREDERIK, R; Z) Marzo 7 de 2002 (2002-03-07)

D6: MUYLDERMANS S ET AL. "Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains" (Reconocimiento de antígenos mediante fragmentos de anticuerpo de domino simple: el lujo supérfluo de dominios pares) TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARDS, GB, vol. 26, no. 4, Abril 1 de 2001 (2001-04-01), páginas 230-235, XP004241851 ISSN: 0968-0004

D7: HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" (Anticuerpos de dominio: proteínas para terapia) TRENDS ON BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB., vol. 21, no. 11, Noviembre de 2003 (2003-11), páginas 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799

D8: WO 2004/058822 A (DOMANTIS LIMITED; WINRWE, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA) Julio 15 de 2004 (2004-07-15)

D9: WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINRWE, GREG, TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA) Enero 8 de 2004 (2004-01-08)

D10: WO 2004/058821 A (DOMANTIS LIMITED; WINRWE, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA) Julio 15 de 2004 (2004-07-15)

2 Todas las reivindicaciones están relacionadas con polipéptidos de anticuerpo, que se enlazan a CD40L (CD154) y que son antagonistas para la actividad de CD40.

La técnica previa revela varios anticuerpos y fragmentos monovalentes de los mismos, que se enlazan a CD40L y que son antagonistas para la actividad de CD40.

D1 revela un anticuerpo depositado llamado MR1 dirigido contra gp39=CD40L (col. 24), que es un antagonista de gp39 (col. 5, línea 15-25). D1 revela también que se pueden producir los fragmentos Fab' (que son monovalentes). D1 revela en la col. 3 que el anticuerpo se puede usar para prevenir el rechazo de trasplante. Por lo tanto, D1 anticipa las reivindicaciones

1-6, 21, porque no están limitadas a polipéptidos de dominio variable de inmunoglobulina simple, sino a polipéptidos monovalentes, que incluyen Fab'.

D2 revela un anticuerpo anti-CD154, que es llamado ABI793. Dicho anticuerpo antagoniza el enlace de CD154 a CD40 y tiene un IC50 de 75 ng/ml. D2 revela el tratamiento de un número de enfermedades inmunes como uso médico (páginas 15, 16). ABI793 enlaza a un epítopo diferente a los anticuerpos anti-CD154 conocidos 5c8 y 24-31 (ejemplo 3). D2 revela en la página 2, línea 5 que la molécula de enlace anti-CD154 puede ser un dominio variable de cadena pesada simple. Al tomar en consideración los argumentos del solicitante con relación a D2, se puede aceptar que D2 no revela suficientemente un anticuerpo de dominio simple que se enlaza a CD154 y que D2 no anticipa la materia objeto de las reivindicaciones 1-9, y 21, pero la provisión de anticuerpos de dominio simple contra el objetivo CD40L conocido no involucra un nivel inventivo por las siguientes razones: D2 sugiere la producción de anticuerpos de dominio simple contra CD40L (ver anteriormente), y los métodos para producir anticuerpos de dominio simple son bien conocidos en la técnica y san sido revelados previamente por el solicitante (ver, p.e., D6-D9). Adicionalmente, se deje subrayar que los argumentos del solicitante a favor de un nivel inventivo de anticuerpos de dominio simple de inmunoglobulina se basan en el tamaño pequeño de los anticuerpos de dominio simple y la falta de un efecto cooperativo o avidez de los anticuerpos de dominio simple. Se debe indicar que la mayoría de las reivindicaciones de la presente solicitud comprenden la posibilidad de formar multímeros de anticuerpos de dominio simple y que por lo tanto, los argumentos de los solicitantes no son validos para estas reivindicaciones.

D3 revela un fragmento Fab'1 de un anticuerpo anti-CD154 humanizado llamado Idec-131. Dicho anticuerpo bloquea el enlace de CD154 a CD40 (ver resumen) e inhibe la diferenciación de célula B dependiente de célula T. D3 declara que el fragmento Fab'1, que es monovalente tiene una actividad biológica equivalente a la del anticuerpo entero (ver también la figura 8). En la página 283, D3 revela que el Idec-131 tiene un IC50 de 1 □g/ml, que corresponde a aproximadamente 20 nM para el Fab. Así, D3 anticipa la materia objeto de las reivindicaciones 1-6 (Artículo 33(2) PCT). Porque las reivindicaciones no están limitadas a anticuerpos de dominio simple de inmunoglobulina. Con respecto a la reivindicación 21, la materia objeto de la reivindicación 21 no puede considerarse novedosa (artículo 33(2) PCT porque está más allá de cualquier duda razonable que un anticuerpo que se enlaza a CD40L no activa sustancialmente CD40

D4 revela el anticuerpo anti-CD154 llamado 5c8. Dicho anticuerpo bloquea el enlace de CD40:CD154 (página 8, líneas 5-10; página 13, líneas 1-2) y se propone para el tratamiento de enfermedades inmunes (página 12). D4 indica que los agentes bloqueadores de CD154 pueden ser fragmentos Fab de anticuerpos. El fragmento Fab de 5c8 está revelado en D5 y mostró enlace a un epítopo tridimensional de CD154 (página 18, líneas4-8). Así, D4 anticipa la materia objeto de las reivindicaciones 1-6, 21 (página 33(2) PCT) porque las reivindicaciones no están limitadas a anticuerpos de dominio simple de inmunoglobulina, sino que el alcance incluye fragmentos Fab.

La reivindicación independiente 27 está dirigida a un péptido anticuerpo, que se enlaza monovalentemente a CD40L y que no incluye un cierto grado de agregación de plaqueta. De acuerdo con la descripción (páginas 72-73), los polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L bivalentes tienden a agregar plaquetas mientras que los anti-CD40L monovalentes no inducen la agregación de plaquetas. Considerando la afirmación del solicitante que esta propiedad no es una propiedad generalizada de todos los anticuerpos anti-CD40L monovalentes, esta reivindicación está definiendo productos por un resultado a alcanzar. El hecho que la técnica previa no use el parámetro poco común de agregación de plaquetas para definir los anticuerpos anti-CD40L monovalentes, no significa que los anticuerpos monovalentes de la técnica previa no tengan las características deseadas Si el solicitante elige usar una prueba poco común y ajustar arbitrariamente un límite de corte para diferenciar un producto, de aquellos presentes en la técnica previa, el solicitante debe probar que los productos de la técnica previa no caen dentro del alcance de la definición poco común. Como D1-D4 revelan fragmentos de anticuerpo monovalentes, anticipan inherentemente la materia objeto de la reivindicación 27 (Artículo 33(2) PCT) Se debe subrayar que la presente solicitud no provee ningún dato experimental para soportar las propiedades relativas a la agregación de plaquetas y que incluso si la materia objeto de la reivindicación 27 fuera reconocida como novedosa, que no es el caso, la materia objeto no involucraría un nivel inventivo debido a que no se mostró efecto técnico para ningún compuesto

Las reivindicaciones 90 y 91 están dirigidas a dominios variables simples de anticuerpo, que inhiben el enlace del anticuerpo de dominio simple DOM8-24, o que se enlazan al mismo epítopo como DOM8-24. La materia objeto de dichas reivindicaciones puede considerarse novedoso

(Artículo 33(2) PCT). Sin embargo, no se requiere de habilidades inventivas para producir un anticuerpo (incluyendo un anticuerpo total), que inhibe el enlace o compite con un anticuerpo de dominio simple para el enlace a CD40L. No hay indicación que in anticuerpo total tuviera cualquier característica técnica sorprendente excepto de alguna inhibición del anticuerpo de dominio simple caracterizado por la SEQ ID No: 26.

La Reivindicación 43 está dirigida a un anticuerpo, que se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L, y que está caracterizado además por tener una secuencia de amino ácido que tiene al menos 85% de identidad con un gran número de secuencias correspondientes a anticuerpos de dominio simple. Se puede considerar que la materia objeto de dicha reivindicación es nueva (Artículo 33(2) PCT). La producción de anticuerpos contra un objetivo conocido (p.e., CD40L) no involucra un nivel inventivo y no se puede atribuir efecto técnico adicional a las limitaciones estructurales de la reivindicación 43. Así, la reivindicación 43 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT).

Las reivindicaciones 62,63 están dirigidas a anticuerpos de dominio simple, que se enlazan específicamente y monovalentemente a CD40L y que están caracterizados además por una secuencia de amino ácido a ser seleccionada entre 191 secuencias. La materia objeto de las reivindicaciones 62 y 63 se puede considerar nueva (Artículo 33(2) PCT), pero la provisión de anticuerpos de dominio simple contra el objeto CD40L conocido no involucra in nivel inventivo por las siguientes razones: D2 sugiere la producción de anticuerpos de dominio simple contra CD40L (ver anteriormente) y los métodos para producir anticuerpos de dominio simple son bien conocidos en la técnica (ver, e.g., D6-D9) No se puede atribuir efecto técnico adicional a ninguna de las 191 secuencias Parece altamente improbable que las 191 secuencias sean capaces de antagonizar significativamente el enlace de CD40L. Si este fuera el caso, parecería claramente que la mayoría de anticuerpos de dominio simple contra CD40L que se enlazan a CD40L también tienen algún efecto antagonista. Y por lo tanto, la materia objeto de las reivindicaciones 62 y 63 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT).

La reivindicación independiente 70 está dirigida a una formulación farmacéutica de liberación prolongada que comprende un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente. La materia objeto de la reivindicación 70 es novedosa (Artículo 33(2) PCT). El anti-CD40L está revelado en la forma de un anticuerpo de dominio simple en D2 (ver anterior). D2 revela el uso médico de

CD40L y por lo tanto, la provisión de una forma de liberación prolongada, que es práctica estándar en el campo farmacéutico, no requiere habilidades inventivas. Adicionalmente, se debe subrayar que el alcance de las formulaciones comprende anticuerpos de dominio simple multivalentes u otras construcciones, y que las reivindicaciones no están limitadas por las principales características de los anticuerpos de cadena simple (tamaño pequeño, monovalencia), que son usadas por el solicitante en su intento de argumentar a favor de un nivel inventivo los anticuerpos de dominio simple. Así, la materia objeto de la reivindicación 70 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT). Las características adicionales de las reivindicaciones dependientes 71 y 72 son inherentemente parte de la revelación de D2, y entones, no confieren un nivel inventivo en la materia objeto (Artículo 33(3) PCT).

La reivindicación 73 está dirigida a un polipéptido de dominio variable simple que se enlaza a CD40L, caracterizado por la Seq. Id. No 26 (que parece corresponder con DOM8-24) Los datos experimentales de la tabla 7 en las páginas 142 y 143 muestran que dicho anticuerpo tiene un IC50 de 0.417 nM El IC50 del anticuerpo total anti-CD40L IDEC-131 de la técnica previa está en 1 □g/ml para el anticuerpo total, (D3, página 285), que correspondería a aproximadamente 7 nM para el fragmento Fab. D3 afirma que el fragmento Fab tiene una potencia similar que el anticuerpo total (página 286). D2 (página 13) revela que el anticuerpo ABI793, tiene un IC50 de aproximadamente75 ng/ml. D2 revela también que se pueden producir los fragmentos Fab y los anticuerpos de cadena simple. Un fragmento Fab tendría un IC50 de aproximadamente 5 nM, debido al menor peso molecular. Como un anticuerpo de dominio simple con una potencia equivalente tiene solamente aproximadamente un cuarto del peso molecular de un fragmento Fab, se puede esperar que el IC50 de un anticuerpo de dominio simple equivalente es aproximadamente 1-2 nM. D2 sugiere la producción de anticuerpos de dominio simple, y las técnicas para producir anticuerpos de dominio simple son bien conocidas en la técnica (ver D6-D9). La provisión de anticuerpos de dominio simple con un IC50 que es equivalente al IC50 para anticuerpos totales, teniendo en cuenta el menor peso molecular de los anticuerpos de dominio simple, no requiere una habilidad inventiva Los argumentos de solicitante que un IC50 no puede ser extrapolado a partir de un anticuerpo total a un anticuerpo Fab no pueden seguirse, porque la producción de Fab corresponde a la remoción de dominios de anticuerpo que no están involucrados en el enlace al epítopo. El propósito de determinar un IC50 en farmacología es ser capaz de comparar la "potencia" de diferentes compuestos.

La extrapolación de un compuesto a otro es la razón porqué se calcula el IC50, y por lo tanto, la extrapolación está totalmente justificada. Así, la materia objeto de la reivindicación 73 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT).

Las reivindicaciones 74-89 están todas dirigidas a anticuerpos de dominio simple o antagonistas de CD40L que se enlazan a CD40L y que tienen cierto grado de identidad de secuencia con DOM8-24. La materia objeto de dichas reivindicaciones puede considerarse nuevo (Artículo 33 (2) PCT). Como la producción de anticuerpos de dominio simple o anticuerpos contra un objetivo bien conocido no involucra habilidades inventivas (ver D6-D9), y como no se puede correlacionar un efecto técnico sorprendente con la identidad estructural parcial con el anticuerpo no inventivo DOM8-24, la materia objeto de las reivindicaciones 74-89 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT).

La materia objeto de la reivindicación 94 es nueva (Artículo 33(2) PCT) porque la técnica previa no revela anticuerpos de dominio simple que comprenden las CDRs de DOM8-24. Dicho anticuerpo de dominio simple no involucra un nivel inventivo, por las mismas razones a las dadas anteriormente para la reivindicación 73 (Artículo 33(3) PCT).

La materia objeto de las reivindicaciones 95 y 97 (hasta donde se buscó, ver item III-1) es novedosa (Artículo 33(2) PCT), porque la técnica previa disponible no revela los anticuerpos de dominio simple listados en la tabla 7 en la página 142. Los diferentes anticuerpos de dominio simple de la tabla 7 no involucran un nivel inventivo por las mismas razones a las dadas por el anticuerpo de dominio simple caracterizado por la SEQ ID NO. 26 (ver objeciones para la reivindicación 73) (Artículo 33(3) PCT).

La reivindicación 96 (reivindicación original 98) está dirigida a un ligando biespecífico que comprende un primer dominio variable simple que se enlaza a CD40L y un segundo dominio variable simple que se enlaza a un antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno, o un antígeno de superficie de célula T. D2 revela un anticuerpo de dominio simple contra CD40L (página 2, líneas 5-7), que se combinará con anticuerpos que afectan la inmunomodulación y que está dirigido contra MHC, CD28, CTLA4 (página 17). La diferencia entre D2 y la reivindicación 98 se base en el hecho que en D2 los anticuerpos son administrados como anticuerpos aislados, mientras que en la reivindicación 98, estos son parte de una construcción biespecígica El problema técnico a ser resuelto es la provisión de un método alternativo para administrar el anticuerpo anti-CD40L con otros anticuerpos

inmunosupresores La administración en la forma de un anticuerpos de dominio simple biespecífico es una alternativa obvia en vista de D10, que revela cómo producir anticuerpos de dominio simple biespecíficos y que demuestra que mantienen sus propiedades de enlace. Adicionalmente, la presente solicitud carece de resultados experimentales que mostrarían un efecto sorprendente para las construcciones. Por lo tanto, la materia objeto de la reivindicación 96 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT). Las características adicionales de las reivindicaciones dependientes 99-104 no parecen ser responsables de ningún efecto sorprendente y por ende no confieren un nivel inventivo a la materia objeto de dichas reivindicaciones (Artículo 33(3) PCT).

Las reivindicaciones dependientes 7 y 8 no son anticipadas por la técnica previa disponible, sin embargo, la limitación por las características estructurales del anticuerpo de dominio no confieren un nivel inventivo del método (Artículo 33(3) PCT).

La reivindicación dependiente 9 restringe además el polipéptido de anticuerpo mediante un amplio rango de concentraciones de IC50, que cubre los IC50 de los anticuerpos de la técnica previa (ver D2). Dicha característica adicional no confiere un nivel inventivo a la materia objeto de la reivindicación 9. Las reivindicaciones dependientes 10-19 se refieren a un aumento de vida media en suero del polipéptido-anticuerpo anti-CD40L mediante el enlace del mismo a PEG y no están reveladas en la técnica previa. Como PEG está revelado en la página 488 de D7 para alcanzar exactamente el mismo efecto en los anticuerpos de dominio simple, la materia objeto de las reivindicaciones 10-19 no involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT). El mismo razonamiento aplica para la reivindicación independiente 52 y para las reivindicaciones dependientes 28-37, 53-61.

Parece que las características adicionales de las nuevas reivindicaciones dependientes 20, 22-26, 38-42, 45-51, 64-69, cuando se consideran solas o en combinación, no generan ningún efecto sorprendente que podría servir como una base para un razonamiento de nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT).

Observaciones Adicionales:

3. Las reivindicaciones que se refieren a DOM8-24 no son claras (Artículo 6 PCT), porque DOM8-24 es la denominación interna, que no es generalmente aceptada en el campo. El anticuerpo de dominio simple DOM8-24 debe haber sido identificado por su secuencia. Parece que

DOM8-24 corresponde al DOM24 identificado por la Seq. Id. No. 26.

4 Para la evaluación de las reivindicaciones presentes 1-20 sobre la pregunta si son aplicables industrialmente, no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes de PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero pueden permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para primer uso en tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

Re Item VI

Ciertos documentos citados

Se considera que el documento publicado (Regla 70.10)

Solicitud No. Patente No.	Fecha de publicación (día/mes/año)	Fecha de radicación (día/mes/año)	Fecha de prioridad (día/mes/año)
WO05/035572	21.04.2005	08 10.2004	08.10.2003

no es parte de la técnica previa (Regla 64.1 PCT). Sin embargo, este documento puede ser de importancia con respecto a la novedad en una fase nacional/regional posterior

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1. Uso de un polipéptido de anticuerpo que comprende un polipéptido de dominio variable sencillo en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un síntoma de enfermedad autoinmune, en donde dicho polipéptido de dominio variable sencillo antagoniza una actividad de CD40 o CD40L o ambos

2. El uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde dicha enfermedad autoinmune es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, Diabetes, rechazo de aloinjerto, rechazo de transplante de xenoinjerto y enfermedad de injerto v. hospedero.

3. El uso de acuerdo con la Reivindicación 1 o 2, en donde el polipéptido de anticuerpo es monovalente para el enlace a CD40L (gp39).

4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho polipéptido de anticuerpo inhibe el enlace de CD40L a CD40.

5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde el polipéptido de anticuerpo consiste del polipéptido de dominio variable sencillo.

6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido de dominio variable sencillo es un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo humano.

7 El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho polipéptido de dominio variable sencillo es un dominio V_H o V_L.

8 El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho polipéptido de anticuerpo comprende un amino ácido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID Nos 7-82 y SEQ ID Nos 246-360.

9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho polipéptido de anticuerpo tiene una secuencia de amino ácido que es al menos 80% homóloga a la SEQ ID NO: 26.

10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho polipéptido de anticuerpo tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la SEQ. ID. NO: 26.

11. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 10, en donde el enlace de dicho polipéptido de anticuerpo a CD40L no agoniza sustancialmente la actividad de CD40 y/o CD40L.

12. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 11, en donde la presencia de dicho polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaquetas estándar no produce la agregación de más del 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo.

13. Un método para antagonizar una actividad de CD40 o CD40L en un individuo, el método comprende administrar un polipéptido de anticuerpo que es monovalente para el enlace a CD40L (gp 39) a dicho individuo, en donde dicho polipéptido antagoniza una actividad de CD40 o CDL40 o ambas, y en donde dicho polipéptido comprende un polipéptido de dominio variable sencillo.

14. Un método para antagonizar una actividad de CD40 o CD40L en un individuo, el método comprende administrar un polipéptido de anticuerpo que es monovalente para el enlace a CD40L (gp 39) a dicho individuo, en donde dicho polipéptido antagoniza el enlace de CD40 a CDL40 en dicho individuo, y en donde dicho polipéptido comprende un polipéptido de dominio variable sencillo.

15 Un método para tratar o prevenir un síntoma de enfermedad autoinmune en un individuo, el método comprende administrar un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente a dicho individuo en una cantidad efectiva para tratar

o prevenir un síntoma de enfermedad autoinmune, en donde dicho polipéptido comprende un polipéptido de dominio variable sencillo.

16. Un método para tratar o prevenir una enfermedad autoinmune en un individuo, el método comprende administrar un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente a dicho individuo en una cantidad efectiva para tratar o prevenir un síntoma de enfermedad autoinmune, en donde dicho polipéptido comprende un polipéptido de dominio variable sencillo.

17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 13 a 16, en donde dicho polipéptido consiste de un polipéptido de dominio variable sencillo.

18. El método de la reivindicación 15, en donde dicha enfermedad autoinmune es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, Diabetes, rechazo de aloinjerto, rechazo de trasplante de xenoinjerto, y enfermedad de injerto vs. Hospedero.

19. El método de la reivindicación 15, en donde dicho polipéptido de anticuerpo inhibe el enlace de CD40L a CD40.

20. El método de la reivindicación 15, en donde dicho polipéptido de anticuerpo comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 7-82, y SEQ ID NOs 246-360.

21 El método de la reivindicación 15, en donde dicho polipéptido de anticuerpo tiene una secuencia de amino ácido al menos 85% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs. 7-82 y 246-360, cuyo polipéptido de anticuerpo se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L.

22. El método de la reivindicación 19, en donde dicho polipéptido de anticuerpo inhibe el enlace de CD40L a CD40 con un IC_{50} en el rango de 20 pM a 1.5 μM, inclusive.

23. El método de la reivindicación 15, en donde dicho polipéptido de anticuerpo está enlazado a PEG.

24. El método de la reivindicación 23, en donde dicho polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 24 kD.

25. El método de la reivindicación 23, en donde dicho PEG está enlazado a dicho anticuerpo en un residuo de cisteína o lisina.

26. El método de la reivindicación 23, en donde el tamaño del PEG total es de 20 a 60 kD, inclusive.

27. El método de la reivindicación 23, en donde dicho polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 200 kD.

28. El método de la reivindicación 23, en donde dicho polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG tiene una vida media in vivo aumentada con relación a la misma composición de polipéptido que no tiene polietilenglicol enlazado.

29. El método de la reivindicación 28, en donde la vida media tα de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más.

30. El método de la reivindicación 28, en donde la vida media tα de la composición de polipéptido está en el rango de 0.25 minutos a 12 horas.

31. El método de la reivindicación 28, en donde la vida media tβ de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más.

32. El método de la reivindicación 28, en donde la vida media tβ está en el rango de 12 a 48 horas.

33. El método de la reivindicacion 13 o 14, en donde dicho polipéptido de anticuerpo es un dominio V_{HH} camélido o de tiburón nodriza.

34 El polipéptido de anticuerpo que es monovalente para el enlace a CD40L (gp39), en donde el enlace a dicho polipéptido de anticuerpo a CD40L no agoniza sustancialmente la actividad de CD40 y/o CD40L.

35 El anticuerpo de la reivindicación 34, en donde dicho polipéptido de anticuerpo inhibe el enlace de CD40 a CD40L, y no agoniza sustancialmente la señalización por CD40.

36. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 34, en donde el enlace de dicho polipéptido de anticuerpo a CD40L no induce sustancialmente la fosforilación JNK en las células T Jurkat.

37. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 34, en donde el enlace de dicho polipéptido de anticuerpo a CD40L no induce sustancialmente la secreción IFN-γ por células T Jurkat co-estimuladas con anticuerpo anti-CD3.

38. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 34, en donde la presencia de dicho polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaqueta estándar no produce la agregación de más del 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo.

39. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 34, en el cual el polipéptido de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un polipéptido de dominio variable sencillo, dAb, FAb, un scFv, un Fv, o un Fv enlazado a disulfuro.

40. Un polipéptido de anticuerpo que es monovalente para el enlace a CD40L (gp 39), en donde la presencia de dicho polipéptido de anticuerpo en un

ensayo de agregación de plaqueta estándar no produce la agregación de más del 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo.

41. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 34, en donde el polipéptido está enlazado a PEG.

42. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 41, que tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 24 kD.

43. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 41, en donde dicho PEG está enlazado a dicho anticuerpo en un residuo de cisteína o lisina.

44. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 41, en donde el tamaño del PEG total es de 20 a 60 kD, inclusive.

45. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 41, que tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 200 kD.

46. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 41, que tiene una vida media in vivo aumentada con relación a la misma composición de polipéptido que no tiene polietilenglicol enlazado.

47. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 46, en donde la vida media $t\alpha$ de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más.

48. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 46, en donde la vida media $t\alpha$ de la composición de polipéptido está en el rango de 0 25 minutos a 12 horas.

49 El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 46, en donde la vida media $t\beta$ de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más.

50. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 46, en donde la vida media tβ está en el rango de 12 a 48 horas.

51. El anticuerpo de la reivindicación 34 que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs 7-82 y 246-360.

52. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 34, que está libre de un dominio Fc

53. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 52, en donde la presencia de dicho polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaqueta estándar no produce la agregación de más del 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo.

54. El anticuerpo de la reivindicación 34 que inhibe el enlace de CD40L a CD40 con un IC_{50} en el rango de 20 pM a 1.5 μM, inclusive.

55. Una composición que comprende el polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 34 y un segundo polipéptido de anticuerpo que se enlaza a un ligando diferente de CD40L, en donde dicho polipéptido de anticuerpo que se enlaza a un ligando diferente de CD40L se enlaza a un ligando seleccionado del grupo que consiste de HSA, TNFα, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN-γ, CD2, CD4, CD8, LFA1, LFA3, VLA4, CD80, B7-1, CD28, CD86, B7-2, CTLA-4, CD28, molécula co-estimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, ligando de molécula co-estimuladora inducible (ICOSL), OXL40, HVEM (Mediador de la Entrada del Virus del Herpes), LIGHT.

56. Un polipéptido de anticuerpo que tiene una secuencia de amino ácido al menos 85% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS 7-82, y SEQ ID NOs: 246-360, cuyo polipéptido de anticuerpo se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L.

57. Un polipéptido que se enlaza a antígeno, dicho polipéptido comprende un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L. en donde dicho polipéptido inhibe sustancialmente el enlace de CD40L a CD40.

58. El polipéptido que se enlaza a antígeno de la reivindicación 57, que inhibe el enlace de CD40 a CD40L con un IC_{50} en el rango de 20 pM a 1.5 μM, inclusive

59 El polipéptido que se enlaza a antígeno de la reivindicación 57, en donde el enlace de dicho polipéptido a CD40L no agoniza sustancialmente la actividad de CD40 y/o CD40L.

60. El polipéptido que se enlaza a antígeno de la reivindicación 57, en donde el enlace de dicho polipéptido a CD40L no induce sustancialmente la fosforilación JNK en las células T Jurkat.

61. El polipéptido que se enlaza a antígeno de la reivindicación 57, en donde el enlace de dicho polipéptido de anticuerpo a CD40L no induce sustancialmente la secreción IFN-γ por células T Jurkat co-estimuladas con anticuerpo anti-CD3

62 El polipéptido que se enlaza a antígeno de la reivindicación 57, en donde la presencia de dicho polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaqueta estándar no produce la agregación de más del 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo.

63 El polipéptido que se enlaza a antígeno de la reivindicación 57, en el cual dicho polipéptido que se enlaza a antígeno se selecciona del grupo que consiste de un polipéptido de dominio variable sencillo, dAb, FAb, un scFv, un Fv, o un Fv enlazado a disulfuro.

64 Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 34 o 57, en donde el dominio variable anti-CD40L o dAb comprende una o más regiones de marco que comprenden una secuencia de amino ácido que es la misma secuencia de amino ácido de una región de marco correspondiente codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal, o la secuencia de amino ácido de una o más de dichas regiones de marco que comprenden colectivamente hasta 5 diferencias de amino ácido con relación a la secuencia de amino ácido de dicha región de marco correspondiente codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal.

65. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 34 o 57, en donde las secuencias de amino ácido de FW1, FW2, FW3 y FW4 del dominio variable anti-CD40L o dAb son las mismas que las secuencias de aminoácido de regiones de marco correspondientes codificadas por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal, o las secuencias de amino ácido de FW1, FW2, FW3 y FW4 colectivamente contienen hasta 10 diferencias de amino ácido con relación a las secuencias de amino ácido de las regiones de marco correspondientes codificadas por dicho segmento de gen de anticuerpo de línea germinal.

66. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 65, en donde las secuencias de amino ácido de dichos FW1, FW2 y FW3 del dominio variable anti-CD40L o dAb son las mismas que las secuencias de amino ácido de regiones de marco correspondientes codificadas por segmentos de gen de anticuerpo de línea germinal humana.

67. El polipéptido de acuerdo con la reivindicaciones 65, en donde dicho segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana se selecciona del grupo que consiste de DP47, DP45, DP48 y DPK9.

68. Un polipéptido que se enlaza a antígeno, enlazado a PEG, que comprende un dominio variable de inmunoglbulina que se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L.

69. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 68, que tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 24 kD.

70. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 68, en donde dicho PES está enlazado a dicho anticuerpo en un residuo de cisteína o lisina.

71 El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 68, en donde el tamaño total del PEG es de 20 a 60 kD, inclusive.

72. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 68, que tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 200 kD.

73. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 68, que tiene una vida media in vivo aumentada con relación a la misma composición de polipéptido que no tiene polietilenglicol enlazado.

74. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 68, en donde la vida media $t\alpha$ de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más.

75. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 68, en donde la vida media $t\alpha$ de la composición de polipéptido está en el rango de 0.25 minutos a 12 horas.

76. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 68, en donde la vida media $t\beta$ de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más.

77. El polipéptido enlazado a PEG de la reivindicación 68, en donde la vida media $t\beta$ está en el rango de 12 a 48 horas.

78. Un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina, dicho polipéptido comprende un dominio variable de inmunoglobulina sencillo que se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L, y que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs 7-82, y SEQ ID NOs 246-360.

79. Un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina que tiene una secuencia de amino ácido al menos 85% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs 7-82, y SEQ ID NOs 246-360, cuyo polipéptido se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L.

80. El polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina de la reivindicación 79, que comprende un dominio variable de inmunoglobulina que se enlaza específicamente y covalentemente a CD40L.

81. El polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina de la reivindicación 79 que antagoniza el enlace de CD40L.

82. El polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina de la reivindicación 79, que inhibe el enlace de CD40 a CD40L, y que tiene un IC50 en el rango de 20 pM a 1.5 μM, inclusive.

83. El polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina de la reivindicación 79, en donde dicho polipéptido que se enlaza a antígeno inhibe la interacción de CD40 con CD40L, pero no agoniza significativamente la señalización por CD40.

84. Una composición que comprende el polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina de la reivindicación 79 y un segundo polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina que se enlaza a otro ligando diferente de CD40L.

85. La composición de la reivindicación 84, en donde dicho polipéptido de anticuerpo que se enlaza a un ligando diferente de CD40L, se enlaza a un ligando seleccionado del grupo que consiste de HSA, TNFα, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN-γ, CD2, CD4, CD8, LFA1, LFA3, VLA4, CD80, B7-1, CD28, CD86, B7-2, CTLA-4, CD28, molécula co-estimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, ligando de molécula co-

estimuladora inducible (ICOSL), OXL40, HVEM (Mediador de la Entrada del Virus del Herpes), LIGHT.

86. Una formulación farmacéutica de liberación prolongada que comprende un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente, en donde dicho polipéptido de anticuerpo comprende o consiste de un polipéptido de dominio variable sencillo.

87. La formulación farmacéutica de liberación prolongada de la reivindicación 86, en donde dicho polipéptido de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un dAb, Fab, scFv, Fv, o un Fv enlazado a disulfuro.

88. La formulación de la reivindicación 86, en donde dicho polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente comprende un dominio variable de inmunoglobulina sencillo que se enlaza a CD40L.

89. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, dicho polipéptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26.

90. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el polipéptido tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia que es al menos 80% homóloga a la secuencia de SEQ ID NO: 26.

91. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el polipéptido tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26.

92. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el polipéptido tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 26.

93. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el polipéptido tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 26.

94. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el dAb tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26, y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 26.

95. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el dAb tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO· 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO. 26, y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 26.

96. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el dAb tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido,

y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26, y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 26.

97. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el dAb tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26, y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 26 y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 26.

98. Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26.

99. Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 26.

100. Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 26.

101. Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26, y una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 26.

102. Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 26, y una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 26.

103. Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO. 26, y una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 26.

104. Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26, y una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 26, y una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 26

105 El antagonista de CD40L de la reivindicación 104, en donde dicho antagonista es un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo, dAb, FAb, un scFv, un Fv o un Fv enlazado a disulfuro.

106 Un polipéptido de anticuerpo que inhibe el enlace de un dominio variable sencillo de anticuerpo, que comprende la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26.

107. Un polipéptido de anticuerpo que se enlaza al mismo epítopo de CD40L unido mediante un dominio variable sencillo de anticuerpo que comprende la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26 SEQ ID NO: 26.

108. Un método para tratar o prevenir un síntoma de enfermedad autoinmune en un individuo, el método comprende administrar el polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 106 o 95 a dicho individuo en una cantidad efectiva para tratar o prevenir un síntoma de enfermedad autoinmune.

109. Un polipéptido de anticuerpo que se enlaza al mismo epítopo de CD40L unido mediante un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 7-82 y 246-360, en donde el polipéptido de anticuerpo comprende o consiste de un polipéptido de dominio variable sencillo.

110. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 26.

111. Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 de un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 7-82 y 246-360.

112. Un ligando específico dual que comprende un primer dominio variable sencillo de inmunoglobulina que tiene una especificidad de enlace a un primer antígeno y un segundo dominio variable sencillo que tiene una actividad de enlace a un segundo antígeno, en donde el primer antígeno es CD40L y el segundo dominio variable sencillo es un antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno, o un antígeno de superficie de célula T.

113. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 112, en donde el antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno se selecciona de uno del grupo que consiste de antígenos de superficie de macrógafo activado, antígenos de superficie de célula B activados, antígenos de superficie de la ruta se señalización co-estimuladora, y MHC.

114. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 113, en donde el MHC es clase II.

115. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 114, en donde el MHC clase II es alfa.

116. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 114, en donde el MHC clase II es beta.

117. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 113, en donde el antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno se selecciona de uno del grupo que consiste de CD28, molécula co-estimuladora inducible (ICOS), CD27,

CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, ligando de molécula co-estimuladora inducible (ICOSL), OXL40, CD80, CD86, HVEM (Mediador de la Entrada del Virus del Herpes) y LIGHT.

118. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 113, en donde el antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno se selecciona de uno del grupo que consiste de CD28, molécula co-estimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69 y CD3.

119. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 113, en donde el antígeno de superficie es un antígeno de superficie del gen B7.

120. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 119, en donde el antígeno de superficie del gen B7 es B7-2, o B7-1.

Cicao Domba P33817CO Domantis 108

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference DOMBA/P33817PC	**FOR FURTHER ACTION**	See Form PCT/IPEA/416
International application No PCT/GB2005/003562	International filing date *(day/month/year)* 16 09 2005	Priority date *(day/month/year)* 17.09.2004
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P37/06		
Applicant DOMANTIS LIMITED		

1 This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36

2. This REPORT consists of a total of 16 sheets, including this cover sheet

3 This report is also accompanied by ANNEXES, comprising

a ☒ *sent to the applicant and to the International Bureau)* a total of 1-13 sheets, as follows

☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70 16 and Section 607 of the Administrative Instructions)

☒ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No I and the Supplemental Box

b ☐ *(sent to the International Bureau only)* a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions)

4 This report contains indications relating to the following items

☒ Box No I Basis of the report

☒ Box No II Priority

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

☐ Box No IV Lack of unity of invention

☒ Box No V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement

☒ Box No VI Certain documents cited

☐ Box No VII Certain defects in the international application

☐ Box No VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
17.07.2006	20.12.2006
Name and mailing address of the international preliminary examining authority European Patent Office D-80298 Munich Tel +49 89 2399 - 0 Tx 523656 epmu d Fax +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Wagner, René Telephone No +49 89 2399-7357

Form PCT/IPEA/409 (Cover Sheet) (April 2005)

109

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No
PCT/GB2005/003562

Box No. I Basis of the report

1 With regard to the **language**, this report is based on

☒ the international application in the language in which it was filed

☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:

- ☐ international search (under Rules 12 3(a) and 23.1(b))
- ☐ publication of the international application (under Rule 12 4(a))
- ☐ international preliminary examination (under Rules 55 2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report).*

Description, Pages

1-288	as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-217	as originally filed

Claims, Numbers

105, 106	as originally filed
1-104	received on 18 07 2006 with letter of 17 07 2006

Drawings, Sheets

1/14-14/14	as originally filed

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*.
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*

4. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c))

- ☐ the description, pages
- ☒ the claims, Nos 1-12,13-33,68-88
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*

* *If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."*

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No
PCT/GB2005/003562

Box No. II Priority

1 ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested.

☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66 7(a))

☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66 7(b)).

2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rule 64 1). Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3 Additional observations, if necessary

see separate sheet

111

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No. PCT/GB2005/003562

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

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

☐ the entire international application,

☒ claims Nos 1-20 (IA), 95 (in part)

because

☒ the said international application, or the said claims Nos 1-20 (IA) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination *(specify)*:

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*.

☐ the claims, or said claims Nos are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*

☒ no international search report has been established for the said claims Nos 95 (in part)

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

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter* 1(a) or (b) and 13*ter* 2

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/GB2005/003562

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Statement

Novelty (N)	Yes	Claims	7-20,22-26,28-94,95(in part),96-104
	No	Claims	1-6,21,27
Inventive step (IS)	Yes	Claims	
	No	Claims	1-94,95(in part), 96-104
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	21-94,95(in part),96-104
	No	Claims	

2 Citations and explanations (Rule 70.7)

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1 Certain published documents (Rule 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rule 70 9)

see separate sheet

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No PCT/GB2005/003562

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of.

   a type of material

   ☒ a sequence listing

   ☐ table(s) related to the sequence listing

   b format of material:

   ☒ on paper

   ☒ in electronic form

   c time of filing/furnishing

   ☒ contained in the international application as filed

   ☒ filed together with the international application in electronic form

   ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination

   ☐ received by this Authority as an amendment* on

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

* *If item 4 in Box No. I applies, the listing and/or table(s) related thereto, which form part of the basis of the report, may be marked "superseded "*

Re Item I

Basis of the report

1. The amendments carried out introduce new subject-matter and do not comply with the requirements of Article 34(2)(b) PCT. The added claims 1-12 and claims 13-33, 86-88 were further limited by the introduction of the feature "wherein said polypeptide comprises a single variable domain polypeptide". The basis indicated by the applicant for does not disclose a single variable domain polypeptide in general but always refers to a single immunoglobulin variable domain or to an antibody single variable domain. This limitation to immunoglobulins or antibodies is missing in the feature introduced in the claims. By omitting the reference to antibodies or immunoglobulins an intermediate scope, between polypeptides as disclosed in the original claims and single immunoglobulin or antibody variable domains, as disclosed in the description in the passages proposed as a basis for the amendments, was introduced and no basis for this intermediate limitation can be seen in the passages proposed as a basis by the applicant.
   Therefore the newly introduced claims 1-12 are not taken into consideration for this opinion. The same applies to the amended claims 13-33,86-88. By not considering the introduced claims 1-12, the claim numbering corresponds to the numbering of the original claims except for the changes due to the deletion of original claims 96 and 97. The subsequent claims (98-106) are considered to be renumbered from 96 to 104.

Re Item II

Priority

It appears that the priority of the present application is validly claimed. The single domain antibodies of table 7 are present in the first priority document.

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

2. Claim 95 as originally filed was only searched in regard to the CDRs of the single

domain antibodies listed in table 7 on page 142. Only the subject-matter which has been searched is examined in the present preliminary report. Although amendments were carried out on claim 95 the examination must still be limited to the searched subject-matter only.
The objection raised against the original claim 95 was as follows: Claim 95 is directed to a single domain antibody defined by one or more CDRs from the 573 CDRs of the 191 single domain antibodies identified by their sequence listing. These single domain antibodies are neither limited by any common structural feature nor by any common functional feature because the application does not provide any basis for the hypothesis that one or two CDRs are sufficient for inducing a technical effect (e.g. specific binding to a defined target). The definition of single domain antibodies by 570 CDRs and all the possible combinations thereof is unclear to the extent that the presentation of the claim obscures the subject-matter for which protection is sought. Founded experimental data in relation with the technical effect of inhibition of Cd40L binding to CD40 is given in the description only for the single domain antibodies listed in Table 7. Consequently claim 95 was searched only for the CDRs of the single domain antibodies listed in table 7 on page 142. Only the subject-matter which has been searched is examined in the present report. (Rule 66.1 (e) PCT)

3. Claims 1-20 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Reference is made to the following documents:
   D1: US-A-5 869 049 (NOELLE ET AL) 9 February 1999 (1999-02-09)
   D2: WO 01/68860 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS-ERFINDUNGEN; DI PADOVA,

FRANCO, E; SCHULER, WALT) 20 September 2001 (2001-09-20)

D3: BRAMS PETER ET AL· "A humanized anti-human CD154 monoclonal antibody blocks CD154-CD40 mediated human B cell activation" INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, vol. 1, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 277-294, XP002355661 ISSN: 1567-5769

D4: WO 99/00143 A (BIOGEN, INC; THOMAS, DAVID, W) 7 January 1999 (1999-01-07)

D5: WO 02/18445 A (BIOGEN, INC, KARPUSAS, MICHAEL; HSU, YEN-MING; TAYLOR, FREDERICK, R; Z) 7 March 2002 (2002-03-07)

D6. MUYLDERMANS S ET AL: "Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARDS, GB, vol. 26, no. 4, 1 April 2001 (2001-04-01), pages 230-235, XP004241851 ISSN· 0968-0004

D7: HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no 11, November 2003 (2003-11), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799

D8: WO 2004/058822 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA) 15 July 2004 (2004-07-15)

D9: WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; HOLT) 8 January 2004 (2004-01-08)

D10: WO 2004/058821 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; WOOL) 15 July 2004 (2004-07-15)

2. All claims are related to antibody polypeptides, which are binding to CD40L (CD154) and which are antagonists for the activity of CD40.

The prior art discloses several antibodies and monovalent fragments thereof, which bind to CD40L and which are antagonists for the activity of CD40.

D1 discloses a deposited antibody called MR1 directed against gp39=CD40L (col. 24), which is an gp39 antagonist (col 5, line 15-25). D1 discloses also that Fab' fragments (which are monovalent) can be produced. D1 discloses in col. 3 that the antibody can be used to prevent transplant rejection. Therefore D1 anticipates claims

1-6, 21, because they are not limited to single immunoglobulin variable domain polypeptides but to monovalent polypeptides, which include Fab'.

D2 discloses an anti-CD154 antibody, which is called ABI793. Said antibody antagonises the binding of CD154 to CD40 and has an IC50 of 75 ng/ml. D2 discloses the treatment of a number of autoimmune disease as medical use (pages 15,16). ABI793 binds a different epitope than the known anti-CD154 antibodies 5c8 and 24-31 (example 3). D2 discloses on page 2, line 5 that the anti-CD154 binding molecule can be a single heavy chain variable domain. When taking into consideration the applicant's arguments relating to D2 it can be accepted that D2 does not sufficiently disclose a single domain antibody binding to CD154 and that D2 does not anticipate the subject-matter of claims 1-6, 9 and 21, but the provision of single domain antibodies against the known target CD40L does not involve an inventive step for the following reasons. D2 suggests the production of single domain antibodies against CD40L (see above) and the methods for producing single domain antibodies are well known in the art and have been disclosed previously by the applicant (see e.g. D6-D9). In addition it must be underlined that the applicant's arguments in favour of an inventive step of immunoglobulin single domain antibodies are based on the small size of the single domain antibodies and the lack of a cooperative or avidity effect of the single domain antibodies. It must be pointed out that most of the claims of the present application comprise the possibility of forming multimers of single domain antibodies and that therefore the applicant's arguments are not valid for these claims.

D3 discloses a Fab'1 fragment of a humanized anti-CD154 antibody called Idec-131. Said antibody blocks binding of CD154 to CD40 (see abstract) and inhibits T-cell dependent B cell differentiation. D3 states that the Fab'1 fragment, which is monovalent has an equivalent biological activity to that of the whole antibody (see also figure 8). On page 285 D3 discloses that the Idec-131 has an IC50 of 1 µg/ml, which corresponds to approximately 20nM for the Fab. Thus D3 anticipates the subject-matter of claims 1-6 (Article 33(2) PCT), because the claims are not limited to immunoglobulin single domain antibodies. Regarding claim 21, the subject-matter of claim 21 cannot be regarded as being novel (Article 33(2) PCT) because it is beyond any reasonable doubt that an antibody which binds to CD40L is not substantially

activating CD40.

D4 discloses the anti-CD154 antibody called 5c8. Said antibody blocks the binding of CD40·CD154 (page 8, line 5-10; page 13, lines 1-2) and is proposed for the treatment of autoimmune diseases (page 12). D4 indicates that the CD154 blocking agents can be Fab fragments of antibodies. The Fab-fragment of 5c8 is disclosed in D5 and was shown to bind to a three dimensional epitope of CD154 (page 18, lines 4-8). Thus D4 anticipates the subject-matter of claims 1-6, 21 (Article 33(2) PCT) because the claims are not limited to immunoglobulin single domain antibodies, but the scope includes Fab-fragments.

Independent claim 27 is directed to an antibody peptide, which monovalently binds to CD40L and which does not induce a certain degree of platelet aggregation. According to the description (pages 72-73), bivalent anti-CD40L tend to aggregate platelets whereas monovalent anti-CD40L antibody polypeptides do not induce platelet aggregation. Considering the applicants assertion that this property is not a generalised property of all monovalent anti-CD40L antibodies, this claim is defining products by a result to be achieved. The fact that the prior art does not use the uncommon parameter platelet aggregation to define the monovalent anti-CD40L antibodies does not mean that the prior art monovalent antibodies do not have the desired characteristics. If the applicant chooses to use an uncommon test and to arbitrarily set a cut-off limit to differentiate a product, from those present in the prior art, the applicant has to prove that the prior art products do not fall within the scope of the uncommon definition. As D1-D4 disclose monovalent antibody fragments, they inherently anticipate the subject-matter of claim 27 (Article 33(2) PCT).
It must be underlined that the present application does not provide any experimental data to support the properties relating to platelet aggregation and that even if the subject-matter of claim 27 would be acknowledged as novel, which is not the case, the subject-matter would not involve an inventive step because the technical effect was not shown for any compound.

Claims 90 and 91 are directed to antibody single variable domains, which inhibit the binding of the single domain antibody DOM8-24 or which bind to the same epitope as DOM8-24. The subject-matter of said claims can be considered as being novel

(Article 33(2) PCT). It does however not require any inventive skills to produce an antibody (including a full antibody), which inhibits the binding or competes with a single domain antibody for the binding to CD40L. There is no indication that a full antibody would have any surprising technical features except from some inhibition of the single domain antibody characterised by SEQ. ID. NO.: 26

Claim 43 is directed to an antibody, which specifically and monovalently binds CD40L, and which is further characterised by having an amino acid sequence having at least 85 % identity with a large number of sequences corresponding to single domain antibodies. The subject-matter of said claim can be considered to be new (Article 33(2) PCT). The production of antibodies against a known target (i.e. CD40L) does not involve an inventive step and no further technical effect can be attributed to the structural limitations of claim 43. Thus, claim 43 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

Claims 62, 63 are directed to single domain antibodies, which specifically and monovalently bind to CD40L and which are further characterised by an amino acid sequence to be selected among 191 sequences. The subject-matter of claims 62 and 63 can be considered as new (Article 33(2) PCT), but the provision of single domain antibodies against the known target CD40L does not involve an inventive step for the following reasons: D2 suggests the production of single domain antibodies against CD40L (see above) and the methods for producing single domain antibodies are well known in the art (see e.g. D6-D9). No additional technical effect can be attributed to all of the 191 sequences. It appears also highly improbable that all 191 sequences are able to significantly antagonize the binding of CD40L. If this would be the case it appears clearly that most of the single domain antibodies against CD40L which are binding to CD40L also have some antagonist effect. And therefore the subject-matter of claims 62 and 63 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

Independent claim 70 is directed to an extended release pharmaceutical formulation comprising a monovalent anti-CD40L antibody polypeptide. The subject-matter of claim 70 is novel (Article 33(2) PCT). The monovalent anti-CD40L is disclosed in the form of a single domain antibody in D2 (see above). D2 discloses the medical use of

CD40L and therefore the provision of an extended release form, which is standard practice in the pharmaceutical field does not require inventive skills. In addition it must be underlined that the scope of the formulations comprises multivalent single domain antibodies or other constructs and that the claims are not limited by the main characteristics of the single domain antibodies (small size, monovalency), which are used by the applicant in his attempt to argue in favor of an inventive step of single domain antibodies. Thus the subject-matter of claim 70 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT). The additional features of dependent claims 71 and 72 are inherently part of the disclosure of D2 and thus do not confer an inventive step on the subject-matter (Article 33(3) PCT).

Claim 73 is directed to a single variable domain polypeptide binding to CD40L, characterised by Seq. Id. No. 26 (which appears to correspond to DOM8-24). The experimental data in table 7 on pages 142 and 143 show that said antibody has an IC50 of 0.417 nM. The IC50 of the prior art anti-CD40L full antibody IDEC-131 is at 1 µg/ml for the complete antibody, (D3, page 285), which would correspond to approximately 7 nM for the Fab fragment. D3 states that the Fab-fragment has a similar potency than the full antibody (page 286). D2 (page 13) discloses that the antibody ABI793, has an IC50 of approximately 75 ng/ml. D2 discloses also that Fab fragments and single domain antibodies can be produced. A Fab fragment would have an IC50 of approximately 5 nM, due to the smaller molecular weight. As a single domain antibody with an equivalent potency having only approximately a quarter of the molecular weight of an Fab-fragment it can be expected that the IC50 of an equivalent single domain antibody lies around 1-2 nM D2 suggests the production of single domain antibodies and the techniques for producing single domain antibodies are well known in the art (see D6-D9). The provision of single domain antibodies with an IC50 which is equivalent to the IC50 for full antibodies, taking into account the smaller molecular weight of the single domain antibodies, does not require an inventive skill. The applicant's argument that an IC50 cannot be extrapolated from a full antibody to a Fab antibody cannot be followed, because the production of the Fab corresponds to the removal of antibody domains which are not involved in the binding tot the epitope. The aim of determining an IC50 in pharmacology is to be able to compare the "potency" of different compounds.

121

Extrapolation from one compound to another is the reason why IC50 is calculated and therefore extrapolation is fully justified. Thus the subject-matter of claim 73 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

Claims 74-89 are all directed to single domain antibodies or CD40L antagonists binding to CD40L and having a certain degree of sequence identity with DOM8-24. The subject-matter of said claims can be considered as new (Article 33(2) PCT). As the production of single domain antibodies or antibodies against a well known target does not involve inventive skills (see D6-D9) and as no surprising technical effect can be correlated with the partial structural identity with the non-inventive antibody DOM8-24, the subject-matter of claims 74-89 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

The subject-matter of claim 94 is new (Article 33(2) PCT) because the prior art does not disclose a single domain antibodies comprising the CDRs of DOM8-24. The said single domain antibody does not involve an inventive step, for the same reasons as those given above for claim 73 (Article 33(3) PCT).

The subject-matter of claims 95 and 97 (as far as searched, see item III-1) is novel (Article 33(2) PCT) , because the available prior art does not disclose the single domain antibodies listed in table 7 on page 142. The different single domain antibodies of table 7 do not involve an inventive step for the same reasons as those given for the single domain antibody characterised by SEQ ID NO. 26 (see objections for claim 73) (Article 33(3) PCT).

Claim 96 (original claim 98) is directed to a bispecific ligand comprising a first single variable domain binding to CD40L and a second single variable domain binding to an Antigen Presenting Cell surface antigen or a T cell surface antigen. D2 discloses a single domain antibody against CD40L (page 2, lines 5-7), which is to be combined with antibodies affecting immunomodulation and which directed against MHC, CD28, CTLA4 (page 17). The difference between D2 and claim 98 lies in the fact that in D2 the antibodies are administered as isolated antibodies, whereas in claim 98 they are part of a bispecific construct. The technical problem to be solved is the provision of an alternative method of administering the anti-CD40L antibody with other

immunosuppressive antibodies. The administration in the form of a bispecific single domain antibody is an obvious alternative in view of D10, which discloses how to produce bispecific single domain antibodies and which demonstrates that they keep their binding properties. Furthermore the present application lacks experimental results which would show a surprising effect for the constructs. Therefore the subject-matter of claim 96 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT). The additional features of the dependent claims 99-104 do not appear to be responsible for any surprising effects and thus do not confer an inventive step on the subject-matter of said claims (Article 33(3) PCT).

Dependent claims 7 and 8 are not anticipated by the available prior art, however the limitation by structural features of the domain antibody does not confer an inventive step on the method (Article 33(3) PCT).
Dependent claim 9 further restricts the antibody polypeptide by a wide range of IC50 concentrations, which cover the IC50s of the antibodies of the prior art (see D2). Said additional feature does not confer an inventive step on the subject-matter of claim 9
Dependent claims 10-19 refer to an increase of the serum half-life of the anti-CD40L antibody-polypeptide by linking it to PEG and are not disclosed in the prior art. As PEG is disclosed on page 488 of D7 to achieve exactly the same effect in single domain antibodies, the subject-matter of claims 10-19 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT). The same reasoning applies to independent claim 52 and to dependent claims 28-37, 53-61.
It appears that the additional features of the novel dependent claims 20, 22-26, 38-42, 45-51, 64-69 when considered alone or in combination do not generate any surprising effects which could for a basis for an inventive step reasoning (Article 33(3) PCT).

Further Remarks:

3. The claims referring to DOM8-24 are not clear (Article 6 PCT), because DOM8-24 is an internal denomination, which is not generally accepted in the field. The single domain antibody DOM8-24 should have been identified by its sequence. It appears

that DOM8-24 corresponds to DOM24 identified by Seq. Id. No. 26.

4. For the assessment of the present claims 1-20 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item VI

Certain documents cited

The published document (Rule 70 10)

Application No Patent No	Publication date *(day/month/year)*	Filing date *(day/month/year)*	Priority date *(valid claim)* *(day/month/year)*
WO05/035572	21.04.2005	08.10.2004	08 10.2003

is considered as not being part of the prior art (Rule 64.1 PCT). However this document may be of importance regarding novelty in a subsequent national/regional phase.

124

AMENDED CLAIMS

1. Use of an antibody polypeptide comprising a single variable domain polypeptide in the preparation of a medicament for treating or preventing a symptom of autoimmune disease, wherein said single variable domain polypeptide antagonizes an activity of CD40 or CD40L or both

2. The use according to Claim 1 wherein said autoimmune disease is a disease selected from the group consisting of systemic lupus erythematosis, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, Diabetes, allograft reiection, xenograft transplant reiection, and graft vs. host disease.

3. The use according to Claim 1 or 2 wherein the antibody polypeptide is monovalent for binding to CD40L (gp39).

4. The use according to any one of Claims 1 to 3 wherein said antibody polypeptide inhibits the binding of CD40L to CD40.

5. The use according to any one of Claims 1 to 4 wherein the antibody polypeptide consists of the single variable domain polypeptide.

6. The use according to any one of Claims 1 to 5 wherein said single variable domain polypeptide is a human antibody single variable domain polypeptide.

7. The use according to any one of Claims 1 to 6 wherein said single variable domain polypeptide is a V_H or V_L domain.

8. The use according to any one of Claims 1 to 7 wherein said antibody polypeptide comprises an amino acid selected from the selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7-82 and SEQ ID NOs 246-360.

9. The use according to any one of Claims 1 to 8 wherein said antibody polypeptide has an amino acid sequence that is at least 80% homologous to SEQ ID NO: 26.

10. The use according to any one of Claims 1 to 9 wherein said antibody polypeptide has an amino acid sequence that is identical to SEQ ID NO: 26.

125

11. The use according to any one of Claims 1 to 10 wherein binding of said antibody polypeptide to CD40L does not substantially agonize CD40 and/or CD40L activity.

12. The use according to any one of Claims 1 to 11 wherein the presence of said antibody polypeptide in a standard platelet aggregation assay does not result in aggregation of more than 25% over the aggregation observed in a negative control assay.

~~1~~13. A method of antagonizing an activity of CD40 or CD40L in an individual, the method comprising administering an antibody polypeptide that is monovalent for binding to CD40L (gp39) to said individual wherein said polypeptide antagonizes an activity of CD40 or CD40L or both, and wherein said polypeptide comprises a single variable domain polypeptide.

~~2~~14. A method of antagonizing the binding of CD40 to CD40L in an individual, the method comprising administering an antibody polypeptide that is monovalent for binding to CD40L (gp39) to said individual, wherein said polypeptide antagonizes the binding of CD40 to CD40L in said individual, and wherein said polypeptide comprises a single variable domain polypeptide.

~~3~~15. A method of treating or preventing a symptom of autoimmune disease in an individual, the method comprising administering a monovalent anti-CD40L antibody polypeptide to said individual in an amount effective to treat or prevent a symptom of autoimmune disease, wherein said polypeptide comprises a single variable domain polypeptide.

16. A method of treating or preventing an autoimmune disease in an individual, the method comprising administering a monovalent anti-CD40L antibody polypeptide to said individual in an amount effective to treat or prevent a symptom of autoimmune disease, wherein said polypeptide comprises a single variable domain polypeptide.

17. A method according to any one of Claims 13 to 16 wherein said polypeptide consists of a single variable domain polypeptide.

~~5~~18. The method of claim ~~3~~15, wherein said autoimmune disease is a disease selected from the group consisting of systemic lupus erythematosis, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, Diabetes, allograft rejection, xenograft transplant rejection, and graft vs. host disease.

~~6~~19. The method of claim ~~3~~15, wherein said antibody polypeptide inhibits the binding of CD40L to CD40.

~~7~~20. The method of claim ~~3~~15, wherein said antibody polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7-82 and~~,~~ SEQ ID NOs 246-360 ~~, and DOM8-24~~.

~~8~~21. The method of claim ~~3~~15, wherein said antibody polypeptide has an amino acid sequence at least 85% identical to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7-82 and 246-360, which antibody polypeptide specifically and monovalently binds CD40L.

~~9~~22. The method of claim ~~6~~19, wherein said antibody polypeptide inhibits binding of CD40L to CD40 with an IC_{50} in the range of 20 pM to 1.5 μM, inclusive.

~~10~~23. The method of claim ~~3~~15, wherein said antibody polypeptide is PEG-linked.

~~11~~24. The method of claim ~~10~~23, wherein said PEG-linked antibody polypeptide has a hydrodynamic size of at least 24 kD.

~~12~~25. The method of claim ~~10-~~23 wherein said PEG is linked to said antibody at a cysteine or lysine residue.

~~13~~26. The method of claim ~~10-~~23 wherein the total PEG size is from 20 to 60 kD, inclusive.

~~14~~27. The method of claim ~~10-~~23 wherein said PEG-linked antibody polypeptide has a hydrodynamic size of at least 200 kD.

~~15~~28. The method of claim ~~10-~~23 wherein said PEG-linked antibody polypeptide has an increased in vivo half-life relative to the same polypeptide composition lacking linked polyethylene glycol.

~~16~~29. The method of claim ~~15-~~28 wherein the tα-half life of the polypeptide composition is increased by 10% or more.

~~17~~30. The method of claim ~~15-~~28 wherein the tα-half life of the polypeptide composition is in the range of 0.25 minutes to 12 hours.

~~18~~31. The method of claim ~~15-~~28 wherein the tβ-half life of the polypeptide composition is increased by 10% or more.

127

~~19~~32. The method of claim ~~15~~28 wherein the tβ-half life is in the range of 12 to 48 hours.

~~20~~33. The method of claim ~~1~~13 or ~~2~~14 wherein said antibody polypeptide is a camelid or nurse shark V_{HH} domain.

~~21~~34. An antibody polypeptide that is monovalent for binding to CD40L (gp39), wherein binding of said antibody polypeptide to CD40L does not substantially agonize CD40 and/or CD40L activity.

~~22~~35. The antibody of claim ~~21~~34 wherein said antibody polypeptide inhibits the binding of CD40 to CD40L, and does not substantially agonize signaling by CD40.

~~23~~36. The antibody polypeptide of claim ~~21~~34 wherein binding of said antibody polypeptide to CD40L does not substantially induce JNK phosphorylation in Jurkat T-cells.

~~24~~37. The antibody polypeptide of claim ~~21~~34 wherein binding of said antibody polypeptide to CD40L does not substantially induce IFN-γ secretion by Jurkat T-cells co-stimulated with anti-CD3 antibody.

~~25~~38. The antibody polypeptide of claim ~~21~~34 wherein the presence of said antibody polypeptide in a standard platelet aggregation assay does not result in aggregation of more than 25% over the aggregation observed in a negative control assay.

~~26~~39. The antibody polypeptide of claim ~~21~~34 in which said antibody polypeptide is selected from the group consisting of an antibody single variable domain polypeptide, dAb, FAb, an scFv, an Fv, or a disulfide-bonded Fv.

~~27~~40. An antibody polypeptide that is monovalent for binding to CD40L (gp39), wherein the presence of said antibody polypeptide in a standard platelet aggregation assay does not result in aggregation of more than 25% over the aggregation observed in a negative control assay.

~~28~~41. ~~A PEG-linked~~The antibody polypeptide of claim ~~21~~34 wherein the polypeptide is PEG-linked.

~~29~~42. The PEG-linked antibody polypeptide of claim ~~28~~41 which has a hydrodynamic size of at least 24 kD.

128

3043. The PEG-linked antibody polypeptide of claim ~~28~~ 41 wherein said PEG is linked to said antibody at a cysteine or lysine residue.

3144. The PEG-linked antibody polypeptide of claim ~~28~~ 41 wherein the total PEG size is from 20 to 60 kD, inclusive.

3245. The PEG-linked antibody polypeptide of claim ~~28~~ 41 which has a hydrodynamic size of at least 200 kD.

3346. The PEG-linked antibody polypeptide of claim ~~28~~ 41 which has an increased in vivo half-life relative to the same polypeptide composition lacking linked polyethylene glycol.

3447. The PEG-linked antibody polypeptide of claim ~~33~~ 46 wherein the tα-half life of the polypeptide composition is increased by 10% or more.

3548. The PEG-linked antibody polypeptide of claim ~~33~~ 46 wherein the tα-half life of the polypeptide composition is in the range of 0.25 minutes to 12 hours.

3649. The PEG-linked antibody polypeptide of claim ~~33~~ 46 wherein the tβ-half life of the polypeptide composition is increased by 10% or more.

3750. The PEG-linked antibody polypeptide of claim ~~33~~ 46 wherein the tβ-half life is in the range of 12 to 48 hours.

3851. The antibody of claim ~~21~~ 34 which comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7-82 and 246-360.

3952. The antibody polypeptide of claim ~~21~~ 34 which is free of an Fc domain.

4053. The antibody polypeptide of claim ~~39~~ 52 wherein the presence of said antibody polypeptide in a standard platelet aggregation assay does not result in aggregation of more than 25% over the aggregation observed in a negative control assay.

4154. The antibody of claim ~~21~~ 34 which inhibits binding of CD40L to CD40 with an IC_{50} in the range of 20 pM to 1.5 μM, inclusive.

4255. A composition comprising the antibody polypeptide of claim ~~21~~ 34 and a second antibody polypeptide which binds a ligand other than CD40L, wherein said antibody

129

129

polypeptide which binds a ligand other than CD40L binds a ligand selected from the group consisting of HSA, TNFα, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN-γ, CD2, CD4, CD8, LFA1, LFA3, VLA4, CD80, B7-1, CD28, CD86, B7-2, CTLA-4 CD28, Inducible costimulatory molecule (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, Inducible costimulatory molecule ligand (ICOSL), OX40L, HVEM (Herpes Virus Entry Mediator), LIGHT.

~~43~~56. An antibody polypeptide which has an amino acid sequence at least 85% identical to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7-82, and SEQ ID NOs 246-360, ~~and DOM8-24,~~ which antibody polypeptide specifically and monovalently binds CD40L.

~~44~~57. An antigen-binding polypeptide, said polypeptide comprising an immunoglobulin single variable domain which specifically and monovalently binds CD40L, wherein said polypeptide substantially inhibits the binding of CD40L to CD40.

~~45~~58. The antigen-binding polypeptide of claim ~~44~~57 which inhibits the binding of CD40 to CD40L with an IC_{50} in the range of 20 pM to 1.5 μM, inclusive.

~~46~~59. The antigen-binding polypeptide of claim ~~44~~57 wherein binding of said polypeptide to CD40L does not substantially agonize CD40 and/or CD40L activity.

~~47~~60. The antigen-binding polypeptide of claim ~~44~~57 wherein binding of said polypeptide to CD40L does not substantially induce JNK phosphorylation in Jurkat T-cells.

~~45~~61. The antigen-binding polypeptide of claim ~~44~~57 wherein binding of said polypeptide to CD40L does not substantially induce IFN-γ secretion by Jurkat T-cells co-stimulated with anti-CD3 antibody.

~~46~~62. The antigen-binding polypeptide of claim ~~44~~57 wherein the presence of said antibody polypeptide in a standard platelet aggregation assay does not result in aggregation of more than 25% over the aggregation observed in a negative control assay.

~~47~~63. The antigen-binding polypeptide of claim ~~44~~57 in which said antigen-binding polypeptide is selected from the group consisting of an antibody single variable domain polypeptide, dAb, FAb, an scFv, an Fv, or a disulfide-bonded Fv.

4864. A polypeptide according to claim ~~21-~~34 or ~~44~~57, wherein the anti-CD40L variable domain or dAb comprises one or more framework regions comprising an amino acid sequence that is the same as the amino acid sequence of a corresponding framework region encoded by a human germline antibody gene segment, or the amino acid sequence of one or more of said framework regions collectively comprises up to 5 amino acid differences relative to the amino acid sequence of said corresponding framework region encoded by a human germline antibody gene segment.

4965. A polypeptide according to claim ~~21-~~34 or ~~44~~57, wherein the amino acid sequences of FW1, FW2, FW3 and FW4 of the anti-CD40L variable domain or dAb are the same as the amino acid sequences of corresponding framework regions encoded by a human germline antibody gene segment, or the amino acid sequences of FW1, FW2, FW3 and FW4 collectively contain up to 10 amino acid differences relative to the amino acid sequences of corresponding framework regions encoded by said human germline antibody gene segment.

~~50~~66. The polypeptide according to claim ~~49~~65, wherein the amino acid sequences of said FW1, FW2 and FW3 of the anti-CD40L variable domain or dAb are the same as the amino acid sequences of corresponding framework regions encoded by human germline antibody gene segments.

~~51~~67. The polypeptide according to claim ~~49~~65, wherein said human germline antibody gene segment is selected from the group consisting of DP47, DP45, DP48 and DPK9.

~~52~~68. A PEG-linked antigen-binding polypeptide comprising a single immunoglobulin variable domain which specifically and monovalently binds CD40L.

~~53~~69. The PEG-linked polypeptide of claim ~~52-~~68 which has a hydrodynamic size of at least 24 kD.

~~54~~70. The PEG-linked polypeptide of claim ~~52-~~68 wherein said PEG is linked to said antibody at a cysteine or lysine residue.

~~55~~71. The PEG-linked polypeptide of claim ~~52-~~68 wherein the total PEG size is from 20 to 60 kD, inclusive.

~~56~~72. The PEG-linked polypeptide of claim ~~52-~~68 which has a hydrodynamic size of at least 200 kD.

131

~~57~~73. The PEG-linked polypeptide of claim ~~52~~ 68 which has an increased in vivo half-life relative to the same polypeptide composition lacking linked polyethylene glycol.

~~58~~74. The PEG-linked polypeptide of claim ~~52~~ 68 wherein the tα-half life of the polypeptide composition is increased by 10% or more.

~~59~~75. The PEG-linked polypeptide of claim ~~52~~ 68 wherein the tα-half life of the polypeptide composition is in the range of 0.25 minutes to 12 hours.

~~60~~76. The PEG-linked polypeptide of claim ~~52~~ 68 wherein the tβ-half life of the polypeptide composition is increased by 10% or more.

~~61~~77. The PEG-linked polypeptide of claim ~~60~~ 76 wherein the tβ-half life is in the range of 12 to 48 hours.

~~62~~78. An immunoglobulin variable domain polypeptide, said polypeptide comprising a single immunoglobulin variable domain which specifically and monovalently binds CD40L, and which comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7-82~~,~~ and SEQ ID NOs 246-360~~, and DOM8-24~~.

~~63~~79. An immunoglobulin variable domain polypeptide which has an amino acid sequence at least 85% identical to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7-82~~,~~ and SEQ ID NOs 246-360~~, and DOM8-24~~, which polypeptide specifically and monovalently binds CD40L.

~~64~~80. The immunoglobulin variable domain polypeptide of claim ~~63~~ 79 which comprises a single immunoglobulin variable domain which specifically and monovalently binds CD40L.

~~65~~81. The immunoglobulin variable domain polypeptide of claim ~~63~~ 79 which antagonizes the binding of CD40L.

~~66~~82. The immunoglobulin variable domain polypeptide of claim ~~63~~ 79 which inhibits the binding of CD40 to CD40L and which has an IC50 in the range of 20 pM to 1.5 μM, inclusive.

132

~~67~~83. The immunoglobulin variable domain polypeptide of claim ~~63~~ 79 wherein said antigen-binding polypeptide inhibits the interaction of CD40 with CD40L, but does not substantially agonize signaling by CD40.

~~68~~84. A composition comprising the immunoglobulin variable domain polypeptide of claim ~~63~~ 79 and a second immunoglobulin variable domain polypeptide which binds a ligand other than CD40L.

~~69~~85. The composition of claim ~~68~~ 84 wherein said antibody polypeptide which binds a ligand other than CD40L binds a ligand selected from the group consisting of HSA, TNFα, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN-γ, CD2, CD4, CD8, LFA1, LFA3, VLA4, CD80, B7-1, CD28, CD86, B7-2, CTLA-4 CD28, Inducible costimulatory molecule (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, Inducible costimulatory molecule ligand (ICOSL), OX40L, HVEM (Herpes Virus Entry Mediator), LIGHT.

~~70~~86. An extended release pharmaceutical formulation comprising a monovalent anti-CD40L antibody polypeptide. wherein the antibody polypeptide comprises or consists of a single variable domain polypeptide.

~~71~~87. The extended release pharmaceutical formulation of claim ~~70~~86, wherein said antibody polypeptide is selected from the group consisting of a dAb, Fab, scFv, Fv, or a disulfide bonded Fv.

~~72~~88. The formulation of claim ~~70~~ 86 wherein said monovalent anti-CD40L antibody polypeptide comprises a single immunoglobulin variable domain that binds CD40L.

~~73~~89. An antibody single variable domain polypeptide that binds to CD40L, said polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~74~~90. An antibody single variable domain polypeptide that binds to CD40L, wherein the polypeptide has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26~~DOM8-24~~, or differs from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ at no more than 25 amino acid positions and has a sequence that is at least 80% homologous to the sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~75~~91. An antibody single variable domain polypeptide that binds to CD40L, wherein the polypeptide has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of SEQ

133

ID NO: 26~~DOM8-24~~, or differs from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ at no more than 25 amino acid positions and has a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~76~~92. An antibody single variable domain polypeptide that binds to CD40L, wherein the polypeptide has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26~~DOM8-24~~, or differs from the amino acid sequence of SEQ ID NO. 26 ~~DOM8-24~~ at no more than 25 amino acid positions and has a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~77~~93. An antibody single variable domain polypeptide that binds CD40L, wherein the polypeptide has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26~~DOM8-24~~, or differs from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ at no more than 25 amino acid positions and has a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~78~~94. An antibody single variable domain polypeptide that binds CD40L, wherein the dAb has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26~~DOM8-24~~, or differs from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26~~DOM8-24~~ at no more than 25 amino acid positions and has a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of SEQ ID NO: 26~~DOM8-24~~ and has a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24~~.

~~79~~95. An antibody single variable domain polypeptide that binds CD40L, wherein the dAb has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26~~DOM8-24~~, or differs from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ at no more than 25 amino acid positions and has a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ and has a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24~~.

~~80~~96. An antibody single variable domain polypeptide that binds CD40L, wherein the dAb has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26~~DOM8-24~~, or differs from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ at no more than 25 amino acid positions and has a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ and has a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24~~.

134

~~81~~97. An antibody single variable domain polypeptide that binds CD40L, wherein the dAb has an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26~~DOM8-24~~, or differs from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ at no more than 25 amino acid positions and has a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ and has a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ and has a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~82~~98. A CD40L antagonist having a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~83~~99. A CD40L antagonist having a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~84~~100. A CD40L antagonist having a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~85~~101. A CD40L antagonist having a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ and a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~86~~102. A CD40L antagonist having a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ and a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~87~~103. A CD40L antagonist having a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ and a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~88~~104. A CD40L antagonist having a CDR1 sequence that is at least 50% homologous to the CDR1 sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ and a CDR2 sequence that is at least 50% homologous to the CDR2 sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ and a CDR3 sequence that is at least 50% homologous to the CDR3 sequence of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

135

~~89~~105. The CD40L antagonist of claim ~~88~~104, wherein said antagonist is an antibody single variable domain polypeptide selected from the group consisting of an antibody single variable domain polypeptide, dAb, FAb, an scFv, an Fv, or a disulfide-bonded Fv.

~~90~~106. An antibody polypeptide that inhibits the binding of an antibody single variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 ~~DOM8-24~~ to CD40L.

~~91~~107. An antibody polypeptide that binds to the same epitope of CD40L bound by an antibody single variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~92~~108. A method of treating or preventing a symptom of autoimmune disease in an individual, the method comprising administering the antibody polypeptide of claim ~~90~~-106 or ~~91~~-95 to said individual in an amount effective to treat or prevent a symptom of autoimmune disease.

~~93~~109. An antibody polypeptide that binds to the same epitope of CD40L bound by an antibody single variable domain polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos: 7-82 and 246-360, wherein the antibody polypeptide comprises or consists of a single variable domain polypeptide. ~~:~~

~~94~~110. An antibody single variable domain polypeptide comprising the sequence of CDR1, CDR2, and~~/or~~ CDR3 of SEQ ID NO: 26.~~DOM8-24.~~

~~95~~111. An antibody single variable domain polypeptide comprising the sequence of CDR1, CDR2, and~~/or~~ CDR3 of an antibody single variable domain polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 7-82 and 246-360.

~~96. The antibody single variable domain polypeptide of claim 94, wherein said polypeptide comprises the sequence of two or more of CDR1, CDR2, or CDR3 of DOM8-24.~~

~~97. The antibody single variable domain polypeptide of claim 95, wherein said polypeptide comprises the sequence of two or more of CDR1, CDR2, or CDR3 of an antibody single variable domain polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 7-82 and 246-360.~~

~~98~~112. A dual specific ligand comprising a first immunoglobulin single variable domain having a binding specificity to a first antigen and a second single variable domain having a binding activity to a second antigen, wherein the first antigen is CD40L and the second single variable domain is an Antigen Presenting Cell surface antigen or a T cell surface antigen.

~~99~~113. A ligand according to claim ~~98~~ 112 wherein the Antigen Presenting Cell surface antigen is selected from one of the group consisting of, activated macrophage surface antigens, activated B cell surface antigens, co-stimulatory signal pathway surface antigens, and MHC.

~~100~~114. A ligand according to claim ~~99~~ 113 wherein the MHC is class II.

~~101~~115. A ligand according to claim ~~100~~ 114 wherein the MHC class II is alpha.

~~102~~116. A ligand according to claim ~~100~~ 114 wherein the MHC class II is beta.

~~103~~117. A ligand according to claim ~~99~~ 113 wherein the Antigen Presenting Cell surface antigen is selected from the group consisting of CD28, Inducible costimulatory molecule (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, Inducible costimulatory molecule ligand (ICOSL), OX40L, CD80, CD86, HVEM (Herpes Virus Entry Mediator), and LIGHT.

~~104~~118. A ligand according to claim ~~99~~ 113 wherein the Antigen Presenting Cell surface antigen is selected from the group consisting of CD28, Inducible costimulatory molecule (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, and CD3.

~~105~~119. A ligand according to claim ~~99~~ 113 wherein the surface antigen is a B7 gene surface antigen.

~~106~~120. A ligand according to claim ~~105~~ 119 wherein the B7 gene surface antigen is B7-2, or B7-1.

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

En ejercicio del derecho conferido por el Articulo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capitulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

COMPOSICIONES MONOVALENTES PARA EL ENLACE DE CD40L Y METODOS DE USO

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La invención se relaciona con polipéptidos de anticuerpo que se enlazan monovalentemente a CD40L. Los polipéptidos de anticuerpo que son monovalentes para el enlace a CD40L pueden inhibir la actividad de CD40L, mientras evitan los efectos indeseables potenciales que pueden ocurrir con anticuerpos de enlace divalente o multivalente de CD40L. En un aspecto, un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente consiste de o comprende un dominio variable de inmunoglobulina sencillo que se enlaza específicamente y antagoniza la actividad de CD40L, preferiblemente sin agonizar sustancialmente la actividad de CD40 y/o CD40L. En otro aspecto, el polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente es un polipéptido de anticuerpo humano. La invención abarca además métodos para antagonizar las interacciones CD40/CD40L en un individuo y métodos para tratar enfermedades o trastornos que involucran a las interacciones CD40/CD40L, los métodos involucran la administración de un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente al individuo.

COMPOSICIONES MONOVALENTES PARA EL ENLACE DE CD40L Y METODOS DE USO

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CD40 es una molécula de glicoproteína de superficie celular de 50 kD expresada en la superficie de células B maduras e inmaduras, macrófagos, células dendríticas foliculares, epitelio tímico, epitelio basal normal, y algunas líneas celulares derivadas de tumor La molécula CD40 es un miembro de la familia del receptor TNF, y tiene funciones de señalización importantes que conducen a una variedad de efectos descendentes en varios tipos de células. Estudios anteriores mostraron que el entrecruzamiento de CD40 sobre la superficie de célula B con un anticuerpo produjo la proliferación y activación de célula B. El entrecruzamiento del anticuerpo de CD40 en la presencia de IL-4 induce la proliferación y clase de cambio *in vitro*, agregación de célula B mediante LFA-1 (Gordon et al., 1988, J. Immunol. 140: 1425), y la fosforilación de serina/treonina y tirosina de un número de sustratos intracelulares (Gordon et al., 1988, supra; Uckun et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:17478). Los anticuerpos monoclonales anti-CD40 también ceban células B para proliferar en respuesta a agentes tales como PMA (Gordon et al., 1987, Eur. J. Immunol. 17· 1535) y anticuerpo anti-CD20 (Clark & Ledbetter, 1986, Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 4494).

Los estudios de homología del receptor de CD40 y el entrecruzamiento que muestran un papel central para CD40 en la activación de célula B provocó la búsqueda de un ligando natural. Se encontró que un mutante de la línea celular T Jurkat activa constitutivamente las células B humanas para secretar inmunoglobulina (Yellin et al., 1991, J. Immunol. 147: 3389-3395). Surgió un anticuerpo monoclonal, llamado 5c8, que reaccionó específicamente con la línea mutante, pero no con la lineal celular Jurkat base. El anticuerpo 5c8 inmunoprecipitó un polipéptido de superficie celular de 30 kD (más precisamente, 29.3 kD, 261 amino ácidos) y se encontró que inhibe específicamente la función colaboradora de célula B de la línea celular mutante. (Lederman et al., 1992, J. Exp. Med., 175: 1091-1101; Lederman et al., 1992, J. Immunol. 149: 3817-3826; Lederman et al., 1993, Curr. Opin. Immunol. 5: 439.444). El ligando del polipéptido de 30 kD del anticuerpo 5c8 se

llamó T-BAM, para la Molécula Activadora de célula T-B. Una segunda línea de estudios usó técnicas de clonación molecular para identificar polipéptidos que enlazan específicamente la molécula CD40. Los clones de cDNA para un ligando específico de CD40 se identificaron en un ensayo de enlace de CD40 y alternativamente se llamaron Ligando CD40 (CD40L), gp39, CD154, o TRAP (Graf et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22: 3191-3194; Armitage et al., 1992, Nature 357: 80-82, y Aruffo et al., 1993, Cell 72: 291-300). Posteriormente, se encontró que el clon de CD40L tiene la misma estructura que T-BAM (Covey et al , 1994, Mol. Immunol. 31: 471-484). La proteína de CD40L humana muestra 82.8% y 77.4% de identidad en los niveles de ácido nucleico y amino ácido, respectivamente, a una proteína similar aislada de células EL4 de timoma murino. Ambas proteínas son ligandos para el antígeno de superficie celular de CD40 expresado en las células B basales. CD40L también ha sido descrita como IMD3, una proteína involucrada en el síndrome de inmunodeficiencia hiper-IgM.

El gen humano que codifica CD40L mapea al cromosoma Xq26.3-q27. El gen contiene cinco exones. Se ha encontrado que las eliminaciones, mutaciones puntuales y mutaciones de desplazamiento del marco agrupadas dentro de una región limitada del dominio extracelular de CD40L que son las bases de un raro síndrome de inmunodeficiencia relacionado a X (síndrome de inmunodeficiencia Hiper-IgM, HIGMI) caracterizado por infecciones bacterianas recurrentes, muy baja o ausencia de IgG, IgA e IgE, y niveles normales a aumentados de IgM e IgD en suero. Se ha encontrado que las mutaciones relacionadas causalmente consisten en eliminaciones agrupadas que surgen por mutaciones de corte y empalme – donador con omisión de exón, mutaciones de corte y empalme – aceptor con utilización de un sito de corte y empalme críptico, y eventos de eliminación/inserción con la creación de un nuevo sitio de corte y empalme.

CD40L está expresada en células CD4+ T activadas pero no basal, y se encontró que juega un papel particularmente importante en la respuesta inmune humoral, estando ligado a la proliferación de célula B, producción de anticerpo y citocina, y viabilidad celular. *In vivo*, la eliminación o mutación de CD40L conduce a inmunodeficiencia severa, en ratones y en humanos, caracterizada por hipogamaglobulinemia y déficit de célula T en la inmunidad

de célula (Chess, C, 2001, en Therapeutic Immunology, 2ª edición, Austen, K.F., Burakoff, S., Rosen, F. y Strom, T., eds., Blackwell Sciences, pp. 441-456). Las células CD4+ T humandas infectadas por VIH1, que produce disfunción severa de inmunidad celular, pero paradójicamente produce activación policlonal intensa de células B, no expresan CD40L. Se ha mostrado que la expresión de gen y de superficie celular de la CD40L por células T activadas es deprimida en un subgrupo de pacientes con inmunodeficiencia variable común (CVI). Así, la señalización ineficiente mediante CD40 puede ser responsable, al menos en parte, de la falla de diferenciación de célula B en estos pacientes.

Las consecuencias funcionales del enlace de CD40L a CD40 incluyen, por ejemplo, a) rescate de células B de apoptosis inducida por Fas o entrecruzamiento de IgM, b) inducción de las moléculas co-estimuladoras CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) que interactúan con CD28 y CD 152 (CTLA-4) sobre la superficie de células T activadas, c) expresión aumentada de otras moléculas de activación de superficie celular incluyendo CD23, CD54, CD95 y linfotoxina-a; y d) inducción del cambio de clase de inmunoglobulina (ver Chess, supra, y referenciass 25, 44, y 47-60 citadas aquí). El enlace de CD40L a CD40 también aumenta las funciones que presentan antígeno de las células dendríticas, induciendo el mantenimiento de niveles altos de antígenos Clase II MHC y regulación ascendente de moléculas accesorias incluyendo CD58 (LF A-3). CD40L induce la producción de citocina y actividad tumoricida en monolitos de sangre periférica. CD40L también co-estimula la proliferación de células T activadas, y la co-estimulación está acompañada por la producción de IFN-γ, TNF-α e IL2. La expresión de CD40L en células colaboradoras T murinas y células CD4+ T es inhibida por IFN-γ, y es inhibida sobre las células colaboradoras T tipo 2 mediante TGF-β.

CD40L regula ascendentemente la expresión de CD54 mediante células Hodgkin y Reed- Sternberg cultivadas. La expresión de superficie de CD54 aumentada está acompañada por separación aumentada de la CD54 enlazada en la superficie.

También se ha sugerido que CD40L es importante en la inducción de tolerancia - CD80 y CD86, que son reguladas ascendentemente por CD40L,

interactúa con CD28 para proveer co-estimulación esencial de células T, en concierto con la activación del receptor de célula T, que produce la activación total de células T. En la ausencia de CD80 y activación desencadenada por CD86 de CD28, ocurre anergia o tolerancia como una consecuencia del desencadenamiento de antígeno (Linsley & Ledbetter, 1993, Ann. Rev. Immunol. 11: 191-212; Jenkins et al., 1993, Curr Opin. Immunol. 5: 361-367; y Boussiotis et al., 1996, Immunol. Rev. 153: 5- 26).

La ruta CD40L/CD40 ha estado implicada en el cebado *in vivo* de CD8+ linfocitos T citotóxicos (CTSs) mediante células CD4+ T. Como se notó, CD40L expresada en la superficie de células CD4+ T activadas interactúa con CD40 expresada en células dendríticas, induciendo las células dendríticas para expresar más MHC, y la señalización a través de CD40 puede reemplazar el requerimiento de células colaboradoras CD4+ T en el cebado de respuestas CD 8+ CTL. El bloqueo de CD40L inhibe el cebado de CTL, enfatizando el papel vital de las interacciones CD40L/CD40 en el cebado de CTL mediante células T colaboradoras (Ridge et al., 1998, Nature 393: 474-478; Schoenberger et al., 1998, Nature 393: 480-483; Bennett et al.,1998, Nature 393: 478-480).

CD40L también puede mediar las interacciones funcionales de células CD4+ T con otras células que expresan CD40, tales como fibroblastos, células sinoviales y células endoteliales (Yellin et al., 1995, J. Leuko. Biol. 58: 209-216; Yellin et al., 1995, J. Exp. Med. 182: 1857-1864). CD40L induce la expresión de CD54 (ICAM-I) y CD106 (VCAM- 1) mediante fibroblastos, así como el aumento de fibroblastos IL-6, producción de colagenasa y colágeno e induce la proliferación de fibroblasto. Así, las interacciones CD40L/CD40 pueden estar involucradas en la inducción de fibrosis asociadas con autoinmunidad y respuestas inmunes.

La interacción de CD40L con CD40 induce células endoteliales para que expresen CD62E (E- selectina), ICAM-1 y VCAM-1. La regulación ascendente de estas moléculas de adhesión puede estar involucrada en el enlace de células inflamatorias al endotelio vascular y la posterior migración de las células inflamatorias a sitios de inflamación. El bloqueo de CD40L retarda la migración de leucocitos a través de barreras celulares endoteliales. En modelos animales

de autoinmunidad, los anticuerpos a CD40L interfieren con la acumulación de células inflamatorias en el sitio de inflamación.

Las interacciones CD40/CD40L han estado implicadas en enfermedades que tienen una conexión inmune o autoinmune. Los modelos animales de enfermedad immune relacionada en la cual se ha demostrado que la ruta CD40L/CD40 juega un papel en la patología incluyen, por ejemplo, modelos murinos de lupus eritematoso sistémico (Lupus o SLE; ver, p.e., Kalled et al., 1998, J. Immunol. 160: 2158-2165), artritis (arthritis inducida por colágeno, ver, p.e., Durie et al., 1993, Science 261: 1328-1330), esclerosis múltiple (encefalomielitis autoinmune experimental, EAE; ver, p.e., Howard et al., 1999, J. Clin . Invest. 103: 281-290), tiroiditis autoimmune (tiroiditis autoimmune experimental, EAT; ver, p.e., Caryanniotis et al., 1997, Immunology 90: 421-426), colitis (colitis inducida por hapteno; ver, p.e., Stuber et al., 1996, J. Exp. Med. 183: 693-698), aterosclerosis y enfermedad de arteria coronaria (ver, p.e., Mach et al., 1998, Nature 394: 200-203), y rechazo de aloinjerto (ver, p.e., Parker et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 9560-9564; Kirk et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 8789-8794; Larsen et al., 1996, Nature 381 : 434-438 y Blazar et al., 1997, J. Immunol. 158: 29-39).

Ensayos de anticuerpo CD40L para el tratamiento de enfermedades inmunes relacionadas incluye estudios en pacientes con Lupus (ver, p.e., Huang et al., 2002, Arthritis Rheum. 46: 1554-1562). Un ensayo de Fase I demostró que el anticuerpo monoclonal anti-CD40L humanizado (IDEC-131) es seguro y bien tolerado por pacientes con Lupus (Davis et al., 2001, J. Rheumatol. 28: 95-101). Un estudio de Fase II con el anticuerpo IDEC-131 mostró mejoramiento en los síntomas clínicos, pero no se demostró la eficacia del fármaco sobre controles de placebo (Kalunian et al., 2002, Arthritis Rheum. 46: 3251-3258). En un estudio de fase II con el anticuerpo anti-CD40L BG9588, se demostró la eficacia clínica, pero el estudio fue terminado debido a la ocurrencia de eventos tromboembólicos (Boumpas et al., 2003, Arthritis Rheum. 48: 719-727).

Las Patentes U.S. Nos 5,474,771 (Lederman et al.) y 5,876,950 (Siadak et al.) revelan anticuerpos monoclonalres murinos específicos para diferentes

744

epítopos de gp39 humano. WO95/06666 (Noelle & Foy) revela anticuerpos anti-gp39 murinos.

La Patente U.S. No. 6,328,964 (Noelle & Claassen) revela métodos para el tratamiento de esclerosis múltiple usando anticuerpos específicos para gp39.

La Patente U.S. No. 5,747,037 (Noelle et al.), y EP0721469B1 (Ledbetter et al.) y su contraparte Americana U.S. 5,869,049 revela anticuerpos monoclonales (ratón) anti-humanos específicos para gp39. La Patente U.S. No. 5,876,718 (Noelle et al.) revela métodos para inducir la no sensibilidad de células T a tejidos trasplantados y del tratamiento de enfermedad de injerto-versus-hospedero con anticuerpos monoclonales (ratón) anti-gp39. EP0742721B1 (Noelle et al.) revela métodos para inhibir una "respuesta inmune humoral a un antígeno dependiente de timo que usa anticuerpos monoclonales (ratón) anti-gp39. La Patente U.S. No. 6,375,950 describe métodos para inducir la no sensibilidad de célula T a tejidos u órganos donadores en un receptor trasplantado a través del uso de anticuerpos monoclonales (ratón) anti-gp39.

EP1005372B1 (De Boer et al.) describe métodos para la eliminación selective de células CD40L+ T autorreactivas usando anticuerpo monoclonal (ratón) anti-CD40L-proteínas de fusion de toxina.

La Patente U.S. No. 6,340,459 (Yellin et al.) describe el uso del anticuerpo monoclonal anti gp39 murino 5c8 para el tratamiento o prevención de daño por reperfusión.

EP0831906B1 (Claassen et al.) describe métodos para el tratamiento de la destrucción de tejido mediada por célula T en enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple usando anticuerpos monoclonales (ratón) anti-gp39. Los anticuerpos usados en criterios terapéuticos en la técnica previa han sido anticuerpos divalentes de origen murino.

Se ha identificado un número de fragmentos de enlace a antígeno más pequeños que anticuerpos que se encuentran naturalmente siguiendo la digestión de proteasa. Estos incluyen, por ejemplo, el "fragmento Fab" (VL-CL-

CHI-VH), "fragmento Tab" (un Fab con la región bisagra de cadena pesada) y "fragmento $F(ab')_2$" (un dímero de fragmentos Fab' unidos por la región bisagra de cadena pesada). Se han usado métodos recombinantes para generar fragmentos de enlace a antígeno incluso más pequeños, referidos como "Fvde cadena sencilla" (fragmento variable) o "scFv," que consiste de V_L y V_H unidos por un enlazante de péptido sintético. Aunque generalmente se conoce que la unidad de enlace a antígeno de un anticuerpo que se encuentra naturalmente (p.e., en humanos y la mayoría de otros mamíferos) está comprendida de un par de regiones V (V_L/ V_H), las especies camélidas expresan una gran proporción de anticuerpos totalmente funcionales, altamente específicos que carecen de secuencias de cadena ligera. Los anticuerpos de cadena pesada camélidos se encuentran como homodímeros de una cadena pesada sencilla, dimerizada mediante sus regiones constantes. Los dominios variables de estos anticuerpos de cadena pesada camélidos son referidos como dominios V_HH y retienen la habilidad, cuando son aislados como fragmentos de la cadena V_H, de enlazar antígeno con alta especificidad ((Hamers-Casterman et al., 1993, Nature 363. 446-448; Gahroudi et al., 1997, FEBS Lett. 414: 521-526). Los dominios V_H sencillos de enlace a antígeno también han sido identificados de, por ejemplo, una biblioteca de genes V_H murinos amplificados del ADN genómico a partir de los bazos de ratones inmunizados, y expresados en *E. coli* (Ward et al., 1989, Nature 341: 544-546). Ward et al., nombró los dominios V_H sencillos aislados "dAbs" para "anticuerpos de dominio". El término "dAb" hará referencia aquí a un polipéptido de dominio variable (V_H o V_L) sencillo de anticuerpo que enlaza específicamente a antígeno. Un "dAb" enlaza a antígeno independientemente de otros dominios V; sin embargo, según el término usado aquí, un "dAb" puede estar presente en un homo- o heteromultímero con otros dominios V_H o V_L en donde los otros dominios no se requieren para el enlace a antígeno por el dAb, p.e., cuando el dAb se enlaza a antígeno independientemente de los dominios V_H o V_L adicionales.

Los dominios variables sencillos de anticuerpo, por ejemplo, V_HH, son la unidad de anticuerpo de enlace a antígeno más pequeña conocida. Para uso en terapia, se prefieren los anticuerpos humanos, principalmente porque no es tan probable que provoquen una respuesta inmune cuando son administrados a un paciente. Como se notó anteriormente, los dominios V_H no camélidos tienden a ser relativamente insolubles y usualmente están expresados

pobremente. Las comparaciones de V_HH camélido con los dominios V_H de anticuerpos humanos revelan varias diferencias claves en las regiones de marco del dominio V_HH camélido correspondiente a la interfaz V_H/V_L de los dominios V_H humanos. Se ha realizado la mutación de estos residuos de V_H3 humano para asemejar más cercanamente la secuencia V_HH (específicamente Gly 44 → Glu, Leu 45 → Arg y Trp 47 → Gly) para producir dominios VH humanos "camelizados" que retienen la actividad de enlace a antígeno (Davies & Riechmann, 1994, FEBS Lett. 339: 285-290) ya tienen expresión y solubilidad mejorada. (La numeración de amino ácido de dominio variable usada aquí es consistente con la convención de numeración Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Immunological Interest, 5ª ed. U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C.)) WO 03/035694 (Muyldermans) reporta que la mutación Trp 103 → Arg mejora la solubilidad de dominios V_H no camélidos. Davies & Riechmann (1995, Biotechnology N.Y. 13: 475-479) también reporta la producción de un repertorio de fago desplegado de dominios V_H humanos camelizados y selección de clones que enlazan hapteno con afinidades en el rango de 100-400 nM, pero los clones seleccionados para el enlace a antígeno de proteína tenían afinidades más débiles.

Aunque muchos anticuerpos y sus derivados son útiles para diagnostico y terapia, la farmacocinética ideal de los anticuerpos, usualmente no se logra para una aplicación particular. Con el fin de proveer mejoramiento en la farmacocinética de las moléculas de anticuerpo, la presente invención provee polipéptidos de región variable de dominio que están unidos a polímeros que proveen estabilidad y vida media mejoradas. La unión de las moléculas de polímero (p.e., polietilen glicol; PEG) a proteínas está bien establecida y ha mostrado que modula las propiedades farmacocinéticas de las proteínas modificadas. Por ejemplo, la modificación con PEG de proteínas ha mostrado que altera la vida media circulante *in vivo*, antigenicidad, solubilidad, y resistencia a la proteólisis de la proteína (Abuchowski et al., J Biol. Chem. 1977, 252:3578; Nucci et ah, Adv. Drug Delivery/ Reviews 1991, 6:133; Francis et al., Pharmaceutical Biotechnology Vol. 3 (Borchardt, R. T. ed.); y Stability of Protein Pharmaceuticals: in vivo Pathways of Degradation and Strategies for Protein Stabilization 1991 pp235-263, Plenum, NY).

La PEGilación específica al sitio y aleatoria de moléculas de proteína es conocida en la técnica (Ver, por ejemplo, Zalipsky y Lee, Polv(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications 1992, pp 347-370, Plenum, NY; Goodson y Katre, 1990, Bio/Technology, 8:343; Hershfield et al., 1991, PNAS 88:7185). Más específicamente, la pegilación aleatoria de moléculas de anticuerpo ha sido descrita en residuos de lisina y derivados tiolados (Ling y Mattiasson, 1983, Immunol. Methods 59: 327; Wilkinson et al., 1987, Immunol. Letters, 15 17, Kitamura et al., 1991, Cancer Res. 51:4310, Delgado et al., 1996 Br. J. Cancer, 73: 175; Pedley et al., 1994, Br. J. Cancer, 10:1126).

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención se relaciona con polipéptidos de anticuerpo que se enlazan monovalentemente a CD40L. Debido al a importancia de CD40L en la producción de anticuerpos, la interacción CD40/CD40L y las rutas presentan objetivos importantes para el desarrollo de criterios terapéuticos para el tratamiento de enfermedades y trastornos que involucran respuestas de anticuerpo inapropiadas o excesivas, tales como enfermedades autoinmunes. Los polipéptidos de anticuerpo que son monovalentes para el enlace a CD40L pueden inhibir la actividad de CD40L, incluyendo el enlace y activación de CD40 en la superficie de célula B y los efectos descendentes, mientras evitan los efectos indeseables potenciales que pueden ocurrir con anticuerpos de enlace divalente o multivalente de CD40L. Los polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L monovalentes también pueden ser aplicados a cualquiera de un número de usos para los cuales también se usan los anticuerpos divalentes estándar, p.e., representación y diagnóstico *in vivo*.

En un aspecto, el polipéptido de anticuerpo consiste o comprende un dominio variable sencillo que se enlaza específicamente y antagoniza la actividad de CD40L, preferiblemente sin agonizar sustancialmente la actividad de CD40 y/o CD40L. En otro aspecto, debido a que los anticuerpos humanos evitarán la generación de una respuesta inmune a los anticuerpos cuando son administrados a sujetos humanos para el tratamiento o prevención de la enfermedad, el polipéptido de anticuerpo es un polipéptido de anticuerpo

humano que se enlaza a CD40L, preferiblemente sin agonizar sustancialmente la actividad de CD40 y/o CD40L.

En resumen, en una realización, la invención provee un polipéptido de anticuerpo, preferiblemente un polipéptido de anticuerpo humano, que es monovalente para el enlace a CD40L (gp39).

En una realización, el polipéptido de anticuerpo humano se disocia del CD40L humano con un Kd en el rango de 50 nM a 20 pM, inclusive, medido mediante resonancia de plasmón superficial. Por ejemplo, el Kd para CD40L humano puede ser 25 nM a 20 pM, 10 nM a 20 pM, 5 nm a 20 pM, 1 nM a 20 pM, 0.5 nM a 20 pM, 0.1 nM a 20 pM, 0.1 nM a 50 nM, 75 pM a 20 pM o incluso 50 pM a 20 pM.

A menos que se declare de otra forma, todos los rangos aquí son inclusivos de los puntos extremos específicos.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo inhibe el enlace de CD40L a CD40.

En otra realización, el enlace del polipéptido de anticuerpo a CD40L no agoniza sustancialmente la actividad de CD40 y/o CD40L.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo humano inhibe el enlace de CD40 a CD40L, y no agoniza sustancialmente la señalización mediante CD40.

En otra realización, el enlace del polipéptido de anticuerpo a CD40L no induce sustancialmente la fosforilación JNK en células T Jurkat.

En otra realización, el enlace del polipéptido de anticuerpo a CD40L no induce sustancialmente la secrecion de IFN-γ por células T Jurkat co-estimuladas con anticuerpo anti-CD3.

En otra realización, la presencia del polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaquetas estándar no produce la agregación de más

de 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo realizado sin la adición de anticuerpo.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo humano comprende un dominio variable de inmunoglobulina sencillo que se enlaza a CD40L. En una realización preferida, el dominio variable de inmunoglobulina sencillo es un dominio V_H o uno V_L.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un dAb, un FAb, un scFv, un Fv, o un Fv enlazado a disulfuro.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo humano está enlazado a PEG. En una realización, el PEG está unido covalentemente al polipéptido de anticuerpo humano. En una realización preferida, el polipéptido de anticuerpo humano enlazado a PEG tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 24 kD. IEn otra realización preferida, el PEG está unido al polipéptido de anticuerpo en un residuo de cisteína o lisina. En otra realización preferida, el tamaño total del PEG es de 20 a 60 kD, inclusive. En otra realización preferida, el polipéptido de anticuerpo humano enlazado a PEG tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 200 kD.

En una realización, el polipéptido de anticuerpo tiene una vida media *in vivo* aumentada con relación a la misma composición de polipéptido de anticuerpo que no tiene polietilen glicol.

En otra realización, la vida media $t\alpha$ de la composición de polipéptido de anticuerpo es aumentada en 10% o más. En otra realización, la vida media $t\alpha$ de la composición de polipéptido de anticuerpo es aumentada en 50% o más. En otra realización, la vida media $t\alpha$ de la composición de polipéptido de anticuerpo es aumentada en 2X o más. En otra realización, la vida media $t\alpha$ de la composición de polipéptido de anticuerpo es aumentada en 5X o más, p.e., 10X, 15X, 20X, 25X, 30X, 40X, o más. En otra realización, la vida media $t\alpha$ de la composición de polipéptido de anticuerpo es aumentada en 50X o más.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG tiene una vida media $t\alpha$ de 0.25 a 6 horas, inclusive. En otra realización, la mida

media tα está en el rango de 30 minutos a 12 horas, inclusive. En otra realización, la vida media tα de la composición de polipéptido de anticuerpo está en el rango de 1 a 6 horas.

En otra realización, la vida media tβ de la composición de polipéptido de anticuerpo es aumentada en 10% o más. En otra realización, la vida media tβ de la composición de polipéptido de anticuerpo es aumentada en 50% o más. En otra realización, la vida media tβ de la composición de polipéptido de anticuerpo es aumentada en 2X o más. En otra realización, la vida media tβ de la composición de polipéptido de anticuerpo es aumentada en 5X o más, p.e., 10X, 15X, 20X, 25X, 30X, 40X, o más. En otra realización, la vida media tβ de la composición de polipéptido de anticuerpo es aumentada en 50X o más.

En otra realización, la composición de polipéptido de anticuerpo tiene una vida media tβ de 1 a 170 horas, inclusive. En otra realización, la vida media tβ está en el rango de 12 a 48 horas, inclusive. En otra realización, la vida media tβ está en el rango de 12 a 26 horas, inclusive.

Adicionalmente, o alternativamente a los criterios adicionales, la presente invención provee una composición que contiene dAb, que comprende un ligando de acuerdo con la invención que tiene un valor de AUC (area bajo la curva) en el rango de 1 mg.min/ml o más. En una realización, el extreme inferior del rango es 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 o 300 mg.min/ml. Adicionalmente, o alternativamente, un ligando o composición de acuerdo con la invención tiene un AUC en el rango de hasta 600 mg.min/ml. En una realización, el extreme superior del rango es 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 o 50 mg.min/ml. Concenientemente, un ligando de acuerdo a la invención tendrá un AUC en el rango seleccionado del grupo que consiste de 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.

En otra realización, los polipéptidos de anticuerpo descritos aquí pueden estar enlazados a albúmina de suero humana (HSA), que también tiene el efecto de aumentar la vida media *in vivo* de la molécula. Las secuencias codificadoras de la albúmina de suero humana se pueden obtener mediante PCR usando cebadores derivados de la secuencia de cADN disponible en el GenBank Acceso No. NM000477. Tales secuencia sde codificación pueden

estar fusionadas a la secuencia de codificación para un polipéptido anti-CD40L monovalente como se describe aquí, y la fusión puede ser expresada por el experto en la técnica.

En otra realización, la vida media tα de la composición de polipéptido de anticuerpo humano enlazado a HSA es aumentada en 10% o más.

En otra realización, la vida media tα de la composición de polipéptido de anticuerpo humano enlazado a HSA está en el rango de 0.25 horas a 6 horas.

En otra realización, la vida media tβ de la composición de polipéptido de anticuerpo humano enlazado a HSA es aumentada en 10% o más

En otra realización, la vida media tβ de la composición de polipéptido de anticuerpo humano enlazado a HSA está en el rango de 12 a 48 horas. En otra realización, el polipéptido de anticuerpo humano comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs 7-82 y 246-360.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo humano inhibe el enlace de CD40L a CD40 con un IC_{50} en el rango de 20 pM a 1.5 μM, inclusive; El IC_{50} para la inhibición del enlace de CD40L a CD40 en cualquier realización descrita aquí se mide preferiblemente como se describe en el Ejemplo 6. El IC_{50} puede estar preferiblemente en el rango de 20 pM a 1 μM, 20 pM a 900 nM, 20 pM a 800 nM, 20 pM a 700 nM, 20 pM a 600 nM, 20 pM a 500 nM, 20 pM a 400 nM, 20 pM a 300 nM, 20 pM a 200 nM, 20 pM a 100 nM, o 20 pM a 50 nM. Rangos adicionales aceptables o preferidos incluyen, por ejemplo, 50 pM a 1 μM, 100 pM a 500 nM, 125 pM a 250 nM, 150 pM a 200 nM, 150 pM a 100 nM y 200 pM a 50 nM.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo está fusionado a un segundo polipéptido de anticuerpo que se enlaza a un ligando diferente a CD40L. En una realización preferida, el polipéptido de anticuerpo que se enlaza a un ligando diferente de CD40L, se enlaza a un ligando seleccionado del grupo que consiste de HSA, TNFα, IL-I , IL-2, IL-4, IL-6, IL- 8, IL-12, IL-18, IFN-

γ, CD2, CD4, CD8, CTLA4, LFAI, LFA3, VLA4, CD80 (B7-1), CD28, CD86 (B7-2), y CTLA-4.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo humano está libre de un dominio Fc. Los límites de un dominio Fc están indicados en in Kabat et al (1991, Sequences of Immunological Interest, 5a ed. U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C; incorporada aquí para referencia). En la alternativa, un dominio Fc consiste de las regiones CH2-CH3, que incluyen opcionalmente una región bisagra enlazada al CH2. En una realización preferida, el polipéptido de anticuerpo humano no media la agregación de plaquetas en un ensayo de agregación de plaquetas estándar.

La invención abarca además un polipéptido de anticuerpo humano que tiene una secuencia de amino ácido al menos 85% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs 7-82 y 246-360, cuyo polipéptido de anticuerpo se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L. La invención abarca además un polipéptido que se enlaza a antígeno, el polipéptido comprende un dominio variable de inmunoglobulina sencillo que se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L. Dicho en otras palabras, la invención abarca además un polipéptido que comprende una mitad que se enlaza específicamente a CD40L, cuya mitad consiste de un dominio variable de inmunoglobulina sencillo.

En una realización, el polipéptido consiste de un dominio variable de inmunoglobulina sencillo.

En otra realización, el polipéptido tiene un Kd para CD40L humano en el rango de 50 nM a 20 pM, inclusive, determinado mediante resonancia de plasmón superficial. Por ejemplo, el Kd para CD40L humano puede ser de 25 nM a 20 pM, 10 nM a 20 pM, 5 nm a 20 pM, 1 nM a 20 pM, 0.5 nM a 20 pM, 0.1 nM a 20 pM, 75 pM a 20 pM o incluso 50 pM a 20 pM.

En otra realización, el polipéptido inhibe el enlace de CD40L a CD40

En otra realización, el polipéptido inhibe el enlace de CD40 a CD40L y tiene un IC_{50} en el rango de 20 pM a 1.5 μM, inclusive. Por ejemplo, el IC_{50}

puede estar en el rango de 20 pM a 1 μM, 20 pM a 900 nM, 20 pM a 800 nM, 20 pM a 700 nM, 20 pM a 600 nM, 20 pM a 500 nM, 20 pM a 400 nM, 20 pM a 300 nM, 20 pM a 200 nM, 20 pM a 100 nM, o 20 pM a 50 nM. Rangos adicionables aceptables o preferidos incluyen, por ejemplo, 50 pM a 1 μM, 100 pM a 500 nM, 125 pM a 250 nM, 150 pM a 200 nM, 150 pM a 100 nM y 200 pM a 50 nM.

En otra realización, el enlace del polipéptido a CD40L no agoniza sustancialmente la actividad de CD40 y/o CD40L.

En otra realización, el enlace del polipéptido a CD40L no induce sustancialmente la fosforilación JNK en células T Jurkat. En otra realización, el enlace del polipéptido a CD40L no induce sustancialmente la secreción de IFN-γ por células T Jurkat co-estimuladas con anticuerpo anti-CD3.

En otra realización, la presencia del polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaquetas estándar no produce agregación en más del 25% sobre la abregación observada en un ensayo de control negativo sin polipéptido de anticuerpo.

En otra realización, el dominio variable de inmunoglobulina sencillo es un dominio variable de inmunoglobulina sencillo humano.

En otra realización, el dominio variable de inmunoglobulina sencillo es un dominoi V_H o uno V_L.

En una realización, el polipéptido está enlazado a PEG. En una realización, el PEG está enlazado covalentemente. En una realización preferida, el polipéptido de enlace a anticuerpo, enlazado a PEG tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 24 kD. En otra realización preferida, el PEG está enlazado al polipéptido de enlace a antígeno en un residuo de cisteína o lisina. En otra realización preferida, el tamaño total del PEG es de 20 a 60 kD, inclusive. En otra realización preferida, el polipéptido de enace a antígeno, enlazado a PEG tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 200 kD.

En otra realización, el polipéptido enlazado a PEG tiene una vida media *in vivo* aumentada con relación a la misma composición de polipéptido que no tiene polietilen glicol enlazado. En otra realización, la vida media tα de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más. En otra realización, la vida media tα de la composición de polipéptido es aumentada en 50% o más. En otra realización, la vida media tα de la composición de polipéptido es aumentada en 2X o más. En otra realización, la vida media tα de la composición de polipéptido es aumentada en 5X o más, p.e., 10X, 15X, 20X, 25X, 30X, 40X, o más. En otra realización, la vida media tα de la composición de polipéptido es aumentada en 50X o más.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG tiene una vida media tα de 0.25 a 6 horas, inclusive. En otra realización, vida media tα está en el rango de 30 minutos a 12 horas, inclusive. En otra realización, vida media tα de la composición de polipéptido está en el rango de 1 a 6 horas.

En otra realización, la vida media tβ de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más. En otra realización, la vida media tβ de la composición de polipéptido es aumentada en 50% o más. En otra realización, la vida media tβ de la composición de polipéptido es aumentada en 2X o más. En otra realización, la vida media tβ de la composición de polipéptido es aumentada en 5X o más, p.e., 10X, 15X, 20X, 25X, 30X, 40X, o más. En otra realización, la vida media tβ de la composición de polipéptido es aumentada en 50X o más.

En otra realización, la composición de polipéptido de anticuerpo tiene una vida media tβ de 1 a 170 horas, inclusive. En otra realización, la vida media tβ está en el rango de 12 a 48 horas, inclusive. En otra realización, vida media tβ está en el rango de 12 a 26 horas, inclusive.

En otra realización, la composición tiene un valor de AUC (área bajo la curva) en el rango de 1 mg.min/ml o más. En una realización, el extreme inferior del rango es 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 o 300 mg.min/ml. Adicionalmente, o alternativamente, un ligando o composición de acuerdo con la invención tiene un AUC en el rango de hasta 600 mg.min/ml. En una

realización, el extreme superior del rango es 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 o 50 mg.min/ml. Convenientemente, un ligando de acuerdo con la invención tendrá un AUC en el rango seleccionado del grupo consistente de 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.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo está enlazado a albúmina de suero humana (HSA). En otra realización, el polipéptido de anticuerpo tiene una vida media in vivo aumentada con relación a la misma composición de polipéptido sin HSA enlazado. En otra realización, el polipéptido de anticuerpo tiene una vida media tα that es aumentada en 10% o más con relación a una molécula que no tiene HSA enlazado. En otra realización, la vida media tα de la composición de polipéptido está en el rango de 0.25 minutos a 6 horas. En otra realización, la vida media tβ de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más. En otra realización, la vida media tβ está en el rango de 12 a 48 horas.

En otra realización, el polipéptido que se enlaza a antígeno comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs 7-82 y 246-360.

En otra realización, el polipéptido que se enlaza a antígeno está libre de un dominio Fc.

En otro aspecto, la invención abarca un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina que tiene una secuencia de amino ácido al menos 85% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs 7-82 y 246-360, cuyo polipéptido se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L.

En una realización, el polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina antagoniza el enlace de CD40L a CD40.

En otra realización, el polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina inhibe el enlace de CD40 a CD40L y tiene un IC_{50} en el rango de 20 pM a 1.5 μM, inclusive. Por ejemplo, el IC_{50} puede estar en el rango de

20 pM a 1 μM, 20 pM a 900 nM, 20 pM a 800 nM, 20 pM a 700 nM, 20 pM a 600 nM, 20 pM a 500 nM, 20 pM a 400 nM, 20 pM a 300 nM, 20 pM a 200 nM, 20 pM a 100 nM, o 20 pM a 50 nM. Rangos adicionales aceptables o preferidos incluyen, por ejemplo, 50 pM a 1 μM, 100 pM a 500 nM, 125 pM a 250 nM, 150 pM a 200 nM, 150 pM a 100 nM y 200 pM a 50 nM.

En otra realización, el polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina inhibe la interacción de CD40 con CD40L, pero no agoniza sustancialmente la señalización intracelular por CD40. En una realización preferida, el enlace del polipéptido a CD40L no induce sustancialmente la fosforilación JNK en células T Jurkat. En otra realización preferida, el enlace del polipéptido a CD40L no induce sustancialmente la secreción de IFN-γ por células T Jurkat co-estimuladas con anticuerpo anti-CD3. En otra realización preferida, el enlace del polipéptido de anticuerpo a CD40L no induce sustancialmente la agregación de plaquetas enun ensayo de agregación de plaquetas.

En otra realización, el polipéptido que se enlaza a antígeno comprende además un segundo polipéptido de anticuerpo que se enlaza a un ligando diferente de CD40L. En una realización preferida, el segundo polipéptido de anticuerpo se enlaza a un ligando seleccionado del grupo que consiste de HSA, TNFα, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN-γ, CD2, CD4, COS, CTLA4, LFA1, LFA3 y VLA4.

En una realización, la invención se relaciona con un polipéptido de anticuerpo que comprende un dominio variable de inmunoglobulina que se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L (p.e., un dAb anti-CD40L, FAb, un scFv, un Fv, o un Fv enlazado a disulfuro), y que comprende una o más regiones de marco que comprenden una secuencia de amino ácido que es la misma que la secuencia de amino ácido de una región de marco correspondiente codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana, o la secuencia de amino ácido de una o más de dichas regiones de marco comprende colectivamente hasta 5 diferencias de amino ácido con relación a la secuencia de amino ácido de dicha región de marco correspondiente codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana.

En una realización, la secuencia de amino ácidos de FW1, FW2, FW3 y FW4 del dominio variable anti-CD40L o dAb son las mismas que la secuencia de amino ácidos de regiones de marco correspondientes codificadas por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana, o la secuencia de amino ácidos de FW1 , FW2, FW3 y FW4 colectivamente contienen hasta 10 diferencias de amino ácido con relación a la secuencia de amino ácidos de las regiones de marco correspondientes codificadas por dicho segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana. En una realización adicional, la secuencia de amino ácidos de FW1, FW2 y FW3 del dominio vriable anti-CD40L o dAb son las mismas que la secuencia de amino ácidos de regiones de marco correspondientes codificadas por segmentos de gen de anticuerpo de línea germinal humana.

En una realización adicional de la anterior, el segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana puede ser seleccionado del grupo que consiste de DP47, DP45. DP48 y DPK9.

La invención abarca además un método para antagonizar el enlace de CD40 a CD40L en un individuo, el método comprende administrar un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente como se describe aquí al individuo, en donde el polipéptido antagoniza el enlace de CD40 a CD40L en el individuo.

La invención abarca además un método para antagonizar una actividad de CD40 o CD40L en un individuo, el método comprende administrar un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente como se describe aquí al individuo, en donde el polipéptido antagoniza una actividad de CD40 o CD40L o ambas.

La invención abarca además una composición que comprende una formulación de liberación prolongada que comprende un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente. preferiblemente, pero sin limitarse a, un polipéptido que comprende un dominio variable de inmunoglobulina sencillo que se enlaza a CD40L. En una realización, el dominio variable de inmunoglobulina sencillo es un dominio variable de inmunoglobulina sencillo

mamífero no humano. En otra realización, el dominio variable de inmunoglobulina sencillo es un dominio variable de inmunoglobulina sencillo humano.

La invención abarca además un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno mediado por CD40L en un individuo en necesidad de tal tratamiento, el método comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente, preferiblemente una composición que comprende un dominio variable de inmunoglobulina humana sencillo que se enlaza a CD40L. En una realización, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno autoinmune.

La invención abarca además un método para tratar o prevenir un síntoma de lupus eritematoso sistémico (SLE) en un individuo, el método comprende administrar un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente a dicho individui en una cantidad efectiva para tratar o prevenir un síntoma de SLE. La invención abarca además un método para reducir o eliviar un síntoma de una enfermedad tal como lupus eritematoso sintético, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, rechazo de aloinjerto, rechazo de xenoinjerto, y Diabetes, incluyendo Diabetes Tipo I dependiente de insulina.

La invención abarca además un polipéptido de anticuerpo que es monovalente para el enlace a CD40L, en donde el polipéptido de anticuerpo comprende un marco universal.

En una realización, el marco universal comprende un marco V_H seleccionado del grupo que consiste de DP47, DP45 y DP38, y/o el marco V_L es DPK9.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo comprende un sitio de enlace de ligando genérico. En otra realización, el sitio de enlace de ligando se enlaza a un ligando genérico seleccionado del grupo que consiste de proteína A, proteína L y proteína G.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo comprende un dominio variable que tiene una o más regiones de marco que comprenden una secuencia de amino ácido que es la misma que la secuencia de amino ácido de la región de marco correspondiente codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana, o la secuencia de amino ácidos de una o más regones de marco comprende colectivamente hasta 5 diferencias de amino ácido con relación a la secuencia de amino ácido de la región de marco correspondiente codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo comprende un dominio variable, en donde la secuencias de amino ácido de FW1, FW2, FW3 y FW4 son las mismas que la secuencias de amino ácido de regiones de marco correspondientes codificadas por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana, o las secuencias de anticuerpo de FW1, FW2, FW3 y FW4 contienen colectivamente hasta 10 diferencias de amino ácido con relación a las secuencias de amino ácido de regiones de marco correspondientes codificadas por el segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana.

En otra realización, el polipéptido de anticuerpo comprende un dominio variable de anticuerpo que comprende regiones FW1, FW2 y FW3, y la secuencia de amino ácido de dichas FW1, FW2 y FW3 son las mismas que las secuencias de amino ácido de regiones de marco correspondientes codificadas por segmentos de gen de anticuerpo de línea germinal humana. En otra realización, el segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana es seleccionado del grupo que consiste de DP47, DP45, DP48 y DPK9.

La invención incluye un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el polipéptido tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de DOM8-24, o difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24 en no más de 25 posiciones de amino ácido y tiene una secuencia que es al menos 80% homóloga a la secuencia de DOM8-24. En una realización, el polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24 en 25 oo menos posiciones de amino ácido, 20 o menos posiciones de amino ácido, 15 o menos posiciones de amino ácido, 10 o menos

posiciones de amino ácido, 5 o menos posiciones de amino ácido, 2 o menos posiciones de amino ácido, o tan poco como una posición de amino ácido. En una realización, el polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo es al menos 80% homólogo a la secuencia de DOM8-24, por ejemplo, al menos 85% homólogo, al menos 90% homólogo, al menos 95% homólogo, y hasta e incluyendo 96%, 97%, 98%, o 99% homólogo.

La invención incluye un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el polipéptido tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de DOM8-24, o difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24 en no más de 25 posiciones de amino ácido y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24, o tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24, o tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8- 24.

La invención también incluye un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el dAb tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de DOM8-24, o difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24 en no más de 25 posiciones de amino ácido y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24 y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24.

La invención también incluye un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el dAb tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de DOM8-24, o difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24 en no más de 25 posiciones de amino ácido y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24 y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

La invención también incluye un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el dAb tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de DOM8-24, o

difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24 en no más de 25 posiciones de amino ácido y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24 y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

La invención también incluye un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, en donde el dAb tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de DOM8-24, o difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24 en no más de 25 posiciones de amino ácido y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24 y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24 y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

En una realización, el polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza a CD40L, si no es idéntico en secuencia al de DOM8-24, difiere de la secuencia de amino ácido de DOM8-24 en 25 o menos posiciones de amino ácido, 20 o menos posiciones de amino ácido, 15 o menos posiciones de amino ácido, 10 o menos posiciones de amino ácido, 5 o menos posiciones de amino ácido, 2 o menos posiciones de amino ácido, o tan poco como una posición de amino ácido.

La invención también incluye un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24.

La invención también incluye un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24.

La invención también incluye un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

La invención también incluye un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24 y una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24.

La invención también incluye un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24 y una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

La invención también incluye un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24 y una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

La invención también incluye un antagonista de CD40L que tiene una secuencia CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de DOM8-24 y una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de DOM8-24 y una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de DOM8-24.

En una realización, el antagonista de CD40L inhibe el enlace de CD40 a CD40L, y/o inhibe una actividad de CD40 y/o CD40L, y/o produce mo más del 25% de agregación de plaquetas en un ensayo de agregación de plaquetas. En una realización, el antagonista produce una agregación de plaquetas de 25% o menos, 20% o menos, 15% o menos, 10% o menos, 5% o menos, y tan poco como cero agregación de plaquetas.

La invención también incluye un ligando específico dual que comprende un primer dominio variable sencillo de inmunoglobulina que tiene una especificidad de enlace a un primer antígeno y un segundo dominio variable sencillo que tiene una actividad de enlace a un segundo antígeno, en donde el primer antígeno es CD40L y el enlace del segundo dominio variable sencillo al segundo antígeno actúa para aumentar la vida media del ligando *in vivo*. En una realización, el ligando específico dual es una inmunoglobulina IgG de cuatro cadenas.

En una realización, la IgG de cuatro cadenas comprende dos ligandos específicos duales, dichos ligandos específicos duales son diferentes en sus dominios variables.

La invención también incluye un ligando específico dual que comprende un dAb CDL40 anti-humano y un dAB anti-SA.

En una realización, los dAbs son dominios V_{HH} camélidos.

En una realización del ligando específico dual, ya sea (i) el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son dominios variables de cadena pesada; o (ii) el primer y segundo dominios variables de inmunoglobulina son dominios variables de cadena ligera.

En una realización, el ligando se provee como una inmunoglobulina IgG que comprende cuatro dominios variables sencillos de cadena pesada o cuatro dominios variables sencillos de cadena ligera. La cadena pesada puede comprender dominios VHH camélidos.

En una realización adicional del ligando específico dual, el primer y segundo dominios se enlazan independientemente, de forma que el ligando específico dual puede enlazarse simultáneamente a los antígenos primero y segundo

En una realización del ligando específico dual, el primer dominio variable sencillo tiene una constante de disociación (Kd) de $1x10^{-8}$ M o menos para CD40L humano, y una constante de velocidad K_{off} de $1x10^{-3}s^{-1}$ o menos, determinada mediante resonancia de plasmón superficial.

En una realización del ligando específico dual, el segundo dominio variable sencillo es específico para albúmina de suero (SA) y tiene una constante de disociación (Kd) de 1nM a 500 µm para SA, determinada mediante resonancia de plasmón superficial.

En una realización adicinal, el segundo dominio se enlaza a SA en un enayo de enlace de ligando estándar con un IC50 de 1nM a 500μM. El segundo dominio variable sencillo puede ser específico para SA, y comprende la secuencia de amino ácido de MSA-16 o una secuencia que es al menos 80% homóloga a este. Alternativamente, el segundo dominio variable sencillo puede ser específico para SA, y comprende la secuencia de amino ácido de MSA-26 o una secuencia que es al menos 80% homóloga a este.

En una realización del ligando específico dual, el dominio variable de anti-CD40L o dAb comprende un marco universal. El dominio variable de anti-CD40L o dAb puede también comprender un marco V_H seleccionado del grupo que consiste de DP47, DP45 y DP38; o un marco V_L que es DPK9. En una realización adicional, el ligando específico dual o dAb puede comrender un sitio de enlace para un ligando genérico.

En una realización, el sitio de enlace de ligando genérico es seleccionado del grupo que consiste del sitio de enlace de proteína A, proteína L y proteína G.

En una realización del ligando específico dual, el dominio variable de anti-CD40L o dAb comprende una o más regiones de marco que comprenden una secuencia de amino ácido que es la misma que la secuencia de amino ácido de una regió de marco correspondiente codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana, o la secuencia de amino ácido de una o más de dichas regiones de marco comprende colectivamente hasta 5 diferencias de amino ácido con relación a la secuencia de amino ácido de dicha región de marco codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana.

En una realización, las secuencias de amino ácido de FW1, FW2, FW3 y FW4 del dominio variable de anti-CD40L o dAb son las mismas que las secuencias de amino ácido de regiones de marco correspondientes codificadas por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana, o las secuencias de amino ácido de FW1, FW2, FW3 y FW4 contienen colectivamente hasta 10 diferencias de amino ácido con relación a las

secuencias de amino ácido de regiones de marco correspondientes codificadas por dicho segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana.

En una realización, las secuencias de amino ácido de dichos FW1, FW2 y FW3 del dominio variable de anti-CD40L o dAb son las mismas que las secuencias de amino ácido de regiones de marco correspondientes codificadas por segmentos de gen de anticuerpo de línea germinal humana. Los segmentos de gen de anticuerpo de línea germinal humana son preferiblemente seleccionados del grupo que consiste de DP47, DP45, DP48 y DPK9.

La invención también incluye un método para producir un ligando específico dual como se describe aquí, que comprende un primer dominio variable sencillo de inmunoglobulina que tiene una especificidad de enlace para CD40L y un segundo dominio variable sencillo de inmunoglobulina que tiene una expecificidad de enlace para una proteína que aumenta la vida media del ligando *in vivo*, el método comprende los pasos de: seleccionar un primer dominio variable por su habilidad para enlazarse a CD40L; seleccionar un segundo dominio variable por su habilidad de enlazarse a dicha proteína; combinar los dominios variables; y seleccionar el ligando por su habilidad para enlazarse a CD40L y dicha proteína.

En una realización, el primer dominio variable se selecciona por enlazarse a CD40L en ausencia de un dominio variable complementario.

La invención también incluye ácido nucleico que codifica un ligando específico dual descrito aquí. El ácido nucleico puede comprender la secuencia de ácido nucleico de MSA-16 o una secuencia que es al menos 80% homóloga a este, o alternativamente puede comprender la secuencia de ácido nucleico de MSA-26 o una secuencia que es al menos 70% homóloga a este. El ácido nucleico puede ser incorporado en un vector, que puede ser incorporado en una célula hospedera.

La invención también incluye una composición farmacéutica que comprende un ligando específico dual como se describe aquí y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención también incluye un monómero de dAb específico para CD40L, cuyo monómero tiene una constante de disociación (Kd) de $1x10^{-8}$ M o menos para CD40L humano, y una constante de velocidad K_{off} de $1x10^{-3}s^{-1}$ o menos, determinada mediante resonancia de plasmón superficial.

En una realización, el monómero de dAb específico para CD40L tiene una constante de disociación (Kd) de $1x10^{-7}$ M o menos, determinada mediante resonancia de plasmón superficial.

En una realización, el monómero de dAb tiene especificidad de enlace a CD40L con una constante de disociación (Kd) de $1x10^{-8}$ M o menos, determinada mediante resonancia de plasmón superficial.

En una realización, el monómero de dAb tiene una especificidad de enlace a CD40L con una constante de disociación (Kd) de 50nM a 20pM, determinada mediante resonancia de plasmón superficial.

En una realización, el monómero inhibe el enlace de CD40 a CD40L con un IC_{50} de 50nM o menos.

En una realización adicional, el monómero de dAb tiene especificidad de enlace a CD40L con una constante de velocidad K_{off} de $1x10^{-3}s^{-1}$ o menos, $1x10^{-4}s^{-1}$ o menos, $1x10^{-5}s^{-1}$ o menos, o $1x10^{-6}s^{-1}$ o menos, determinada mediante resonancia de plasmón superficial.

En una realización, el monómero de dAb neutraliza CD40L en un ensayo estándar con un ND50 de 50nM o menos.

La invención también incluye un ligando específico dual que comprende primer y segundo dominios variables sencillos de cadena pesasa, o primer y segundo dominios variables sencillos de cadena ligera, en donde el primer dominio variables es un monómero de dAb anti-CD40L.

En una realización, el segundo dominio variable tiene especificidad de enlace para un antígeno diferente de CD40L.

En una realización adicional, el segundo dominio variable tiene especificidad de enlace para un antígeno seleccionado del grupo que consiste del receptor EPO, ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, EGF, receptor de EGF, ENa-78, Eotaxina, Eotaxina-2, Exodus-2, EpoR, FGF-ácido, FGF-básico, factor de crecimiento de fibroblasto-10, ligando de FLT3, Fractalquina (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF-b1, insulina, IFN-g, IGF-I, IGF-II, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 a.a.), IL-8 (77 a.a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inhibina a, Inhibina b, IP-10, factor de crecimiento de queratinocito-2 (KGF-2), KGF, Leptina, LIF, linfotactina, sustancia inhibidora mulleriana, factor inhibidor de colonia de monocito, proteína atractora de monocito, M-CSF, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 a.a.), MIG, MIP-1a, MIP-1b, MIP-3a, MIP-3b, MIP-4, factor-1 inhibidor progenitor mieloide (MPIF-1), NAP-2, Neurturina, factor de crecimiento nervioso, b-NGF, NT-3, NT-4, Oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1a, DFG1b SCF, SCGF, factor de células tallo, (SCF), TARC, TGF-a, TGF-b, TGF-b2; TGF-b3, factor de necrosis de tumor (TNF), TNF-a, TNF-b, receptor I de TNF, receptor II de TNF, TNIL-1, TPO, VEGF, receptor 1 de VEGF, receptor 2 de VEGF, receptor-3 de VEGF, GCP-2, GRO/MGSA, GRO-b, GRO-g, HCCI, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3, HER 4, sitio de reconocimiento de TACE, TNF BP-1, TNF BP-II, y un antígeno revelado en el Anexo 2 o 3.

La invención también incluye un polipéptido de anticuerpo que antagoniza o inhibe el enlace de DOM8-24 a CD40L, o un polipéptido de anticuerpo que se enlaza al mismo epítopo de CD40L enlazado por DOM8-24.

La invención también incluye un ligando específico dual que comprende un primer dominio variable sencillo de inmunoglobulina que tiene una especificidad de enlace a un primer antígeno y un segundo dominio variable sencillo que tiene una actividad de enlace a un segundo antígeno, en donde el primer antígeno es CD40L y el segundo dominio variable sencillo es un antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno o un antígeno de superficie de célula T. El antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno se puede seleccionar de uno del grupo que consiste de antígenos de superficie de célula dendrítica, antígenos de superficie de macrófago activado,

antígenos de superficie de célula B activada, antígenos de superficie de la ruta de señal co-estimuladora, y MHC.

En una realización, el MHC es clase II, y la clase II puede ser alfa o beta.

El antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno puede ser seleccionado del grupo que consiste de CD28, molécula coestimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, logando de molécula coestimuladora inducible (ICOSL), OX40L, CD80, CD86, HVEM (Mediador de Entrada el Virus del Herpes), y LIGHT, pero es preferiblemente uno de CD28, molécula coestimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, o CD3.

El antígeno de superficie es preferiblemente un antígeno de superficie del gen B7 tal como B7-2 o B7-1.

Definiciones:

Como se usa aquí, el término "humano" cuando se aplica a un polipéptido de anticuerpo o a un dominio variable de inmunoglobulina significa que el polipéptido tiene una secuencia derivada de una inmunoglobulina humana. Una secuencia es "derivada de" una secuencia de codicidación de inmunoglobulina humana cuando la secuencia es cualquiera de: a) aislada de un individuo humano o de células o una línea celular de in individuo humano; b) aislada de una biblioteca de secuencias de gen de anticuerpo humano clonado (o una biblioteca de secuencias de dominio V de anticuerpo humano); o c) cuando se usó una secuencia de gen de anticuerpo humano (o una secuencia de región V humana clonada (incluyendo, p.e., un segmento de gen V de línea germinal)) para generar una o más secuencias diversificadas que fueron luego seleccionadas para el enlace a un antígeno objetivo deseado. El término "humano" aplicado aquí a un polipéptido de anticuerpo o a un dominio variable de inmunoglobulina no abarca una inmunoglobulina de otras especies, p.e., ratón, camello, etc., que ha sido "humanizada" a través de injerto de secuencias de región constante humanas en un polipéptido de anticuerpo (i.e., reemplazando regiones constantes no humandas con regiones constantes humanas) o a través del injerto de secuencias de marco de región V humana

en un dominio variable de inmunoglobulina de un mamífero no humano (p.e., reemplazando regiones de marco no humanadas de un dominio V con regiones de marco humanas).

Como mínimo, un dominio variable humano tiene al menos 85% de similitud de amino ácido (incluyendo, por ejemplo, 87%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% o mayor similitud) a una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina humana que se encuentra naturalmente.

Como se usa aquí, el término "dominio" se refiere a una estructura de proteína plegada que retiene su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de las propiedades funcionales discretas de las proteínas, y en muchos casos pueden ser agregados, removidos o transferidos a otras proteínas sin perder la función del resto de la proteína y/o del dominio.

Por "dominio variable de inmunoglobulina sencillo" siginifica un dominio de polipéptido plegado que comprende una secuencia característica de dominios variables de inmunoglobulina y que se enlaza específicamente a un antígeno (p.e., constante de disociación de 500 nM o menos). Por lo tanto, un "dominio variable de inmunoglobulina sencillo" incluye dominios variables completos de anticuerpo así como dominios variables modificados, por ejemplo en los cuales una o más asas han sido reemplazadas por secuencias que no son características de dominios variables de anticuerpo, o dominios variables de anticuerpo que han sido truncados o comprenden extensiones de N o C terminal, así como fragmentos plegados de dominios variables que retienen una constante de disociación de 500 nM o menos (p.e., 450 nM o menos, 400 nM o menos, 350 nM o menos, 300 nM o menos, 250 nM o menos, 200 nM o menos, 150 nM o menos, 100 nM o menos) y la especificidad de enatígeno objetivo del dominio de longitud total. Cuando sea necesario, o en caso de alguna duda, la convención de numeración y límites indicados por Kabat et al. (1991, supra) son aplicables a los dominios variables y constantes de inmunoglobulina referidos aquí.

Un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo, como se usa aquí se refiere a un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo

mamífero, preferiblemente humano, pero también incluye de roedor (por ejemplo, como se revela en WO00/29004, cuyos contenidos están incorporados aquí en su totalidad) o dAbs de V_{HH} camélido. dAbs camélidos son polipéptidos de dominio variable sencillo de anticuerpo que son derivados de especies que incluyen camello, llama, alpaca, dromedario, y guanaco, y comprende anticuerpos de cadena pesada naturalmente carentes de cadena ligera: V_{HH}. Las moléculas V_{HH} son aproximadamente 10x más pequeñas que las moléculas IgG, y como polipéptidos sencillos, son muy estables, resisten condiciones extremas de pH temperatura. Más aún, los polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpos camélidos son resistentes a la acción de las proteasas. Los anticuerpos camélidos están descritos en, por ejemplo, Pat. U.S. Nos. 5,759,808; 5,800,988; 5,840,526; 5,874,541; 6,005,079; y 6,015,695, cuyos contenidos de cada una están incorporados aquí en su totalidad. Los polipéptidos de dominio variable sencillo de anticuerpo de V_{HH} camélido útiles de acuerdo con la invención incluyen una clase de polipéptidos de dominio variable sencillo de anticuerpo camélidos que tienen secuencias del tipo humano, en donde la clase está caracterizada porque los dominios V_{HH} portan un amino ácido del grupo que consiste de glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptofan, metionina, serina, treonina, asparagina, o glutamina en la posición 45, tal como por ejemplo L45, y comprenden además un triptofan en la posición 103 de acuerdo con la numeración Kabat. Los polipéptidos deV_{HH} camélido humanizados son enseñados, por ejemplo en WO04/041862, cuyas enseñanzas están incorporadas aquí e su totalidad. El experto en la técnica entenderá que los polipéptidos de dominio variable sencillo de anticuerpo camélidos que se encuentran naturalmente pueden ser modificados de acuerdo con las enseñanzas de WO04/041862 (p.e., sustituciones de amino ácido en las posiciones 45 y 103) para generar polipéptidos de V_{HH} camélido humanizado. También se incluyen en la presente invención los polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpos que son de V_{HH} de tiburón nodriza. Los dAbs de tiburón nodriza son polipéptidos de dominio variable sencillo de anticuerpo derivados de tiburón nodriza, que comprenden anticuerpos de cadena pesada carentes naturalmente de cadena ligera: V_{HH}. Los dAbs de V_{HH} de tiburón nodriza están descritos, por ejemplo, en Greenberg et al. (Nature 374 pp 168-173 1995) y U.S. 20050043519.

La frase "polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo" abarca no solamente un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo, sino también polipéptidos más grandes que comprenden un monómero de una secuencia de polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo. Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" es equivalente a un "polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo" según el término se usa aquí. Con respecto a un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo, el enlace a antígeno, p.e., CD40L, es mediado por el dominio V de inmunoglobulina sencillo sin un requerimiento de un dominio V complementario.

De acuerdo con la invención, se entiende que los términos "polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo", "dominio variable sencillo de anticuerpo", "dominio variable de anticuerpo sencillo", y "dominio variable de inmunoglobulina sencillo" son equivalentes.

Como se usa aquí, la frase "secuencia característica de dominios variables de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de amino ácido que es homóloga, en 20 o más, 25 o más, 30 o más, 35 o más, 40 o más, 45 o más, o incluso 50 o más amino ácidos contiguos, a una secuencia comprendida por una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina.

Las secuencias similares u homólogas (p.e., al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia) a las secuencias reveladas aquí también hacen parte de la invención. En algunas realizaciones, la identidad de secuencia al nivel de amino ácido puede ser aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor. Al nivel de ácido nucleico, la identidad de secuencia puede ser aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor. Alternativamente, existe identidad sustancial cuando los segmentos de ácido nucleico hidridarán bajo condiciones de hibridación selectiva (p.e., condiciones de hibridación de muy alta severdidad), al complemento de la cadena. Los ácidos nucléicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado de célula, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura.

Como se usa aquí, los términos "homología" o "similitud" se refieren al grado en el cual dos nucleotidos o secuencias de amino ácido se asemejan estructuralmente entre sí. Como se usa aquí, "similitude" de secuencia es una medida del grado al cual las secuencias de amino ácidos comparten residuos de amino ácido similares en posiciones correspondientes en una alineación de las secuencias. Los amino ácidos son similares entre sí cuando sus cadenas laterales son similares. Específicamente, "similitud" abarca amino ácidos que son sustitutos conservativos entre sí. Una sustitución "conservativa" es cualquier sustitución que tiene un puntaje positive en la matriz de sustitución blosum62 (Hentikoff y Hentikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919). Por el enunciado "secuencia A es n% similar a la secuencia B" se entiende que n% de las posiciones de una alineación global optima entre las secuencias A y B consiste de amino ácidos idénticos o sustituciones conservativas. Las alineaciones globales óptimas pueden realizarse usando los siguientes parámetros en el algoritmo de alineación de Needleman-Wunsch:

Para polipéptidos:

Matriz de sustitución: blosum62.

Función de puntaje de espacio: -A -B*LG, en donde A = 11 (la sanción de espacio), B = 1 (la sanción de longitud de espacio) y LG es la longitud del espacio.

Para secuencias de nucleotido:

Matriz de sustitución: 10 para coincidencias, 0 para no coincidencias.

Función de puntaje de espacio: -A -B*LG, en donde A = 50 (la sanción de espacio), B = 3 (la sanción de longitud de espacio) y LG es la longitud del espacio.

Las sustituciones conservativas típicas están entre Met, Val, Leu y Ile; entre Ser y Thr; entre los residuos Asp, Glu y Asn; entre los residuos Gln, Lys y Arg; o los residuos aromáticos Phe y Tyr.

Como se usa aquí, dos secuencias son "homólogas" o "similares" antre sí cuando tienen al menos 70%, 80%, o 85% de similitud de secuencia entre sí, incluyendo, p.e., 90%, 95%, 97%, 99% o incluso 100% de similitud de secuencia, cuando se alinean usando el algoritmo de Needleman-Wunsch o el

algoritmo de "secuencias BLAST 2" descrito por Tatusova & Madden, 1999, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250. Cuando las secuencias de amino ácido son alineadas usando el "algoritmo de secuencias BLAST" la matriz Blosum 62 es la matriz por defecto.

Como se usa aquí, los términos "inhiben", "inhibe" e "inhibido" se refieren a una disminución en una actividad dada medible (p.e., actividad de enlace) en al menos 10% con relación a una referencia. Cuando se desea una inhibición, tal inhibición is preferiblemente al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más, hasta e incluyendo 100%, p.e., inhibición completa o ausencia de la actividad dada. Una forma de inhibición de enlace de CD40L a CD40 se mide como se describe en el Ejemplo 6 de la presente. Como se usa aquí, el término "inhibe sustancialmente" se refiere a una disminución de una actividad dada medible (p.e., el enlace de CD40L a CD40) en al menos 50% con relación a una referencia. Por ejemplo, "inhibe sustancialmente" se refiere a una disminución en una actividad dada medible de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% y hasta e incluyendo 100% con relación a una referencia. Como se usa aquí, "inhibe el enlace", con referencia al enlace de un polipéptido de anticuerpo que se enlaza a CD40L, o enlace de CD40 a CD40L, se refiere a una disminución en el enlace en al menos 10% con relación a una referencia. "Inhibe el enlace" se refiere preferiblemente a una disminución en el enlace de al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más, hasta e incluyendo 100%.

Como se usa aquí, los términos "activan", "activa" y "activado" se refieren a un aumento en una actividad dada medible en al menos 5% con relación a una referencia, por ejemplo, al menos 10%, 25%, 50%, 75% o incluso 100%.

Como se usa aquí, el término "antagonista" se refiere a un agente que inhibe al menos una actividad mediada por CD40L, inhibe el enlace de CD40 a CD40L, y/o no produce más de 25% de activación de plaquetas y/o agregación en un ensayo de agregación de plaquetas o ensayo de activación de plaquetas como se describe aquí, y preferiblemente produce 25% o menos activación y/o agregación de plaquetas, 20% o menos, 15% o menos, 10% o menos, 5% o menos, y tan bajo como cero activación y/o agregación de plaquetas. Una

actividad es "antagonizada" si la actividad (i.e., actividad mediada por CD40L, enlace de CD40 o CD40L, o activación y/o agregación de plaquetas) es reducida en al menos 10%, y preferiblemente al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97% o incluso 100% (i.e., no actividad) en la presencia, con relación a la ausencia de un antagonista. Un antagonista como el término que se usa aquí comprende preferiblemente un dominio variable de inmunoglobulina sencillo que se enlaza monovalentemente a CD40L.

Como se usa aquí, el término "agonista" se refiere a un agente que activa al menos una actividad mediada por CD40L, ya sea solo o cuando está combinado con otro co-estímulo, con relación a una referencia. Una actividad es "agonizada" si la actividad es aumentada en al menos 10%, p.e., 50%, en la presencia, con relación a la ausencia de un agonista.

Como se usa aquí, el término "epítopo" se refiere a una unidad de estructura convencionalmente enlazada por un par V_H/V_L de inmunoglobulina. Los epítopos definen el sitio de enlace mínimo para un anticuerpo, y así representan el objetivo de especificidad de un anticuerpo. En el caso de un dominio variable de inmunoglobulina sencillo, un epítopo representa la unidad de estructura enlazada por un dominio variable sencillo en aislamiento. Esto es, el sitio de enlace es proporcionado por un dominio variable de inmunoglobulina sencillo.

Como se usa aquí, el término "liberación prolongada" o los términos equivalents "liberación controlada" o "liberación lenta" se refiere a formulaciones de fármaco que liberan el fármaco activo, tal como un fármaco de polipéptido, durante un período de tiempo siguiendo a la administración a un individuo. La liberación prolongada de fármacos de polipéptido, que puede ocurrie durante un rango de tiempos deseados, p.e., minutos, horas, días, semanas o más, dependiendo de la formulación del fármaco, está en contraste a las formulaciones estándar en las cuales la unidad de dosis entera está disponible para absorción inmediata o distribución inmediata mediante el torrente sanguíneo. Las formulación de liberación prolongada preferidas producen un nivel de fármaco circulante de una sola administración que es sostenido, por ejemplo, por 8 horas o más, 12 horas o más, 24 horas o más, 36 horas o más, 48 horas o más, 60 horas o más, 72 horas o más 84 horas o más,

96 horas o más, o incluso, por ejemplo, por 1 semana o 2 semanas o más, por ejemplo, 1 mes o más.

Como se usa aquí, una "actividad de CD40L" es una actividad que involucra o resulta del enlace de CD40L a CD40, e incluye, pero no se limita al enlace a CD40 (ensayado, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6), activación de la Quinasa Jun-N-terminal (JNK), la inducción de células T para producie y secretar citocinas incluyendo, por ejemplo, IL-10, IFN-γ y TNF-α, y la mediación de activación y/o agregación de plaquetas. Los ensayos para estas actividades se proporcionan aquí más adelante.

Como se usa aquí, el término "no agoniza sustancialmente" significa que un agente dado, p.e., un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L, no active una o más de las acitividades de CD40L incluyendo activación de quinasa Jun-N-terminal (fosforilación) en células T Jurkat e inducción de la producción o secreción de IFN-γ en células T Jurkat estimuladas con anti-CD3, según la definición del témino "activa" aquí. Como se usa aquí, "no agoniza sustancialmente" significa que el agente no activa más del 20% de la actividad que es activada por el enlace de CD40 a CD40L, preferiblemente, el agente no activa más del 10%, 8%, 5%, 3%, o más del 2% o menos, incluyendo activación cero, de la actividad que es activada por el enlace de CD40 a CD40L.

Como se usa aquí, el término "polipéptido de anticuerpo" se refiere a un polipéptido que es ya sea un anticuerpo o es una parte de un anticuerpo, modificado o no modificado, que retiene la habilidad de enlazar específicamente el antígeno. Así, el término polipéptido de anticuerpo incluye un dímero de enlace a antígeno de cadena pesada, cadena ligera, cadena pesada-cadena ligera, fragmento Fab, fragmento F(ab')2, dAb, o un fragmento Fv, incluyendo Fv de cadena sencilla (scFv). La frase "polipéptido de anticuerpo" pretende abarcar polipéptidos de fusion recombinants que comprenden una secuencia de polipéptido de anticuerpo que retiene la habilidad de enlazar específicamente al antígeno en el contexto de la fusión.

Como se usa aquí, el término "monovalente" significa que un polipéptido de anticuerpo o polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo

dado puede enlazar solamente una molécula sencilla de su objetivo. Los anticuerpos que se encuentran naturalmente son generalmente divalentes, en que tienen dos brazos de enlace a antígeno funcionales, cada uno comprende un dominio VH y uno VL. Cuando la hindrancia estérica no es un problema, un anticuerpo divalente puede enlazar dos moléculas separadas del mismo antígeno. En contrast, un anticuerpo "monovalente" tiene la capacidad de enlazar solamente una de tales moléculas de antígeno. Como se usa aquí el término, un anticuerpo "monovalente" también puede comprender más de un sitio de enlace a antífeno, p.e., dos sitios de enlace a antígeno, pero los sitios de enlace debe ser para diferentes antígenos, de forma que el anticuerpo puede solamente enlazar una molécula de CD40L una vez. El dominio de enlace a antígeno de un anticuerpo monovalente puede comprende un dominio V_H y uno V_L, pero comprende preferiblemente solamente un dominio variable de inmunoglobulina sencillo, p.e., un dominio V_H o uno V_L, que tiene la capacidad de enlazarse a CD40L sin la necesidad de un dominio V_L o V_H correspondiente, respectivamente. Un anticuerpo monovalente carece de la capacidad de entrecruzar moléculas de un solo antígeno.

Como se usa aquí, el término "ensayo de agregación de plaquetas estándar" significa el ensayo descrito en la sección de más adelante, titlulada "Ensayo de Agregación de Plaquetas".

Como se usan aquí, los términos "domino V_H" y "dominio V_L" se refiere a regiones variables de inmunoglobulina definidas por Kabat et al. (supra), que está incorporada aquí para referencia.

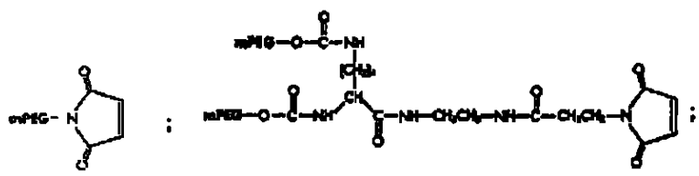
Como se usa aquí, "enlazado" se refiere a la unión de una mitad de polímero, tal como PEG a un residuo de amino ácido de un polipéptido de anticuerpo. La unión de un polímero de PEG a un residuo de amino ácido de un polipéptido de anticuerpo, p.e., un dAb anti-CD40L, es referido como "PEGilación" y se puedelograr usando varias mitades de unión de PEG incluyendo, pero sin limitarse a éster activo de N-hidroxilsuccinimida (NHS), propionato de succinimidilo (SPA), maleimida (MAL), vinil sulfona (VS), o tiol. Un polímero de PEG, u otro polímero, puede estar enlazado a un polipéptido de anticuerpo en una posición predeterminada, o pueden estar enlazados aleatoriamente a una molécula de polipéptido de anticuerpo. Se prefiere, sin

embargo, que el polímero de PEG esté enlazado a un polipéptido de anticuerpo en una posición predeterminada. Un polímero de PEG puede estar enlazado a cualquier residuo de un polipéptido de anticuerpo, sin embargo, es preferable que el polímero esté enlazado a una lisina o cisteína, que se encuentra naturalmente en el polipéptido de anticuerpo, o que ha sido diseñado en el polipéptido de anticuerpo, por ejemplo, mediante mutagénesis de un residuo que se encuentra naturalmente en el polipéptido de anticuerpo a una cisteína o lisina. El enlace a PEG también puede estar mediado a través de un enlazante de péptido unido a un polipéptido de anticuerpo. Esto es, la mitas PEG puede estar unida a un enlazante de péptido fusionado a un polipéptido de anticuerpo, en donde el enlazante provee el sitio, p.e., una cisteína o lisina libre, para la unión de PEG. Como se usa aquí, "enlazado" también se puede referir a la asociación de dos o más polipéptidos de anticuerpo, p.e., monómeros dAb, para formar un dímero, trímero, tetrámero, u otro multímero. Los monómeros de polipéptido de anticuerpo pueden ser enlazados para formar un multímero mediante varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, expresión de los monómeros de polipéptido de anticuerpo como una proteína de fusión, enlace de dos o más monómeros mediante un enlazante de péptido entre monómeros, o mediante unión química de monómeros después de la traslación, ya sea entre sí directamente, o a través de un enlazante mediante enlaces disulfuro, o mediante enlace a una mitad enlazante di-, tri- o multivalente (p.e., un PEG de brazos múltiples). Aunque los multímeros de dAb están contemplados específicamente aquí, p.e., en el conexto de construcciones de polipéptido de anticuerpo duales o multiespecíficas, se enfatiza que para cualquiera construcción dada de polipéptido de anticuerpo, el constructo debe ser solamente capaz de enlazar una molécula de CD40L, p.e., las construcciones pueden tener solamente un elemento de enlace a CD40L, y no pueden entrecruzar CD40L.

Como se usa aquí, "polímero" se refiere a una macromolécula elaborada por la repetición de unidades monoméricas, y puede referirse a un polímero sintético o que se encuentra naturalmente tal como polímero de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado. Un "polímero" como se usa aquí, se refiere específicamente a un poli(etilen glicol), poli(proplen glicol),

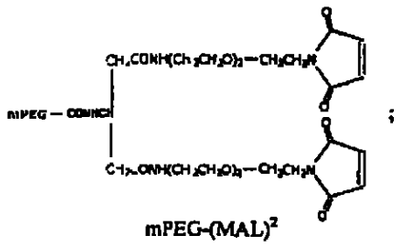
o polivinil alcohol) opcionalmente sustituido o de cadena ramificada y derivados de los mismos.

Como se usa aquí, "PEG" o "polímero de PEG" se refiere a polietilen glicol, y más específicamente se puede referir a una forma derivatizada de PEG, incluyendo, pero sin limitarse a ésteres activos N-hidroxilsuccinimida (NHS) de PEG tales como propionato de succinimidilo, ésteres activos de benzotriazol, PEG derivatizado con maleimida, vinil sulfonas, o grupos tiol. Formulaciones de PEG particulares pueden incluir PEG-O-$CH_2CH_2CH_2$-CO_2-NHS; PEG-O-CH_2-NHS; PEG-O-CH_2CH_2-CO_2-NHS; PEG-S-CH_2CH_2-CO-NHS; PEG-O_2CNH-CH(R)-CO_2-NHS; PEG-NHCO-CH_2CH_2-CO-NHS; y PEG-O-CH_2-CO_2-NHS; en donde R es $((CH_2)_4)NHCO_2$(mPEG). Los polímeros de PEG útiles en la invención pueden ser moléculas lineales, o pueden ser ramificadas, en donde múltiples mitades PEG están presentes en un solo polímero. Algunas confirmaciones de PEG particularmente preferidas que son útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a las siguientes:

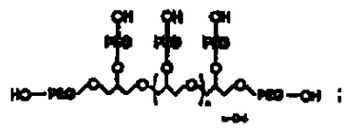


mPEG-MAL

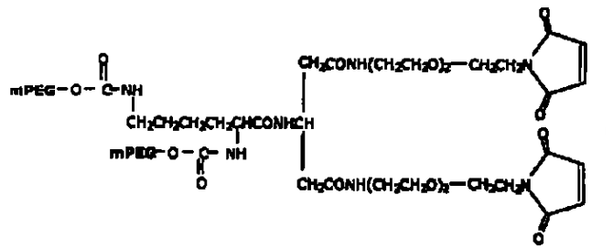
mPEG2-MAL



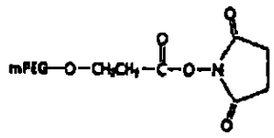
mPEG-(MAL)^2



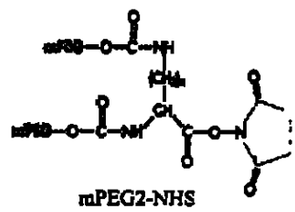
PEG de brazos múltiples



mPEG2-(MAL)^2



mPEG-SPA



mPEG2-NHS

Como se usa aquí, un "reactivo selectivo a sulfhidrilo" es un reactivo que es útil para la unión de un polímero de PEG a un amino ácido que contiene tiol. Los grupos tiol del residuo cisteína son partiocularmente útiles para la interacción con un reactivo selectivo a sulfhidrilo. Reactivos selectivos a sulfhidrilo que son útiles para tal unión inlcluyen, pero no se limitan a maleimida, vinil sulfona, y tiol. El uso de reactivos selectivos a sulfhidrilo para el acoplamiento a residuos de cisteína es conocido en la técnica y puede ser adaptado según se necesite, de acuerdo con la presente invención (Ver Eg., Zalipsky, 1995, *Bioconjug. Chem.* 6:150; Greenwald et al., 2000, *Crit. Rev.*

Ther. Drug Carrier Syst. 17:101; Herman et al., 1994, *Macromol. Chem. Phys.* 195:203).

La unión de PEG u otro agente, p.e., HSA, a un polipéptido de anticuerpo o a un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo como se describe aquí, preferiblemente no deteriorará la habilidad del polipéptido para enlazar específicamente a CD40L. Esto es, polipéptido de anticuerpo o polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo enlazado a PEG retendrá will su actividad de enlace con relación a una contraparte no enlazada a PEG. Como se usa aquí, "retiene actividad " se refiere a un nivel de actividad de un polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG que es al menos 10% del nivel de actividad de un polipéptido de anticuerpo no enlazado a PEG, preferiblemente al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% y hasta 90%, preferiblemente hasta 95%, 98%, y hasta 100% de la actividad de un polipéptido de anticuerpo no enlazado a PEG, que comprende el mismo dominio o dominios de enlace a antígeno. Más específicamente, la actividad de un polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG comparada con un dominio variable de anticuerpo no enlazado a PEG debe ser determinada en una base molas de polipéptido de anticuerpo; esto es, números equivalentes de moles de cada uno de los polipéptidos de anticuerpo enlazado a PEG y no enlazado a PEG, se deben usar en cada ensayo. Para determinar si un polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG particular "retiene la actividad", se prefiere que la actividad del polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG sea comparada con la actividad del mismo polipéptido de anticuerpo en la ausencia de PEG.

Como se usa aquí, el término "vida media *in vivo*" se refiere al tiempo que tarda la concentración en suero de un ligando (p.e., un dominio variable de inmunoglobulina sencillo) en reducirse al 50%, *in vivo*, por ejemplo debido a la degradación del ligando y/o depuración o secuestro del ligando por mecanismos naturales. Los polipéptidos de anticuerpo o polipéptidos de dominio variable de inmunoglobulina sencillo anti CD40L de la presente pueden ser estabilizados *in vivo* y su vida media ser aumentada mediante el enlace a moléculas, tales como PEG, que resisten la degradación y/o depuración o secuestro. La vida media de un polipéptido de anticuerpo se aumenta si su actividad funcional persiste, *in vivo*, por un período mayor que un polipéptido de

anticuerpo similar que no está enlazado a un polímero de PEG. Típicamente, la vida media de un polipéptido de anticuerpo PEGilado es aumentada en 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más con relación a un polipéptido de anticuerpo no PEGilado. Son posibles aumentos en el rango de 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x o más de la vida media. Alternativamente, o en adición, son posibles aumentos en el rango de hasta 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, 150x de la vida media. De acuerdo con la invención, un dominio variable sencillo de anticuerpo enlazado a PEG tiene una vida media entre 0.25 y 170 horas, preferiblemente entre 1 y 100 horas, más preferiblemente entre 30 y 100 horas, y aún más preferiblemente entre 50 y 100 horas, y hasta 170, 180, 190, y 200 horas o más.

Como se usa aquí, "resistente a la degradación" o "resiste la degradación" con respecto a un monómero o multímero de polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG u otro polímero significa que el monómero o multímero de polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG u otro polímero es degradado en no más del 10% cuando es expuesto a pepsina a pH 2.0 por 30 minutos y preferiblemente no se degrada.

Como se usa aquí, "tamaño hidrodinámico" se refiere al tamaño aparente de una molécula (p.e., una molécula de proteína) basado en la difusión de la molécula a través de una solución acuosa. La difusión, o moción de una proteína a través de la solución puede ser procesada para deriver un tamaño aparente de la proteína, en donde el tamaño estça dado por el "radio de Stokes" o "radio hidrodinámico" de la partícula de proteína. El "tamaño hidrodinámico" de una proteína depende de la masa y la forma (conformación), de forma que dos proteínas que tienen la misma masa molecular pueden tener diferentes tamaños hidrodinámicos con base en la conformación global de la proteína. El tamaño hidrodinámico se mide, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaño. El tamaño hidrodinámico de un polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG, p.e., un dominio variable de inmunoglobulina sencillo (incluyendo multímeros de dominio variable de anticuerpo como se describen aquí), puede estar en el rango de 24 kDa a 500 kDa; 30 a 500 kDa; 40 a 500 kDa; 50 a 500 kDa; 100 a 500 kDa; 150 a 500 kDa; 200 a 500 kDa; 250 a 500 kDa; 300 a 500 kDa; 350 a 500 kDa; 400 a 500 kDa y 450 a 500 kDa. Preferiblemente, el tamaño hidrodinámico de un

polipéptido de anticuerpo PEGilado de la invención es de 30 a 40 kDa; 70 a 80 kDa o 200 a 300 kDa. Cuando se desea un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo para uso en aplicaciones de imagen, el polipéptido debe tener un tamaño hidrodinámico entre 50 y 100 kDa. Alternativamente, cuando se desea un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo para aplicaciones terapéuticas, la preparación de polipéptido debe tener un tamaño hidrodinámico mayor de 200 kDa.

Como se usa aquí, el término "IC_{50}" se refiere a la concentración de un inhibidor necesaria para inhibir una actividad dada en 50%. El IC_{50} se determina ensayando una actividad dada, p.e., enlace de CD40L a CD40, en la presencia de diferentes cantidades del inhibidor (p.e., polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente), y graficando la concentración de inhibidor versus la actividad que es marcada. El enlace de CD40L a CD40 se mide aquí mediante el método descrito en el Ejemplo 6. Alternativamente se puede usar SPR.

Como se usa aquí, el término "fusionado a un polipéptido de anticuerpo" significa que un polipéptido está fusionado a un anticuerpo dado a través de técnicas de ADN recombinantes. Así, un anticuerpo "fusionado a otro" polipéptido, p.e., a otro anticuerpo de especificidad de enlace diferente, no existe en la naturaleza y es generado a través de medios recombinantes. El término "fusionado a un polipéptido de anticuerpo" también abarca el enlace de un polipéptido a un polipéptido de anticuerpo dado mediante, por ejemplo, disulfuro u otros enlaces químicos, en donde el polipéptido fusionado no se encuentra naturalmente fusionado al polipéptido de anticuerpo. Los métodos recombinantes y químicos de fusión de un polipéptido a otro polipéptido, p.e., a un anticuerpo, son bien conocidos en la técnica.

Como se usa aquí, el término "dominio Fc" se refiere a las secuencias de anticuerpo de región constante que comprenden los dominios contantes CH2 y CH3 delimitados de acuerdo con Kabat et al., supra. La porción Fc del polipéptido de cadena pesada tiene la habilidad de auto-asociarse, una fusión que facilita la formación de anticuerpos divalentes. El término "carece de un dominio Fc" significa que un polipéptido de anticuerpo dado carece de al menos la porción de un dominio Fc de inmunoglobulina (tales dominios se definen de acuerdo con Kabat et al., supra) suficiente para mediar la dimerización de

polipéptidos de anticuerpo que contienen Fc. La dimerización de los polipéptidos de anticuerpo que contienen Fc se mide, por ejemplo, mediante métodos cromatográficos por resonancia de plasmón superficial. Un polipéptido de anticuerpo que carece de un dominnio Fc evita las interacciones Fc-plaqueta y por lo tanto evita la inducción de agregación de plaquetas.

Como se usa aquí "tratar", "reducir", "prevenir", o "aliviar" si se relacionan con un síntoma de enfermedad, se refiere a una disminución del síntoma en al menos 10% con base en un parámetro clínicamente medible, o en al menos un punto en una escala de enfermedad o severidad de síntoma clínicamente aceptada. Como se usa aquí, el término "síntoma de lupuseritematoso sintético" se refiere a cualquiera de los síntomas clínicamente relevantes de SLE conocido por los expertos en la técnica. Ejemplos no limitantes incluyen la acumulación de autoanticuerpos IgG (p.e., contra antígenos nucleares tales como cromatina, snRHPs (especialmente U1, Sm, Ro/SSA y La/SSB), fosfolípidos y moléculas de superficie celular), anemia hemolítica, trombocitopenia, leucopenia, glomerulonefritis, vasculitis, artritis, y serositis). Una reducción en tal síntoma es una reducción en al menos 10% en un parámetro clínicamente medible, o en al menos un punto sobre una escada de severidad de enfermedad clínicamente aceptable.

Como se usa aquí, la frase "se enlaza específicamente" se refiere al enlace de un antígeno mediante un dominio variable de inmunoglobulina con una constante de disociación (Kd) de 1 μM o menos, medida por análisis de resonancia de plasmón superficial usando, por ejemplo, un sistema BIAcore™ de resonancia de plasmón superticial y software de evaluación cinética BIAcore™ (p.e., versión 2.1). La afinidad o K_d para una interacción de enlace específico es preferiblemente aproximadamente 500 nM o menor, más preferiblemente aproximadamente 300 nM o menor.

Como se usa aquí, un "ligando genérico" es un ligando que se enlaza en una proporción sustancial de miembros funcionales en un repertorio dado, p.e., en una biblioteca de despliegue del fago. Así, el mismo ligando genérico puede enlazar muchos muembros de los repertorios sin importer sus especificidades de ligando objetivo. En general, la presencia de un sitio de enlace de ligando genérico functional indica que el miembro del repertorio está expresado y

plegado correctamente. Así, el enlace del ligando genérico a su sitio de enlace provee un método para preseleccionar polipéptidos funcionales de un repertorio de polipéptidos. Ligandos genéricos incluyen, por ejemplo, Proteína A, Proteína G y Proteína L.

Como se usa aquí, el término "marco universal" se refiere a una secuencia de marco de anticuerpo sencillo correspondiente a las regiones de un anticuerpo conservadas en la secuencia definida por Kabat (supra) o correspodiente al repertorio o estructura de inmunoglobulina de línea germinal humana definida por Chothia y Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917. La invención provee el uso de un marco sencillo, o un conjunto de tales marcos, que se ha encontrado, permite la derivación de virtualmente cualquier especificidad de enlace mediante variación en las regiones hipervariables solas.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el análisis en gel de la calidad de CD40L marcado con biotina usado en procedimientos de selección descritos aquí, (a) 1 μg de CD40L no biotinilado (carril 1) y 0.3 μg de biotina-CD40L (carril 2) fueron analizados en SDS-PAGE y detectados mediante Simply Blue Safe-Stain, (b) 0.1 μg de biotina-CD40L (carril 1) y 0.02 μg de biotina-CD40L (carril 2) fueron detectados mediante sondeo de Western (manchado hacia el Occidente) con Estreptavidina-HRP 1:5000.

La Figura 2 muestra una representación gráfica de una lectura de ensayo de enlace de receptor (RBA) en respuesta a dosis, que analiza la inhibición del enlace CD40L a CD40-Fc por dAbs DOM-10, -20, -27, -30, -31, -62, -77, titrados desde 1 μM hasta 10 pM. Los dAbs DOM-20, -30, y -31 son los más potentes con valores IC_{50} de aproximadamente 8 nM.

La Figura 3 muestra una representación gráfica de una lectura de ensayo de enlace de receptor en respuesta a dosis, que analiza la inhibición del enlace de CD40L a CD40-Fc por dAbs DOM-4 y DOM-5, titrados desde 1 μM hasta 500 pM. Los valores IC_{50} para los dAbs DOM-5 y DOM-4 son aproximadamente 3 nM y 100 nM respectivamente.

La Figura 4 muestra una representación gráfica de una lectura de ensayo de enlace de receptor en respuesta a dosis, que analiza la inhibición del enlace de CD40L a CD40-Fc por dAb DOM- 24, titrado desde 100 nM hasta 0.5 pM. Los datos fueron ajustados a la curva usando software GraphPad Prism.

La Figura 5 muestra la secuencia del marco V_H basado en la secuencia de línea germinal DP47 - JH4b (SEQ ID NO: 1, secuencia de amino ácido; SEQ ID NO: 2, secuencia de nucleótido – se muestran las cadenas en sentido y antisentido - SEQ ID NO: 2 es la cadena superior (sentido) y la SEQ ID NO: 476 es la cadena inferior (anti-sentido)). Los HCDRs 1-3 se indican mediante subrayado.

La Figura 6 muestra la secuencia del marco Vκ basado en la secuencia de línea germinal DPK9 – Jκ1 (SEQ ID NO: 3, secuencia de amino ácido; SEQ ID NO: 4, secuencia de nucleotido – se muestran las cadenas en sentido y antisentido - SEQ ID NO: 4 es la cadena superior (sentido) y la SEQ ID NO: 477 es la cadena inferior (anti-sentido)) Los LCDRs 1-3 se indicant mediante subrayado.

La Figura 7 muestra una representación esquemática del ensayo de enlace de CD40L usado aquí, p.e., en el Ejemplo 6.

La Figura 8 muestra varias secuencias de codificación de péptido de señal de secreción de GAS1.

La Figura 9 muestra los resultados de un ensayo de enlace de receptor que demuestra la afinidad de DOM8-24cys PEGilado con PEG MAL 30 K o PEG2-MAL 40 K.

La Figura 10 muestra los resultados de un ensayo para evaluar el enlace simultáneo de un dímero específico dual a HSA y CD40L (barras sombreadas). También se muestra el enlace al antígeno BSA de control (barras sólidas).

La Figura 11 muestra los resultados de un ensayo para evaluar el enlace simultáneo de un Fab específico dual a HSA y CD40L (barras sombreadas). También se muestra el enlace al antígeno de leche en polvo descremada (barras sólidas).

La Figura 12 muestra los resultados de un análisis FACS del efecto inhibidor de DOM-24 monomérico (líneas punteadas grises). Las células estimuladas de control se muestran como la línea negra sólida y un dAb de control se muestra como la línea sólida gris.

La Figura 13 muestra los resultados de análisis FACS del efecto onhibidor del dAb V_k DOM-116 (línea punteada). Las células estimuladas de control se muestran como la línea negra sólida y un dAb de control se muestra como la línea sólida gris.

DESRIPCION DETALLADA

La invención provee polipéptidos de anticuerpo que son monovalentes para el enlace a CD40L. La monovalencia para el enlace de CD40L remueve la posibilidad de entrecruzamiento que ocurre con los anticuerpos de la técnica previa, y que juega un papel en los efectos secundarios indeseados observados con los anticuerpos anti-CD40L monoclonales. Además, aunque no se pretende limitar por ningún mecanismo específoco o teoría, como los polipéptidos de anticuerpo monovalentes para CD40L no pueden entrecruzarse con CD40L, se elimina la posibilidad que el CD40L entrecruzado a su vez entrecruce el CD40 de superficie celular y produzca el agonismo de la actividad de señalización de CD40. Así, en un aspecto preferido, los anticuerpos anti-CD40L revelados aquí no solo inhiben o antagonizan el enlace de CD40L a CD40, no agonizan sustancialmente la actividad de CD40 y/o CD40L.

En un aspecto, los anticuerpos monovalentes para el enlace de CD40L son polipéptidos de anticuerpo humanos. Los polipéptidos de anticuerpo humanos pueden ser administrados a pacientes humanos evitando en gran medida la respuesta inmune de anti-anticuerpo provocada usualmente por la administración de anticuerpos de otras especies, p.e., ratón. Aunque los anticuerpos murinos pueden ser "humanizados" injertando dominios constantes

humanos en los dominios de enlace a antígeno murino, los anticuerpos humanos como se revelan aquí se producen sin la necesidad de manipulación genética dispendiosa y demandante en tiempo de una secuencia de anticuerpo murino.

Polipéptidos de anticuerpo monovalentes:

Las cadenas de polipéptido pesada y ligera de los anticuerpos comprende regiones variables (V) que participant directamente en las interacciones de antígeno, y regiones constantes (C) que proveen suporte estructural y función en las interacciones especificad de no antígeno con efectores inmunes. El dominio de enlace de antígeno de un anticuerpo convencional está comprendido de dos dominios separados: un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L. que puede ser $V\kappa$ o $V\lambda$). El sitio de enlace de antígeno en sí está formado por seis asas de polipéptido: tres del dominio V_H (H1, H2 y H3) y tres del dominio V_L (L1, L2 y L3). *In vivo*, se produce un repertorio primario diverso de genes V que codifican los dominios V_H y V_L mediante reordenamiento combinatorial de los segmentos del gen. Las regiones C incluyen las regiones C de cadena ligera (referidas como las regiones C_L) y las regiones C de cadena pesada (referidas como regiones C_H1, C_H2 y C_H3). Un anticuerpo que se encuentra naturalmente comrpende generalmente dos dominios de enlace de antígeno y por lo tanto es divalente.

Un número de fragmentos de antígeno más pequeños de anticuerpos que se encuentran naturalmente han sido identificados seguida de la digestión de proteasa. Estos incluyen, por ejemplo, el "fragmento Fab" (V_L-C_L-C_H1-V_H), "fragmento Fab'" (un Fab con la región bisagra de cadena pesada), y "fragmento $F(ab')_2$" (un dímero de fragmentos Fab' unidos por la región bisagra de cadena pesada). Se han usado métodos recombinants para generar tales fragmentos y generar fragmentos de enlace de antígeno incluso más pequeños, p.e., aquellos referidos como "Fv de cadena sencilla" (fragmento variable) o "scFv", que consiste de V_L y V_H unidos mediante u enlazante de péptido sintético (V_L-enlazante-V_H). Los fragmentos Fab, fragmentos Fab' y fragmentos scFv son monovalentes para el enlace de antígeno, porque cada

uno comprende solamente un dominio de enlace de antígeno que comprende un dímero V_H/V_L. Fragmentos de anticuerpo monovalentes incluso más pequeños son los "anticuerpos de dominio" o "dAbs", que comprenden solamente un dominio variable de inmunoglobulina sencillo, p.e., V_H o V_L, que solo se enlaza específicamente a antígeno, p.e., sin la necesidad de un dominio V_L o V_H complementario, respectivamente.

El término "dAb" se referirá aquí a un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo (V_H o V_L) que se enlaza específicamente a antigeno. Un "dAb" se enlaza a antígeno independientemente de otros dominios V; sin embargo, un "dAb" puede estar presente en un homo- o heteromultímero con otros dominios V_H o V_L en donde no se requieren los otros dominios para el enlace de antígeno por el dAb, p.e., cuando el dAb enlaza a antígeno independientemente de los dominios V_H o V_L adicionales. La preparación de dominios variables de inmunoglobulina sencillos se describe y ejemplifica aquí más adelante.

Los polipéptidos de anticuerpo monovalentes pueden ser generados de diferentes formas. Por ejemplo, se puede manipular la secuencia de ácido nucleico que codifica las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo conocido por enlazar a CD40L para generar un número de polipéptidos de anticuerpo diferentes que son monovalentes para el enlace de CD40L. Así, dadas las secuencias que codifican los polipéptidos de cadena pesada y ligera que constituyen un anticuerpo y metodologías de clonación molecular estándar, uno puede generar construcciones de polipéptido de enlace de antígeno monovalente tales como fragmentos Fab, scFv, dAbs, o incluso anticuerpos biespecíficos (p e., anticuerpos que comprenden dos mitades de enlace de antígeno diferentes y pueden por lo tanto, enlazar dos antígenos separados, preferiblemente simultáneamente) que son monovalentes para CD40L.

Así, un medio para generar polipéptidos de anticuerpo monovalentes específicos para CD40L es amplificar y expresar las regiones V_H y V_L de las secuencias de gen de cadena pesada y cadena ligera aisladas, por ejemplo, de un hibridoma (p.e., un hibridoma de ratón) que expresa anticuerpo monoclonal anti-CD40L. Los límites de los dominios V_H y V_L están indicados por Kabat et al. (1991, supra). La información en cuando a los límites de los dominios V_H y V_L

de genes de cadena pesada y ligera se usa para designer cebadores de PCR que amplifican el dominio V de una secuencia de codificación de cadena pesada o ligera que codifica un anticuerpo conocido que enlaza a CD40L. Los dominios V amplificados son insertados en un vector de expresión adecuado, p.e., pHEN-1 (Hoogenboom et al., 1991, Nucleic Acids Res. 19: 4133-4137) y expresados, p.e., como una fusión de los V_H y V_L en un scFv u otro formano monovalente adecuado. El polipéptido resultante es entonces seleccionado para enlace monovalente de alta afinidad a CD40L. Para todos los aspectos de la presente invención, la selección para enlace se realiza como se conoce en la técnica o como se describe aquí más adelante.

Alternativamente, se pueden usar métodos de selección de biblioteca para identificar proteínas de enlace específicas a CD40L monovalentes. La tencología de Despliegue del Fago (ver, p.e., Smith, 1985, Science 228: 1315; Scott & Smith, 1990, Science 249: 386; McCafferty et al., 1990, Nature 348: 552) provee un criterio para la selección de polipéptidos de anticuerpo que enlazan un objetivo desdeado entre repertorios grandes y diversos de polipéptidos de anticuerpo. Estas bibliotecas de fago-anticuerpo pueden ser agrupadas en dos categorías: bibliotecas naturales que usan genes V reordenados cosechados de células B humanas (Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222: 581; Vaughan et al., 1996, Nature Biotech., 14: 309) o bibliotecas sintéticas por medio de las cuales los segmentos de gen V de línea germinal u otras secuencia de codificación de polipéptido de anticuerpo son 'reodernadas" *in vitro* (Hoogenboom & Winter, 1992, J. Mol. Biol., 227: 381; Nissim et al., 1994, EMBO J., 13: 692; Griffiths et al., 1994, EMBO J., 13: 3245; De Kruif et al., 1995, J. Mol. Biol., 248: 97) o cuando CDRs sintéticas son incorporadas en un gen V reordenado sencillo (Barbas et al., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457). Los métodos que involucran paquetes de despliegue (p.e., despliegue del fago, despliegue de polisoma) son bien apropiados para la selección de construcciones de anticuerpo específicas de CD40L monovalentes porque generalmente expresan solamente framentos monovalentes, en lugar de anticuerpos enteros divalentes, en los paquetes de despliegue. Los métodos para la preparación de bibliotecas de despliegue del fago que muestran varios fragmentos de anticuerpo se describen en las referencias anteriores. Tales métodos también se describen, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 6,696,245, que está incorporada aquí para referencia. Los métodos descritos en la patente

'245 involucran generalmente la aleatorización de regiones seleccionadas de regiones de codificación de ge de inmunoglobulina, en particular regiones de codificación V_H y V_L, mientras dejan otras regiones no aleatorizadas (ver más adelante). La patente '245 también describe la generación de construcciones de scFv que comprenden dominios V_H y V_L inidivdualmente aleatorizados.

El gen V_H se produce mediante la recombinación de tres segmentos de gen, V_H, D y J_H-. En humanos, hay aproximadamente 51 segmentos V_H funcionales (Cook y Tomlinson (1995) Immunol Today 16: 237), 25 segmentos D funcionales (Corbett et al. (1997) J. Mol. Biol. 268: 69), y 6 segmentos J_H funcionales (Ravetch et al. (1981) Cell 27: 583), dependiendo del haplotipo. El segmento V_H codifica la región de la cadena de polipéptido que forma la primera y segunda asas de enlace de antígeno del dominio V_H (H1 y H2), mientras que los segmentos V_H, D y J_H se combinan para formar la tercera asa de enlace de antígeno del dominio V_H (H3).

El gen V_L se produce mediante la recombinación de solamente dos segmentos, V_L y J_L. En humanos, hay aproximadamente 40 segmentos Vκ funcionales (Schable y Zachau (1993) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374: 1001), 31 segmentos Vλ funcionales (Williams et al. (1996) J. Mol. Biol. 264: 220; Kawasaki et al. (1997) Genome Res. 7: 250), 5 segmentos Jκ funcionales (Hieter et al. (1982) J. Biol. Chem. 257: 1516) y 4 segmentos Jλ funcionales (Vasicek y Leder (1990) J. Exp. Med. 172: 609), dependiendo del haplotipo. El segmento V_L codifica la región de la cadena de polipéptido que forma las asas de enlace de antígeno primera y segunda del dominio V_L (L1 y L2), mientras que los segmentos V_L y J_L se combinan para formar ela tercer asa de enlace de antígeno del dominio V_L (L3). Se cree que los anticuerpos seleccionados de este repertorio primario son suficientemente diversos para enlazar casi todos los antígenos con al menos afinidad moderada. Los anticuerpos de alta afinidad se producen *in vivo* mediante "maduración de afinidad" de los genes reordenados, en los cuales mutaciones puntuales son generadas y seleccionadas por el sistema inmune son base en el enlace mejorado.

El análisis de las estructuras y secuencias de los anticuerpos ha mostrado que cinco de las seis asas de enlace de antígeno (H1, H2, L1, L2, L3) poseen un número limitado de conformaciones de cadena principal o

estructuras canónicas (Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901; Chothia et al. (1989) Nature 342: 877). Las conformaciones de cadena principal se determinan mediante (i) la longitud de la asa de enlace de antígeno, y (ii) residuos particulares, o tipos de residuos, en ciertas posiciones clave en el asa de enlace de antígeno y el marco del anticuerpo. El análisis de las longitudes de asa y residuos clave ha permitido la predicción de las conformaciones de cadena principal de H1, H2, L1, L2 y L3 codificadas por la mayoría de secuencias de anticuerpo humanas (Chothia et al. (1992) J Mol. Biol. 227: 799; Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14: 4628; Williams et al. (1996) J. Mol. Biol. 264: 220). Aunque la región H3 es mucho más diversa en término de secuencia, longitud y estructura, (debido al uso de segmentos D), también forma un número limitado de conformaciones de cadena principal para longittudes de asa cortas que dependen de la longitud y presencia de residuos particulares, o tipos de residuos, en posiciones claves en el asa y el marco del anticuerpo (Martin et al. (1996) J. Mol. Biol. 263: 800; Shirai et al. (1996) FEBS Letters 399: 1.

Aunque en un criterio, se puede agregar diversidad a repertorios sintéticos en cualquier sitio en las CDRs de las diferentes asas de enlace de antígeno, este criterio produce una mayor proporción de dominios V que no se pliegan apropiadamente, y por lo tanto, contribuyen a una menor proporción de moléculas con el potencial de enlazar antígeno. Una comprensión de los residuos que contribuyen a la conformación de la cadena principal de las asas de enlace de antígeno permite la identificación de residuos específicos a diversificar en un repertorio sintético de dominios V_H o V_L. Esto es, la diversidad se introduce mejor en residuos que no son esenciales para mantener la conformación de cadena principal. Como un ejemplo, para la diversificación del asa L2, el criterio convencional sería diversificar todos los residuos en la CDR correspondiente (CDR2) definida por Kabat et al. (1991, supra), unos siete residuos. Sin embargo, para L2, se conoce que las posiciones 50 y 53 son diversas en anticuerpos que se encuentran naturalmente y se observa que hacen contacto con el antígeno. El criterio preferido sería diversificar solamente aquellos residuos en esta asa. Esto representa un mejoramiento significativo en términos de la densidad funcional requerida para crear un rango de especificidades de enlace de antígeno.

Las bibliotecas de polipéptido de inmunoglobulina pueden ser diseñadas convenientemente basandose en una conformación de cadena principal de dominio variable predeterminado Tales bibliotecas pueden ser construídas como se describe en la Solicitud de Patente Internacional WO 99/20749, cuyos contenidos están incorporados aquí por referencia. Así, en un aspecto, un polipéptido de anticuerpo comprende la secuencia de amino ácido de un segmento de gen de región V de línea germinal humana dado, p.e., segmento CD-47 de gen de línea germinal V_H, o segmento DPK9 de gen de línea germinal V_K. Tales polipéptidos de región variable se pueden usar para la producción de scFvs o Fabs, p.e., un scFv o Fab que comprende (i) un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H), o fragmento de enlace de antígeno del mismo, que comprende la secuencia de amino ácido del segmento DP-47 de línea germinal V_H y (ii) un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (V_L), o fragmento de enlace de antígeno del mismo, que comprende la secuencia de amino ácido del segmento DPK49 de la línea germina V_K. La diversificación de secuencias dentro del contexto de los segmentos de gen de línea germinal de cadena pesada y ligera, p.e., DP-47, DPK 9, DP45, DP38, etc. pueden generar un repertorio de diversas secuencias de codificación de inmunoglobulina. Un criterio para la diversificación se describe a continuación en el contexto de generación de biblioteca de secuencias de dAb o scFv diversificadas. Estos polipéptidos de región variable también pueden ser expresados como dAbs y seleccionados por enlace de alta afinidad a CD40L. El repertorio puede ser clonado o generado en un vector adecuado para despliegue del fago, p.e., un vector de despliegue lambda o de bacteriófago filamentoso y ser entonces seleccionado por enlace a un antígeno objetivo dado, p.e., CD40.L.

Preparación de Polipéptidos de Dominio Variable de Inmunoglobulina Sencillos Humanos:

Un dominio variable de inmunoglobulina sencillo es un dominio de polipéptido plegado que comprende secuencias características de dominios variables de inmunoglobulina y que enlazan específicamente un antígeno (p.e., constante de disociación de 500 nM o menos), y que enlazan antígeno como un dominio variable sencillo; esto es, hay un sitio de enlace proporcionado por un dominio variable de inmunoglobulina sencillo sin ningún dominio variable

complementario. Un dominio variable de inmunoglobulina sencillo, por lo tanto, incluye dominios variables de anticuerpo completos así como dominios variables modificados, por ejemplo en los cuales una o más asas han sido reemplazadas por secuencias que no son características de dominios variables de anticuerpo, o dominios variables de anticuerpo que han sido truncados o comprenden extensiones de terminal N o C, así como fragmentos plegados de dominios variables que retienen una constante de disociación de 500 nM o menos (p.e., 450 nM o menos, 400 nM o menos, 350 nM o menos, 300 nM o menos, 250 nM o menos, 200 nM o menos, 150 nM o menos, 100 nM o menos) y la especificidad a antígeno objetivo del dominio de longitud total. Preferiblemente, un dominio variable sencillo de anticuerpo útil en la invención se selecciona del grupo de V_H y V_L, incluyendo V_{kappa} y V_{lambda} Los dominios variables de inmunoglobulina sencillos de uso aquí son preferiblemente "humanos" según se definió el término aquí.

Preparación de Dominios variables de inmunoglobulina sencillos:

Los dominios variables de inmunoglobulina sencillos se preparan de varias formas. Para cada uno de estos criterios se aplican métodos de preparación bien conocidos (p.e., amplificación, mutación, etc.) y manipulación de secuencias de ácido nucleico.

Un medio para preparar dominios variables de inmunoglobulina sencillos es amplificar y expresas la región V_H o V_L de un gen de cadena pesada o cadena ligera para un anticuerpo clonado conocido por enlazar el antígeno deseado. Esto es, el dominio V_H o V_L de una región de codificación de anticuerpo anti-CD40L conocida puede ser amplificado y expresado como un dominio sencillo (o como una fusión de un dominio sencillo) y evaluado para enlace a CD40L. Los límites de los dominios V_H y V_L están indicados en Kabat et al. (1991, supra). La información en cuanto a los límites de los dominios V_H y V_L de genes de cadena pesada y cadena ligera se usa para diseñar cebadores de PCR que amplifican el dominio V a partir de una secuencia de codificación de cadena pesada o ligera clonada que codifica un anticuerpo conocido por enlazar a CD40L. El dominio V amplificado es insertado en un vector de expresión adecuado, p.e., pHEN-1 (Hoogenboom et al., 1991, Nucleic Acids

Res. 19: 4133-4137) e insertado, ya sea solo o como una fusión con otra secuencia de polipéptido.

En un enfoque preferido, un repertorio de dominios V_H o V_L, preferiblemente dominios V_H o V_L humanos, es seleccionado mediante, por ejemplo, despliegue del fago, en toma panorámica contra el antígeno deseado. Los métodos para la construcción de bibliotecas de despliegue del fago y bibliotecas de expresión de fago lambda son bien conocidos en la técnica, y enseñados, por ejemplo, por: McCafferty et al., 1990, Nature 348: 552; Kang et al., 1991, Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A., 88: 4363; Clackson et al., 1991, Nature 352: 624; Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832; Burton et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 88: 10134; Hoogenboom et al., 1991, Nucleic Acids Res. 19: 4133; Chang et al.,1991, J. Immunol. 147: 3610; Breitling et al., 1991, Gene 104: 147, Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581; Barbas et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 4457; Hawkins y Winter (1992) J. Immunol., 22: 867; Marks et al. (1992) J. Biol. Chem., 267: 16007; y Lerner et al. (1992) Science, 258: 1313. Las bibliotecas de despliqgue del Fago Fab son enseñadas, por ejemplo, por U.S. 5,922,545. Las bibliotecas de fago de scFv son enseñadas, por ejemplo, por Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci U.S A. 85: 5879-5883; Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 87: 1066-1070; McCafferty et al., 1990, supra; Clackson et al., 1991, supra; Marks et al., 1991, supra; Chiswell et al., 1992, Trends Biotech. 10: 80; y Marks et al., 1992, supra. Se han descrito varias realizaciones de bibliotecas de scFv desplegadas en proteínas de recubrimiento de bacteriófago. También son conocidos los refinamientos de enfoques de despliegue del fago, como se describe por ejemplo en WO96/06213 y WO92/01047 (Medical Research Council et al.) y WO97/08320 (Morphosys, supra).

El repertorio de dominios V_H o V_L puede ser un repertorio que se encuentra naturalmente de secuencias de inmunoglobulina o un repertorio sintético. Un repertorio que se encuentra naturalmente es uno preparado, por ejemplo, a partir de células que expresan inmunoglobulina cosechadas de uno o más individuos. Tales repertorios pueden ser "inocuos" p.e., preparados, por ejemplo, de células fetales humanas o de recién nacido que expresan inmunoglobulina, o reordenados, p.e., preparados a partir de, por ejemplo, células B humanas adultas. Los repertorios naturales se describen, por

ejemplo, en Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581 y Vaughan et al., 1996, Nature Biotech. 14: 309. Si se desea, clones identificados de un repertorio natural, o cualquier repertorio, para esa materia, que enlazan el antígeno objetivo son luego sometidos a mutagénesis y selección adicional con el fin de producir y seleccionar variantes con características de enlace mejoradas.

Los repertorios sintéticos de dominios variables de inmunoglobulina sencillos se preparan introduciendo artificialmente diversidad en un dominio V clonado. Los repertorios sintéticos se describen, por ejemplo, en Hoogenboom & Winter, 1992, J. Mol. Biol. 227: 381; Barbas et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 4457; Nissim et al., 1994, EMBO J. 13: 692; Griffiths et al, 1994, EMBO J. 13: 3245; DeKriuf et al., 1995, J. Mol. Biol. 248: 97; y WO 99/20749.

En un aspecto, los repertorios sintéticos de dominio variable se preparan en patrones V_H o V_K, con base en secuencias V_H y V_K de línea germinal diversificada artificialmente. Por ejemplo, el repertorio de dominio V_H se puede basar en segmentos V3-23/DP47 (Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 227: 7768) y JH4b de gen V_H de línea germinal clonada. El repertorio de dominio V_K se puede basar, por ejemplo, en segmentos O2/O12/DPK9 (Cox et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24: 827) y J_K1 de gen V_K de línea germinal. La diversidad es introducida en estos u otros segmentos de gen mediante, por ejemplo, mutagénesis de PCR. La diversidad puede ser introducida aleatoriamente, por ejemplo, mediante PCR susceptible a error (Hawkins, et al., 1992, J. Mol. Biol. 226: 889) o mutagenesis química. Como se discutió anteriormente, sin embargo, se prefiere que la introducción de diversidad sea marcada para residuos particulares. Se prefiere además que los residuos deseados sean marcados mediante la introducción del codón NNK usando cebadores muagénicos (usando la nomenclatura IUPAC, en donde N = G, A, T o C, y K = G o T), que codifica todos los amino ácidos y el codón finalizador TAG. Otros codones que alcanzan propósitos similares también son de uso, incluyendo el codón NNN (que conduce a la producción de los codones finalizadores adicionales TGA y TAA), codón DVT ((A/G/T) (A/G/C)T), codón DVC ((A/G/T)(A/G/C)C), y codón DVY ((A/G/T)(A/G/C)(C/T). El codón DVT codifica 22% de serina y 11% de tirosina, asgpargina, glycina, alanina, aspartato, treonina y cisteína, que imitan más cercanamente la distribución de residuos de amino ácido para los sitios de enlace de antígeno de anticuerpos humanos

naturales. Los repertorios se hacen usando cebadores de PCR que tienen el codón o codones degenerados seleccionados en cada sitio a ser diversificado. La mutagénesis de PCR es bien conocida en la técnica.

En un aspecto, la diversidad es introducida en la secuencia de los segmentos V3-23/DP47 (Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 227: 7768) y JH4b de gen V_H de línea germinal humana isando el codón NNK en los sitios H30, H31, H33, H35, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H97 y H98, correspondientes para diversificar en las CDRs 1, 2 y 3, con la numeración usada como en U.S. 6,696,245.

En otro aspecto, la diversidad es tambíen introducida a la secuencia de los segmentos V3-23/DP47 y JH4b de gen V_H de línea germinal humana, por ejemplo, usando el codón NNK en los sitios H30, H31, H33, H35, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H97, H98, H99, H100, H100a y H100b, correspondientes para diversificar en las CDRs 1, 2 y 3, con la numeración usada como en U.S. 6,696,245.

En otro aspecto, la diversidad es introducida en la secuencia de los segmentos O2/O12/DPK9 y $J_\kappa 1$ de gen $V\kappa$, por ejemplo, usando el codón NNK en los sitios L30, L31, L32, L34, L50, L53, L91, L92, L93, L94 y L96, correspondientes para diversificar en las CDRs 1, 2 y 3, con la numeración usada como en U.S. 6,696,245.

Los repertorios diversificados son clonados en vectores de despliegue del fago como se conoce en la técnica, y como se describe, por ejemplo, en WO 99/20749. En general, las moléculas de ácido nucleico y construcciones de vector requeridas para la realización de la presente invención están disponibles en la técnica y son construidas y manipuladas como se establece en los manuales de laboratorio estándar, tal como Sambrook et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, USA.

La manipulación de ácidos nucleicos en la presente invención se realiza típicamente en vectores recombinantes. Como se usa aquí, "'vector" se refiere a un elemento discreto que se usa para introducir ADN heterólogo en células para la expresión y/o replicación del mismo. Los métodos para seleccionar o

construir y, posteriormente, usar tales vectores son bien conocidos por el experto en la técnica. Numerosos vectores están disponibles públicamente, incluyendo plásmidos bacterianos, bacteriófago, cromosomas artificiales y vectores episomales. Tales vectores se pueden usar para clonación y mutagénesis sencilla; alternativamente, como es típico de los vectores en los cuales los miembros de repertorio (o pre-repertorio) de la invención son portados, se emplea un vector de expresión de gen. Un vector de uso de acuerdo con la invención se selecciona para acomodar una secuencia de codificación de polipéptido de un tamaño deseado, típicamente de 0.25 kilobase (kb) a 40 kb de longitud. Una célula hospedera adecuada es transformada con el vector después de manipulaciones de clonación in vitro. Cada vector contiene varios componentes funcionales, que incluyen generalmente un sitio de clonación (o "polienlazante "), un origen de replicación y al menos un gen marcador seleccionable. Si un vector dato es un vector de expresión, posee adicionalmente uno o más de los siguientes: elemento mejorador, promotor, secuencias de terminación de transcripción y de señal, cada una posicionada en la vecindad del sitio de clonación, de forma que se enlazan operativamente al gen que codifica un miembro del repertorio de polipéptido de acuerdo con la invención.

Los vectores de clonación y expresión contienen generalmente secuencias de ácido nucleico que permiten al vector replicarse en una o más células hospederas seleccionadas. Típicamente en vectores de clonación, esta secuencia es una que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico hospedero e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónomas. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levadura y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen de plásmido de 2 micrones es adecuado para levadura, y varios orígenes virales (p.e. SV 40, adenovirus) son útiles para vectores de clonación en células mamíferas. Generalmente, el origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión mamíferos a menos que estos sean usados en células mamíferas capaces de replicar altos niveles de ADN, tales como células COS.

Convenientemente, un vector de clonación o expresión también contiene un gen de selección también referido como un marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células hospederas transformadas en un medio de cultivo selectivo. Las células hospederas no transformadas con el vector que contiene el gen de selección, por ende, no sibrevivirá en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, p.e., ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, deficiencias auxotróficas de complemento, o suministran nutrientes típicos no disponibles en el medio de crecimiento.

Como la replicación de vectores de acuerdo con la presente invención se realiza más convenientemente en E. coli, se usa un marcador seleccionable de E. coli, por ejemplo, el gen de β-lactamasa que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Estos pueden ser obtenidos de plásmidos de E. coli, tal como pBR322 o un plásmido pUC tales como pUC18 o pUC19.

Los vectores de expresión contienen usualmente un promotor que es reconocido por el organismo hospedero y está enlazado operablemente a la secuencia de codificación de interés. Tal promotor puede ser inducible o constitutivo. El término "enlazado operablemente" se refiere a la juxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera destinada. Una secuencia de control "enlazada operablemente" a una secuencia de codificación está ligada de tal forma que la expresión de la secuencia de codificación se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

Promotores adecuados para uso con hospederos procarióticos incluyen, por ejemplo, los sistemas de promotor β-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema promotor de triptofano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac. Los promotores para uso en los sistemas bacterianos también contendrán generalmente una secuencia Shine-Dalgarno enlazada operablemente a la secuencia de codificación.

En las bibilotecas o repertorios como se describen aquí, los vectores preferidos son vectores de expresión que permiten la expresión de una

secuencia de nucleótido a un miembro de biblioteca de polipéptido. Así, la selección se realiza mediante propagación separada y expresión de un solo clon que expresa el miembro de biblioteca de polipéptido o mediante el uso de cualquier sistema de despliegue de selección. Como se describió anteriormente, un sistema de despliegue de selección preferido usa despliegue de bacteriófago. Por ende, se pueden usar vectores de fago o fagémido. Los vectores preferidos son vectores fagémidos, que tienen un origen de replicación E. coli (para replicación de cadena doble) y también un origen de replicación fago (para producción de ADN de cadena sencilla). La manipulación y expresión de tales vectores es bien conocida en la técnica (Hoogenboom y Winter (1992) supra; Nissim et al. (1994) supra). Brevemente, el vector contiene una β-lactamasa u otro gen marcador seleccionable para conferir selectividad en el fagémido, y un promotor lac ascendentemente de un casete de expresión que consiste (N a C terminal) de una secuencia líder pelB (que dirige el polipéptido expresado al espacio periplásmico), un sitio de clonación múltiple (para clonar la versión de nucleótido del miembro de biblioteca), opcionalmente, una o más etiquetas de péptido (para detección), opcionalmente, uno o más codones de finalización TAG y la proteína PIII de fago. En una realización, el vector codifica, en lugar de la secuencia líder pelB, una secuencia lider GAS1 eucariótica que sirve para dirigir la secreción del polipéptido de fusión al espacio periplásmico en E. coli o al medio en sistemas de células eucarióticas. Usando varias cepas de E.coli supresoras y no supresoras y con la adición de glucosa, iso-propil tio-β-D-galactosida (PTG) o un fago colaborador, tal como VCS MI 3, el vector es capaz de reclicarse como un plásmido sin expresión, producir grandes cantidades del miembro de biblioteca solamente, o producir fago, alguno de los cuales contiene al menos una copia de la fusión polipéptido-pIII en su superficie.

Un ejemplo de un vector preferido es el vector fagémido pHEN1 (Hoogenboom et al., 1991, Nucl. Acids Res. 19: 4133-4137; la secuencia está disponible, p.e., como SEQ ID NO: 7 en WO 03/031611), en la cual la producción de la proteína de fusión pIII está bajo el control del promotor LacZ, que es inhibido en la presencia de glucosa e inducido con IPTG. Cuando se cultiva en cepas supresoras de E. coli, p.e., TGI, la proteína de fusión III del gen es producida y empacada en el fago, mientras que el crecimiento en cepas no supresoras, p.e., HB2151, permite la secreción de proteína de fusión soluble

en el periplasma bacteriano en el medio de cultivo. Como la expresión del gene III evita la infección posterior con fago colaborador, las bacterias que portan los vectores de fagémido son propagadas en la presencia de glucosa antes de la infección con el fago colaborador VCSM 13 para rescate del fago.

La construcción de vectores de acuerdo con la invención emplea técnicas de ligadura convencionales. Vectores aislados o fragmentos de ADN son clivados, ajustados, y re-ligados en la forma deseada para generar el vector requerido. Si se desea, se realiza un análisis de secuencia para confirmar que las secuencias correctas están presentes en el vector construído, usando métodos estándar. Métodos adecuados para construir vectores de expresión, preparar transcriptos in vitro, introducir ADN en células hospederas, y realizar análisis para evaluar la expresión y función, son conocidos por los expertos en la técnica. La presencia de una secuencia de gen en una muestra es detectada, o su amplificación y/o expresión cuantificada por métodos convencionales, tales como análisis Al Sur o al Norte (Southern o Northern), manchado hacia el occidente (Western blotting), manachado puntual (dot blotting) de ADN, ARN o proteína, hibridación in situ, inmunoccitoquímica o análisis de secuencia de moléculas de ácido nucleico o proteína. Los expertos en la técnica contamplerán fácilmente cómo se pueden modificar estos métodos, si se desea.

Selección de Dominios Variables de inmunoglobulina Sencillos para Enlace de Antígeno:

Siguiendo la expresión de un repertorio de dominios variables de inmunoglobulina sencillos en la superficie del fago, la selección se realiza contactando el repertorio del fago con antígeno objetivo inmovilizado (p.e., CD40L y/o un epítopo enlazado por DOM8-24), lavando para remover el fago no enlazado, y propagación del fago enlazado, el proceso completo frecuentemente se refiere como "toma panorámica". Este proceso es aplicable a la selección de dominios variables de inmunoglobulina sencillos así como otros fragmentos de anticuerpo que pueden ser expresados en una biblioteca de despliegue, p.e., scFv, Fab, etc. Alternativamente, los fagos son pre-seleccionados para la expresión de variantes de miembro plegadas apropiadamente mediante toma panorámica contra un ligando genérico

inmovilizado (p.e., proteína A o proteína L) que es enlazada solamente por miembros plegados. Esto tiene la ventaja de reducir la proporción de miembros no funcionales, aumentado así la proporción de miembros que probablemente enlaza un antígeno objetivo. La pre-selección con los ligandos genéricos se enseña en WO 59 99/20749. La selección de bibliotecas de anticuerpo está descrita generalmente, por ejemplo, en Harrison et al., 1996, Meth. Enzymol. 267: 83-109.

La selección se realiza comúnmente usando antígeno purificado inmovilizado en un soporte sólido, por ejemplo, tubos o pozos plásticos, o en una matríz de cromatografía, por ejemplo Sefarosa™ (Pharmacia). La separación o selección también se puede realizar en antígenos complejos, tales como la superficie de células (Marks et al., 1993, BioTechnology 11: 1145; de Kruif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 3938). Otra alternativa involucra la selección mediante enlace de antígeno biotinilado en solución, seguida por captura en perlas recubiertas con estreptavidina.

En un aspecto preferido, la toma panorámica se realiza inmovilizando el antígeno (genérico o específico) en tubos o pozos en una placa, p.e., bandas de 8 pozos de inmunotubo Nunc MAXISORP™. Los pozos son recubiertos con 150 µl de antígeno (100 µg/ml en PBS) e incubados durante la noche Los pozos son entonces lavados 3 veces con PBS y bloqueados con 400 µl de PBS-2% de leche descremada (2% de MPBS) a 37 °C por 2 hr. Los pozos son enjuagados 3 veces con PBS y el fago es agregado en 2% de MPBS. La mezcla es incubada a temperatura ambiente por 90 minutos y el líquido, que contiene fago no enlazado, es removido. Los pozos son enjuagados 10 veces con PBS-0.1% de tween 20, y luego 10 veces con PBS para remover el detergente. El fago no enlazado es eluido adicionando 200 µl de trietilamina 100 mM recién preparada, mezclado bien e incubando por 10 min a temperatura ambiente. El fago eluido es transferido a un tubo que contiene 100 µl de Tris-HCl 1M, pH 7.4 y vorticeado para neutralizar la trietilamina. Las células hospederas E. coli de crecimiento exponencial (p.e., TGI) son infectadas con, por ejemplo, 150 ml del fago eluido incubando por 30 min a 37 °C. Las células infectadas son centrifugadas, resuspendidas en medio fresco y colocadas en placas en agarosa superior. Las placas de fago son eluidas o recogidas en cultivos frescos de células hospederas a propagar para análisis o

para rondas adicionales de selección. Se realizan una o más rondas de purificación de placa, si es necesario, para asegurar poblaciones puras de fago seleccionado. Otros criterios de selección se describen en Harrison et al., 1996, supra.

Siguiendo la identificación de fago que expresa un dominio variable de inmunoglobulina sencillo que enlaza un objetivo deseado, si se ha usado un vector fagémido tal como pHEN1, las proteínas de fusión de dominio variable se producen fácilmente en forma soluble infectando cepas de bacterias no supresoras, p.e., HB2151 que permiten la secreción de la proteína de fusión de gen III soluble Si un péptido de señal de secreción de GAS 1 es codificado por el vector, el polipéptido de fusión puede ser secretado por células eucarióticas (p.e., levadura o mamífero) o procarióticas (p.e., E. coli). Alternativamente, la secuencia del dominio V puede ser sub-clonada en un vector de expresión apropiado para producir proteína soluble de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Purificación y Concentración de Dominios Variables de inmunoglobulina Sencillos:

Los polipéptidos de dominio variable de inmunoglobulina sencillo u otros polipéptidos de anticuerpo monovalentes secretados en el espaacio periplásmico o en el medio de bacterias soon cosechados y purficados de acuerdo con métodos conocidos (Harrison et al., 1996, supra). Skerra & Pluckthun (1988, Science 240: 1038) y Breitling et al. (1991, Gene 104: 147) describen la cosecha de polipéptidos de anticuerpo a partir de periplasma, y Better et al. (1988, Science 240: 1041) describe la cosecha a partir del sobrenadante del cultivo. Para algunos polipéptidos de anticuerpo, la purificación también se puede lograr mediante el enlace a ligandos genéricos, tales como proteína A o Proteína L. Alternativamente, los dominios variables pueden ser expresados con una etiqueta de péptido, p.e., las etiquetas Myc, HA o 6X-His, que facilitan la purificación mediante cromatografía de afinidad.

Si es necesario, los polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L monovalentes son concentrados mediante cualquiera de varios métodos bien concocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ultrafiltración, diafiltración y filtración de

flujo tangencial. El proceso de ultrafiltración usa membranas semi-permeables y presión para separar especies moleculares con base en el tamaño y la forma. La presión es proporcionada mediante presión de gas o centrifugación. Los productos de ultrafiltración comercial están ampliamente disponibles, p.e., en Millipore (Bedford, MA; ejemplos incluyen los concentradores Centricon™ y Microcon™) y Vivascience (Hannover, Alemania; ejemplos incluyen los concentradores Vivaspin™). Mediante la selección de un corte de peso molecular menor al polipéptido objetivo (usualmente 1/3 a 1/6 del peso molecular del polipéptido objetivo, aunque se pueden usar diferencias tan pequeñas como 10 kD con éxito), el polipéptido es retenido cuando el solvente y solutos más pequeños pasan a través de membrana. Así, un corte de peso molecular de aproximadamente 5 kD es útil para la concentración de polipéptidos de dominio variable de inmunoglobulina sencillos anti-CD40L descritos aquí.

La diafiltración, que usa membranas de ultrafiltración con un proceso de "lavado", se usa cuando se desea remover o intercambiar la sal o amortiguador en una preparación de polipéptido. El polipéptido es concentrado por el paso del solvente y pequeño soluto a través de la membrana, y las sales remanentes o amortiguador son removidas por dilución del polipéptido retenido con un nuevo amortiguador o solución de sal o agua, según se desee, acompañada por ultrafiltración continuada. En una diafiltración continua, el nuevo amortiguador es adicionado a la misma velocidad que el filtrado pasa a través de la membrana. Un volumen de diafiltración es el volumen de solución de polipéptido antes del inicio de diafiltración – usando diafiltración continua, más del 99.5% de un soluto totalmente permeable puede ser removido mediante lavado a través de seis volúmenes de diafiltración con el nuevo amortiguador. Alternativamente, el proceso puede realizarse en una forma discontinua, en donde la muestra es diluida repetidamente y luego filtrada de nuevo a su volumen original para remover o intercambiar sal o amortiguador y finalmente concentrar el polipéptido. El equipo para diafiltración y las metodologías detalladas para su uso están disponibles, por ejemplo, en Pall Life Sciences (Ann Arbor, MI) y Sartorius AG/Vivascience (Hannover, Alemania).

La filtración de flujo tangencial (TFF), también conocida como "filtración de flujo cruzado", también usa membrana de ultrafiltración. El fluido que

contiene el polipéptido objetivo es bombeado tangencialmente a lo largo de la superficie de la membrana. La presión hace que una porción del fluido pase a través de la membrana mientras el polipéptido objetivo es retenido encima del filtro. Sin embargo, en contraste con la ultrafiltración estándar, las moléculas retenidas no se acumulan en la superficie de la membrana, sino que son transportadas a lo largo del flujo tangencial. La solución que no pasa a través del filtro (que contiene el polipéptido objetivo) puede circular repetidamente a través de la membrana para alcanzar el grado deseado de concentración. El equipo para TFF y las metodologías detalladas están disponibles, por ejemplo, en Millipore (p.e., el sistema TFF Benchtop ProFlux M12™ y los sistemas Pellicon™), Pall Life Sciences (p.e., El sistema de Filtración de Flujo Tangencial Minim™).

La concentración de proteína se mide de muchas formas bien conocidas en la técnica. Estas incluyen, por ejemplo, análisis de amino ácido, absorbancia a 280 nm, los métodos "Bradford" y "Lowry", y SDS-PAGE. El método más preciso es hidrólisis total seguida por análisis de amino ácido mediante HPLC, la concentración es entonces determinada luego de la comparación con la secuencia conocida del polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo. Aunque este es el método más preciso, es costoso y demandante en tiempo. La determinación de proteína midiendo la absorbancia UV a 280 nm es más rápido y mucho menos costoso, aunque relativamente preciso y se prefiere como un compromiso sobre el análisis de amino ácido. La absorbancia a 280 nm se usó para determinar las concentraciones de proteína reportadas en los Ejemplos descritos aquí.

Los ensayos de proteína de "Bradford" y "Lowry" (Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72: 248-254; Lowry et al.,1951, J. Biol. Chem. 193: 265-275) comparan la concentración de proteína en muestra con una curva estándar basada la mayoría de veces en albúmina de suero bovino (BSA). Estos métodos son menos precisos, y tienen a subestimar la concentración de dominios variables de inmunoglobulina sencillos. Su precisión podría ser mejorada, sin embargo, usando un polipéptido de dominio sencillo V_H o V_κ como un estándar.

Un método de ensayo de proteína adicional es el ensayo de ácido bicinconínico descrito en la Patente U.S. No. 4,839,295 (incorporada aquí mediante referencia) y comercializado por Pierce Biotechnology (Rockford, IL) como el "Ensayo de Proteína de BCA" (p.e., Catálogo Pierce No. 23227).

El método de SDS-PAGE usa electroforesis de gel y manchado de Azul de Coomassie en comparación con estándares de concentración conocidos, p.e., cantidades conocidas de un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo. La cuantificación se puede hacer a simple vista o mediante densitometría.

Los polipéptidos de enlace de antígeno de dominio variable de inmunoglobulina humanos descritos aquí retienen solubilidad a alta concentración (p.e., al menos 4.8 mg (~400 μM) en solución acuosa (p.e., PBS), y preferiblemente al menos 5 mg/ml (~417 μM), 10 mg/ml (~833 μM), 20 mg/ml (~1.7 mM), 25 mg/ml (~2.3 mM), 30 mg/ml (~2.5 mM), 35 mg/ml (~2.9 mM), 40 mg/ml (~3.3 mM), 45 mg/ml (~3.75 mM), 50 mg/ml (~4.2 mM), 55 mg/ml (~4.6 mM), 60 mg/ml (~5.0 mM), 65 mg/ml (~5.4 mM), 70 mg/ml (~5.8 mM), 75 mg/ml (~6.3 mM), 100 mg/ml (~8.33 mM), 150 mg/ml (~12.5 mM), 200 mg/ml (~16.7 mM), 240 mg/ml (~20 mM) o mayores). Una característica estructural que promueve alta solubilidad es el tamaño relativamente pequeño de los polipéptidos de dominio variable de inmunoglobulina sencillos. Un anticuerpo de cuatro cadenas de longitud convencional, p.e., IgG es de aproximadamente 150 kD de tamaño. En contraste, los dominios variables de inmunoglobulina sencillos, que tienen todos una estructura general que comprende 4 regiones de marco (FW) y 3 CDRs, tienen un tamaño de aproximadamente 12 kD, o menos de 1/10 del tamaño de un anticuerpo convencional. Igualmente, los dominios variables de inmunoglobulina sencillos son aproximadamente ½ del tamaño de una molécula de scFv (~26 kD), y aproximadamente 1/5 del tamaño de una molécula de Fab (~60 kD). Se prefiere que el tamaño de una estructura que contiene un dominio variable de inmunoglobulina sencillo revelado aquí sea de 100 kD o menos, icluyendo estructuras de, por ejemplo, aproximadamente 90 kD o menos, 80 kD o menos, 70 kD o menos, 60 kD o menos, 50 kD o menos, 40 kD o menos, 30 kD o menos, 20 kD o menos, hasta e incluyendo aproximadamente 12 kD, o un dominio variable de inmunoglobulina sencillo en aislamiento.

La solubilidad de un polipéptido se determina principalmente mediante las interacciones de las cadenas laterales de amino ácido con el solvente circundante. Las cadenas laterales hidrofóbicas tienen a estar localizadas internamente como un pliegue de polipéptido, lejos de las superficies de interacción con el solvente del polipéptido. Inversamente, los residuos hidrofílicos tienden a estar localizados en las superficies de interacción con el solvente de un polipéptido. Generalmente, los polipéptidos que tienen una secuencia primaria que permite que la molécula se pliegue para exponer más residuos hidrofílicos al ambiente acuoso son más solubles que uno que se pliega para exponer menos residuos hidrofílicos a la superficie. Así, el ordenamiento y número de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos es un determinante importante de la solubilidad. Otros parámetros que determinan la solubilidad del polipéptido incluyen pH del solvente, temperatura, y resistencia iónica. En una práctica común, la solubilidad de los polipéptidos puede ser mantenida o mejorada mediante la adición de glicerol (p.e., ~10% v/v) a la solución.

Como se discutió anteriormente, se han identificado residuos de amino ácido específicos en residuos conservados de dominios V_H humanos que varían en los dominios V_H de especies camélidas, que son generalmente más solubles que los dominios V_H humanos. Estos incluyen, por ejemplo, Gly 44 (Glu en camélidos), Leu 45 (Arg en camélidos) y Trp 47 (Gly en camélidos). El residuo de amino ácido 103 de V_H también está implicado en la solubilidad, con mutación desde Trp a Arg que tiene a conferir solubilidad de V_H aumentada.

En aspectos preferidos de la invención, los polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillos se basan en el segmento DP47 del gen V_H de línea germinal o el segmento DPK9 de gen V_κ de línea germinal. Así, esos segmentos de gen de línea germinal son capaces, particularmente cuando están diversificados en ubicaciones estrucutrales seleccionadas descritas aquí, de producir polipéptidos de dominio variable de inmunoglobulina sencillos de enlace específico que son altamente solubles. En particular, las cuatro regioens de marco, que preferiblemente no están diversificadas, pueden contribuir a la alta solubilidad de las proteínas resultantes.

Se espera que un dominio variable de inmunoglobulina humano sencillo que es altamente homólogo a uno que tiene una solubilidad alta conocida también tenderá a ser altamente soluble. Así, como un medio de predicción o reconocimiento que un dominio variable de inmunoglobulina sencillo dado tendría la alta solubilidad citada aquí, se puede comparar la secuencia de un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo a uno o más polipéptidos de dominio variable de inmunoglobulina sencillos que tienen solubilidad conocida. De esta forma, cuando se identifica que un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo tiene alta afinidad de enlace pero solubilidad desconocida, la comparación de su secuencia de amino ácido con una o mas (preferiblemente más) polipéptidos de dominio variable de inmunoglobulina sencillos conocidos por tener alta solubilidad (p.e., una secuencia de dAb revelada aquí) puede permitir la predicción de su solubilidad. Aunque no es un pronosticador absoluto, cuando hay un alto grado de similitud a una secuencia altamente soluble, p.e., 90-95% o mayor similitud, y particularmente cuando hay un alto grado de similitud con respecto a los residuos de amino ácido hidrofílicos, o residuos que probablemente estarán expuestos en la interfaz del solvente, es más probable que un polipéptido de enlace nuevo identificado tenga solubilidad similar al de la secuencia altamente soluble conocida.

También se puede usar el software de modelamiento molecular para predecir la solubilidad de una secuencia de polipéptido con relación a la de un polipéptido de solubilidad conocida. Por ejemplo, se espera que la sustitución o adición de un residuo hidrofóbico en la superficie expuesta a solvente, con relación a una molécula de solubilidad conocida que tiene un residuo menos hidrofóbico o incluso hidrofílico expuesto en esa posición disminuya la solubilidad relativa del polipéptido. Igualmente, se espera que la sustitución o adición de un residuo más hidrofílico en tal ubicación aumente la solubilidad relativa. Esto es, un cambio en el número neto de residuos hidrofílicos o hidrofóbicos localizados en la superficie de la molécula (o la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica global de los residuos expuestos en la superficie) con relación a una estructura de polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo con solubilidad conocida, puede predecir la solubilidad relativa de un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo.

Alternativamente, o en conjunto con tal predicción, se pueden determinar los límites de solubilidad de un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo tan solo concentrando el polipéptido.

Determinación de Afinidad:

Los polipéptidos que contienen dominio variable de inmunoglobulina sencillo aislado y polipéptidos de anticuerpo, como se describe aquí, tienen preferiblemente afinidades (constante de disociación, $K_d = K_{off}/K_{on}$) de al menos 500 nM o menos, y preferiblemente al menos 400 nM-50 pM, 300 nM-50 pM, 200 nM - 50 pM, y más preferiblemente al menos 100 nM - 50 pM, 75 nM - 50 pM, 50 nM - 50 pM, 25 nM - 50 pM, 10 nM - 50 pM, 5 nM- 50 pM, 1 nM - 50 pM, 950 pM - 50 pM, 900 pM - 50 pM, 850 pM - 50 pM, 800 pM - 50 pM, 750 pM - 50 pM, 700 pM - 50 pM, 650 pM - 50 pM, 600 pM - 50 pM, 550 pM - 50 pM, 500 pM - 50 pM, 450 pM - 50 pM, 400 pM - 50 pM, 350 pM - 50 pM, 300 pM - 50 pM, 250 pM - 50 pM, 200 pM - 50 pM, 150 pM - 50 pM, 100 pM - 50 pM, 90 pM - 50 pM, 80 pM - 50 pM, 70 pM - 50 pM, 60 pM - 50 pM, o incluso tan baja como 50 pM.

La afinidad de enlace de antígeno de un polipéptido de anticuerpo, p.e., un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo u otro polipéptido de anticuerpo monovalente, puede ser convenientemente medida mediante SPR usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ.). En este método, el antígeno es acoplado al chip BIAcore a concentraciones conocidas, y los polipéptidos de dominio variable son introducidos. El enlace específico entre el polipéptido de dominio variable y el antígeno inmovilizado produce concentración de proteína aumentada en la matriz de chip y un cambio en la señal de SPR. Los cambios en la señal de SPR son registrados como unidades de resonancia (RU) y mostradas con respecto al tiempo a lo largo del eje Y de un sensograma. La señal de línea basal es tomada con el solvente solo (p.e., PBS) pasando por el chip. La diferencia neta entre la señal de línea basal y la señal después de la terminación de inyección del polipéptido de anticuerpo representa el valor de enlace de una muestra dada. Para determinar las constantes de velocidad (K_{off}), sobre velocidad (K_{on}) y velocidad de disociación (K_d), se usa el software de evaluación cinética BIAcore (p.e., versión 2.1).

Así, se puede usar SPR para monitorear el antagonismo del enlace de CD40L a CD40 por medio de una preparación de anticuerpo anti-CD40L monovalente midiendo el desplazamiento o inhibición del enlace de CD40L a CD40 causado por la preparación de anticuerpo monovalente. También se puede usar SPR para monitorear la dimerización, o preferiblemente, la falta de dimerización, que ocurre por medio de la región Fc en las preparaciones de anticuerpo descritas aquí.

La alta afinidad es dependiente de la complementariedad entre una superficie del antígeno y las CDRs del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La complementariedad se determina mediante el tipo e intensidad de las interacciones moleculares posibles entre porciones del objetivo y la CDR, por ejemplo, las interacciones iónicas potenciales, atracciones de van der Waals, enlace de hidrógeno u otras interacciones que pueden ocurrir. La CDR3 tiende a contribuir más a las interacciones de enlace de antígeno que las CDRs 1 y 2, probablemente debido a su tamaño generalmente mayor, que provee más oportunidad de interacciones de superficie favorables. (Ver, p.e., Padlan et al., 1994, Mol. Immunol. 31: 169-217; Chothia & Lesk, 1987, J. MoL Biol. 196: 904-917; y Chothia et al., 1985, J. MoL Biol. 186: 651-663). Alta afinidad indica emparejamientos polipéptido de anticuerpo/antígeno que tienen alto grado de complementariedad, que está directamente relacionado con las estructuras del dominio variable y el objetivo.

En un aspecto, un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente, p.e., un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo, está enlazado a otro polipéptido de anticuerpo para formar un heterodímero en el cual cada polipéptido de anticuerpo individual es capaz de enlazar un antígeno cognato diferente. La fusión de polipéptidos de anticuerpo, tales como dominios variables de inmunoglobulina sencillos, como heterodímeros, en donde cada monómero enlaza un antígeno objetivo diferente, puede producir un ligando específico dual capaz, por ejemplo, de puentear los antígenos objetivo respectivos. Tales ligandos específico duales se pueden usar para marcar citocinas y otras moléculas que cooperan sinergísticamente en situaciones terapúticas en el cuerpo de un organismo. Así, se provee un método para hacer sinergia entre la actividad de dos o más citocinas, que comprende administrar

un heterodímero de anticuerpo específico dual capaz de enlazar a las dos o más citocinas.

Ejemplos no limitantes de segundos objetivos para polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L duales específicos incluyen los siguientes: TNF-α; IL-1; IL-2; IL-4; IL-6; IL-8; IL-12; IL-18; IFN-γ; CD2; CD4; CD8; CTLA4; LFA1; LFA3, VLA4, CD80, B7-1, CD28, CD86, B7-2, y CTLA-4. En particular, segundos objetivos útiles de acuerdo con la invención incluyen CD80, B7-1, CD28, CD86, B7-2, y CTLA-4. Se piensa que estos objetivos están involucrados en una ruta co-estimuladora crítica para la activación de célula T (llamados, antígenos de ruta de señal co-estimuladora). Esta ruta incluye la activación de la molécula CD28 en la superficie de células T. Esta molécula puede recibir una señal coestimuladora liberada por un ligando en las células B u otros APCs. Los ligandos para CD28 incluyen miembros de la familia B7 de antígenos de antivación de linfocito B, tales como B7-1 y/o B7-2 (Freedman, A. S. et al. (1987) J. Immunol. 137, 3260-3267; Freeman, G. J. et al. (1989) J. Immunol. 143, 2714-2722; Freeman, G. J. et al. (1991) J. Exp. Med. 174, 625-631; Freeman, G. J. et al. (1993) Science 262, 909-911; Azuma, M. et al. (1993) Nature 366, 76-79; Freeman, G. J. et al (1993) J. Exp. Med. 178, 2185-2192). B7-1 y B7-2 también son ligandos para otra molécula, CTLA4, presente en la superficie de celulas T activadas. En consecuencia, la presente invention contempla que miembros de la ruta de señalización de CD28 pueden ser segundos objetivos útiles para polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L de formato específico dual.

Secuencias Homólogas:

La invención abarca polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L, p.e., clones de dominio variable de inmunoglobulina sencillo que se enlazan a CD40L, y clones con similitud de secuencia sustancial u homología a ellos que también marcan antígeno con alta afinidad. Como se usa aquí, similitud de secuencia "sustancial" u homología es al menos 85% de similitud u homología.

Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" entre dos secuencias (los términos son equivalentes y aquí se usan intercambiablemente) se realizan de la siguiente forma. Las secuencias son

alineadas para propósitos de comparación óptima (p.e., se pueden introducir espacios en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de amino ácido o ácido nucleico para alineación óptima, y las secuencias no homólogas pueden ser descartadas para propósitos de comparación). En una realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para propósitos de comparación es al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 60%, e incluso más preferiblemente al menos 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Los residuos de amino ácido o nucleótidos en posiciones correspondientes de posiciones de amino ácido o nucleótido son entonces comparadas. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de amino ácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa aquí "homología" de amino ácido o ácido nucleico es equivalente a "identidad" de amino ácido o ácido nucleico). La identidad porcentual entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesitan ser introducidos para alineación óptima de las dos secuencias.

Como se usa aquí, "similitud" de secuencia es una medida del grado al cual dos secuencias de amino ácido comparten residuos de amino ácido similares en posiciones correspondientes en una alineación de las secuencias. Los amino ácidos son similares entre sí cuando sus cadenas laterales son similares Específicamente, "similitud" abarca amino ácidos que son sustitutos conservativos entre si. Una sustitución "conservativa" es cualquier sustitución que tiene un puntaje positivo en la matriz de sustitución blosum62 (Hentikoff y Hentikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919). Por la afirmación "la secuencia A is n% similar a la secuencia B" se entiende que n% de las posiciones de una alineación global óptima entre las secuencias A y B consiste de amino ácidos idénticos o sustituciones conservativas. Las alineaciones globales óptimas se pueden realizar usando los siguientes parámetros en el elgoritmno de alineación de Needleman-Wunsch:

Para polipéptidos:

Matriz de sustitución: blosum62.

Función de puntaje de espacio: -A -B*LG, en donde A = 11 (la sanción de espacio), B = 1 (la sanción de longitud de espacio) y LG es la longitud del espacio.

Para secuencias de nucleotido:

Matriz de sustitución: 10 para coincidencias, 0 para no coincidencias.

Función de puntaje de espacio: -A -B*LG, en donde A = 50 (la sanción de espacio), B = 3 (la sanción de longitud de espacio) y LG es la longitud del espacio.

Las sustituciones conservativas típicas están entre Met, Val, Leu y Ile; entre Ser y Thr; entre los residuos Asp, Glu y Asn; entre los residuos Gln, Lys y Arg; o los residuos aromáticos Phe y Tyr. Para calcular el grado (más usualmente como porcentaje) de similitud entre dos secuencias de polipéptido, se considera el número de posiciones en las cuales se observa identidad o similitud entre residuos de amino ácido correspondientes en las dos secuencias de polipéptido con relación a las longitudes totales de las dos moléculas que son comparadas.

Alternativamente, el algoritmo de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica) se emplea para la alineación de secuencia, con parámetros ajustados a valores por defecto. El algoritmo de BLAST "Secuencias BLAST 2" está disponible en el sitio de la red mundial internet ("www") del National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para Información de Biotecnología) (".ncbi"), de la National Library of Medicine (Biblioteca Nacional de Medicina) (".nlm") de the National Institutes of Health (los Institutos Nacionales de Salud) ("nih") del gobierno de los Estados Unidos (".gov"), en el directorio "/blast/", sub-directorios "bl2seq/bl2.html". Este algoritmo alinea dos secuencias para comparación y está descrito por Tatusova & Madden, 1999, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250.

Una medida adicional de homología o similitud es la habilidad de hibridar bajo condiciones de hibridación altamente severas. Así, una primera secuencia que codifica un polipéptido de dominio variable de inmunoglobulina sencillo es sustancialmente similar a una secuencia de codificación, si la primera secuencia herida a la segunda secuencia (o su complemento) bajo condiciones

de hibridación altamente severas (tal como las descritas por Sambrook et al., Molecular Cloning, Laboratory Manuel, Cold Spring, Harbor Laboratory press, New York). "Condiciones de hibridación altamente severas" se refieren a hibridación en SSC 6X a aproxmadamente 45 °C, seguida por uno o más lavados en SSC 0.2X, 0.1% de SDS a 65 °C. "Condiciones de hibridación muy altamente severas" se refieren a hibridación en fosfato sódico 0.5M, 7% de SDS a 65 °C, seguido de uno o más lavados a SSC 0.2X, 1% de SDS 65 °C.

Ensayos para Actividades de CD40L:

Se prefiere que un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente como se describe aquí enlace a CD40L aunque no agonice sustancialmente la señalización de CD40. La activación de la ruta CD40L/CD40 manifiesta un número de resultados diferentes que se pueden medir con el fin de evaluar el efecto de un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente dado sobre la actividad de la ruta. Sin embargo, para la evaluación de la actividad antagonista o agonista de los polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L monovalentes descritos aquí, se puede usar al menos uno de los siguientes ensayos de CD40L:

1. Activación de la Quinasa Jun-N-Terminal (JNK):

La estimulación de los linfocitos T mediante CD40L induce la activación fuerte de JNK. La habilidad de un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente para activar esta ruta de señalización se mide de la siguiente forma. Células Jurkat leucémicas humanas son estimuladas con un agonistic anticuerpo anti-CD40L agonístico de control positivo (2 µg/ml de anticuerpo gp39/CD40L anti-humano o anti-ratón monoclonal (Pharmingen, San Diego, CA, USA) o inmunoglobulinas de hámster o ratón coincidentes de isotipo (Dianova, Hamburg, Alemania)), polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente, o un anticuerpo irrelevante de control negativo como se describe en Brenner et al., 1997, FEBS Lett. 417: 301- 306, que está incorporado aquí mediante referencia. Las células son lisadas y el extracto es ensayado para JNK fosforilado mediante ensayo colorimétrico (p.e., kit de inmunoensayo colorimétrico (EIA) fosfo-JNK1/2 Titerzima™, de Assay Designs Inc., Catálogo # 900-106). Un aumento en fosfo-JNK (p.e., del 5% o más) para las células

estimuladas con anti-CD40L sobre células no estimuladas indica agonismo de la actividad de CD40L por el polipéptido de anticuerpo.

2. Inducción de la Secreción de Citocina:

Se ha mostrado que la co-estimulación de células T con Ab anti-CD3 y CD40L regula escendentemente la producción de IL-10, IFN-γ y TNF-α por aquellas células. La habilidad de un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente para activar esta ruta de señalización se mide de la siguiente forma. Células T Jurkat leucémicas humanas (o células CD4+ T recién aisladas) son colocadas en placas de 96 pozos que contienen anticuerpo anti-CD3 inmovilizado. Las células son entonces cultivadas por 72 horas en la presencia de un anticuerpo anti-CD40L agonístico de control positivo, CD40L, polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente, o un anticuerpo irrelevante de control negativo, como se describe en Blair et al., 2000, J. Exp. Med. 191: 651-660. La IFN-γ (o IL-10 o TNF-α) es entonces cuantificada en el sobrenadante mediante una ELISA emparedada usando un estándar de IFN-g para generar una curva estándar desde la cual se pueden calcular otros desconocidos. Un aumento en la IFN-g (p.e., en 5% o más) para células estimuladas con anti-CD40L sobre células no estimuladas indica agonismo por el polipéptido de anticuerpo.

3. Ensayo de Agregación de plaquetas:

Los anticuerpos anti-CD40L divalentes tienden a causar la agregación de plaquetas, que está probablemente asociada con los eventos tromboembólicos observados en pruebas clínicas de anticuerpos anti-CD40L divalentes de la técnica previa. Los polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L monovalentes como se describen aquí, preferiblemente no median o agonizan la agregación de plaquetas mediada por CD40L. Con respecto a este aspecto, el "ensayo de agregación de plaquetas estándar" es el siguiente:

Se preparan plaquetas a $2.5x10^5$/ml y se dejan en agitación en un lumi-agregómetro de 500-Ca (o su equivalente, p.e., un Perfilador de Agregación de Plaquetas (BioData, Horsham, PA)). Las plaquetas son parcialmente activadas mediante la adición de una serie de diluciones de 0.1-10 μM de ADP (el ADP

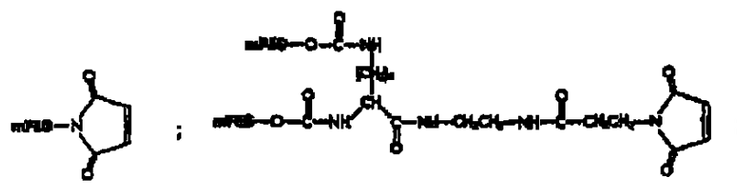
10μM induce la agregación, y se usa como un control positivo – concentraciones menores activan plaquetas pero no inducen agregación). La agregación de plaquetas mediada por CD40L es estimulada mediante la adición de cualquiera de anticuerpos anti-CD40L monoclonales (p.e., anticuerpos monoclonales divalentes, disponibles en, p.e., Pharmingen, San Diego, CA, USA) o proteína de fusión CD40/Fc soluble (disponible en R&D Systems). La reacción se deja proceder entre 3 y 5 minutos. La estimulación de agregación de plaquetas anterior que alcanzó la mínima agregación/activación con ADP solo es graficada contra la concentración estimulante de anti-CD40L o CD40/Fc. El porcentaje de agregación de plaquetas se mide por el cambio en transmitancia de luz siguiendo la adición del polipéptido de anticuerpo que es probado o el péptido de control positivo. Un valor mayor que el observado para control negativo que carece de anticuerpo y que equivale a 25% o más del valor de control positivo (anti-CD40L divalente o fusión de CD40/Fc) se considera indicativo de inducción de agregación de plaquetas.

Otros métodos para evaluar la agregación y/o activación de plaquetas, incluyendo eventos que preceden la agregación, o que están descendentemente de la agregación de plaquetas, incluyen ensayos que determinan varios indicadores de la activación de plaqueta, y son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la activación de plaqueta (y, por ende, la actividad de CD40/CD40L) se puede determinar ensayando para la expresión de CD62P en plaquetas (p.e., usando anticuerpos anti-CD26P y citometría de flujo), ensayando para la formación del conjugado monocito-plaqueta, ensayando para el tiempo de cierre de plaquetas bajo condiciones de alto corte (p.e., usando un PFA-100, Dade Behring, Newark, DE), y ensayando para la liberación de gránulo denso de plaqueta. Los métodos para realizar tales ensayos son conocidos en la técnica y se pueden encontras, por ejemplo, en Langer et al., 2005 Thromb. Haemost 93: 1137-46.

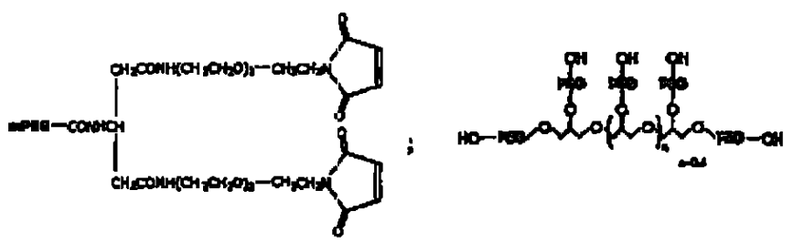
<u>PEGilación de polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L monovalentes</u>

La presente invención provee polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L monovalentes PEGilados que tienen vida media aumentada, y preferiblemente también resistencia a la degradación sin una pérdida de la actividad (p.e., afinidad de enlace) con relación a polipéptidos de anticuerpo no PEGilados.

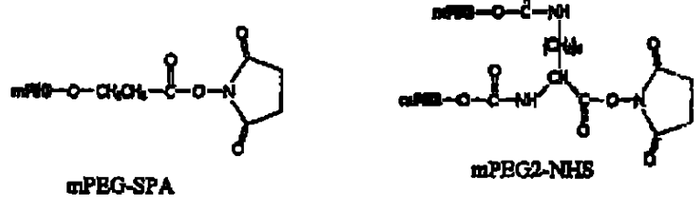
Los polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L monovalentes de acuerdo con este aspecto pueden ser acoplados, usando métodos conocidos en la técnica, a moléculas de polímero (preferiblemente PEG) útiles para alcanzar vida media aumentada y propiedades de resistencia a la degradación abarcadas por la presente invención. Las mitades de polímero que se pueden utilizar en la invención pueden ser sintéticas o se encuentran naturalmente e incluyen, pero no se limitan a, polímeros de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena recta o ramificada, o un polisacárido ramificado o no ramificado tal como homo- o heteropolisacárido. Ejemplos preferidos de polímeros sintéticos que se pueden usar en la invención incluyen poli(etilen glicol) de cadena recta o ramificada (PEG), poli(propilen glicol), o poli(vinil alcohol)y derivados o formas sustituidas de los mismos. Polímeros sustituidos particularmente preferidos útiles en la invención incluyen PEG sustituido, incluyendo metoxi(polietilen glicol). Mitades que se encuentran naturalmente polímero que se pueden usar de acuerdo con la invención además de, o en lugar de PEG incluyen lactosa, amilosa, dextrano, o glicógeno, así como derivados de los mismos que serían reconocidos por el experto en la técnica. Las formas derivatizadas de moléculas de polímero de la invención incluyen, por ejemplo, derivados que tienen mitades o grupos reactivos adicionales presentes allí que permiten la interacción con residuos de amino ácido de los polipéptidos dAb descritos aquí. Tales derivados incluyen ésteres activos de N-hidroxilsuccinimida (NHS), polímeros de succinimidil propionato, y agentes reactivos selectivos a sulfhidrilo tales como maleimida, vinil sulfona, y tiol. Polímeros derivatizados particularmente preferidos incluyen, pero no se limitan a polímeros de PEG que tienen las formulaa: PEG-O-$CH_2CH_2CH_2$-CO_2-NHS; PEG-O-CH_2-NHS; PEG-O-CH_2CH_2-CO_2-NHS; PEG-S-CH_2CH_2-CO-NHS; PEG-O_2CNH-CH(R)-CO_2-NHS; PEG-NHCO-CH_2CH_2-CO-NHS; y PEG-O-CH_2-CO_2-NHS; en donde R es $(CH_2)_4$)$NHCO_2$(mPEG). Los polímeros de PEG útiles en la invención pueden ser moléculas lineales, o pueden ser ramificadas, en donde múltiples mitades de PEG están presentes en un solo polímero. Algunos derivados de PEG particularmente preferidos, que son útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a los siguientes:



mPEG-MAL ; mPEG2-MAL ;

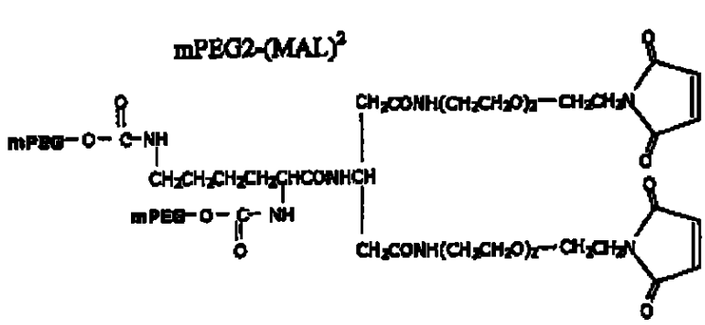


mPEG-(MAL)$_2$; PEG de brazos múltiples



mPEG-SPA ; mPEG2-NHS ;

mPEG2-(MAL)$_2$



;y

El grupo reactivo (p.e., MAL, NHS, SPA, VS, o Tiol) puede estar unido directamente al polímero de PEG o puede estar unido al PEG mediante una molécula enlazante.

El tamaño de los polímeros útiles en la invención puede estar en el rango de 500 Da a 60 kDa, por ejemplo, entre 1000 Da y 60 kDa, 10 kDa y 60 kDa, 20 kDa y 60 kDa, 30 kDa y 60 kDa, 40 kDa y 60 kDa, y hasta entre 50 kDa y 60 kDa. Los polímeros usados en la invención, particularmente PEG, pueden ser polímeros de cadena recta o pueden poseer una conformación ramificada. Dependiendo de la combinación de peso molecular y combinación, las moléculas de polímero útiles en la invención, cuando están unidas a un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente, producirán una molécula que tiene un tamaño hidrodinámico promedio entre 24 y 500 kDa. El tamaño hidrodinámico de una molécula de polímero usada aquí se refiere al tamaño aparente de una molécula (p.e., una molécula de proteína) con base en la difusión de la molécula a través de una solución acuosa. La difusión, o moción de una proteína a través de la solución puede ser procesada para derivar un tamaño aparente de la proteína, en donde el tamaño está dado por el radio de Stokes o radio hidrodinámico de la partícula de proteína. El "tamaño hidrodinámico" de una proteína depende de la masa y de la forma (conformación), de forma que dos proteínas que tienen la mimas masa molecular pueden tener tamaños hidrodinámicos diferentes con base en la conformación global de la proteína. El tamaño hidrodinámico de un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente enlazado a PEG, p.e., un dominio variable de inmunoglobulina sencillo anti-CD40L como se describe aquí, puede estar en el rango de 24 kDa a 500 kDa; 30 a 500 kDa; 40 a 500 kDa; 50 a 500 kDa; 100 a 500 kDa; 150 a 500 kDa; 200 a 500 kDa; 250 a 500 kDa; 300 a 500 kDa; 350 a 500 kDa; 400 a 500 kDa y 450 a 500 kDa. Preferiblemente, el tamaño hidrodinámico de un polipéptido de anticuerpo PEGilado como se describe aquí es de 30 a 40 kDa; 70 a 80 kDa o 200 a 300 kDa. El tamaño de una molécula de polímero unida a un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente puede entonces ser variado dependiendo de la aplicación deseada. Por ejemplo, cuando un polipéptido de anticuerpo PEGilado está destinado para dejar la circulación y entrar en tejidos periféricos, es deseable que mantenga bajo el tamaño del polímero unido para facilitar la extravasación del torrente sanguíneo. Alternativamente, cuando se desea que el polipéptido de anticuerpo PEGilado permanezca en la circulación por un mayor período de tiempo, se puede usar un polímero de mayor peso molecular (p.e., un polímero de 30 a 60 kDa).

Las moléculas de polímero (PEG) útiles en la invención pueden ser unidas a los polipéptidos de anticuerpo usando métodos que son bien conocidos en la técnica. El primer paso en la unión del PEG u otras mitades de polímero a un polipéptido de anticuerpo es la sustitución de los grupos finales hidroxilo del polímero de PEG mediante grupos funcionales que contienen eelectrófilo. Particularmente, los polímeros de PEG están unidos a residuos de cisteína o lisina presentes en el polipéptido de anticuerpo. Los residuos de cisteína y lisina se pueden encontrar naturalmente, o pueden ser diseñados en la molécula de polipéptido de anticuerpo. Por ejemplo, los residuos de cisteína pueden ser diseñados recombinantemente en el C terminal de los polipéptidos de anticuerpo, o residuos en ubicaciones accesibles de solvente específicas en el polipéptido de anticuerpo pueden ser sustituidos con cisteína o lisina. En una realización preferida, una mitad de PEG está unida a un residuo de cisteína que está presente en la región bisagra en el C terminal de un polipéptido de anticuerpo.

En una realización preferida adicional, una mitad de PEG u otro polímero está unida a un residuo de cisteína o lisina que se encuentra naturalmente en, o diseñado en el N terminal del polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo de la invención. En aún una realización adicional, una mitad de PEG u otro polímero está undido a un dominio variable sencillo de anticuerpo de acuerdo con la invención en un residuo de cisteína o lisina (ya sea que se encuentra naturalmente o diseñado) que está al menos 2 residuos lejos (p.e., interno a) los C y/o N terminales de polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo.

En una realización, el(los) polímero(s) de PEG está(n) unido(s) a uno o más residuos de cisteína o lisina presentes en una región de marco (FWs) y una o más CDRs heterólogas de un dominio variable de inmunoglobulina sencillo. Las CDRs y las regiones de marco (p.e., CDR1-CDR3 y FW1-FW4) son auqellas regiones de un dominio variable de inmunoglobulina definidas en la base de datos Kabat de Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico (Kabat et al., 1991, supra). En una realización preferida, un polímero de PEG está enlazado a un residuo de cisteína o lisina en el segmento DP47 del marco V_H, o el segmento DPK49 del marco V_k. Los residuos de cisteína y/o lisina de

DP47 que pueden ser enlazados a PEG de acuerdo con la invención incluyen la cisteína en las posiciones 22, o 96 y la lisina en las posiciones 43, 65, 76, o 98 de SEQ ID NO: 1 (Figura 5). Los residuos de cisteína y/o lisina de DPK9 que pueden ser enlazados a PEG de acuerdo con la invención incluyen los residuos de cisteína en las posiciones 23, u 88 y los residuos de lisina en las posiciones 39, 42, 45, 103, o 107 de SEQ ID NO: 3 (Figura 6). Adicionalmente, residuos de cisteína o lisina específicos pueden ser enlazados a PEG en la región de marco canónica V_H DP38, o DP45.

Adicionalmente, los sitios específicos accesibles a solvente en la molécula de anticuerpo que no son residuos de cisteína o lisina que se encuentran naturalmente pueden ser mutados a una cistaína o lisina para la unión de un polímero de PEG. Los residuos accesibles a solvente en cualquier anticuerpo dado, p.e., un dAb, se pueden determinar usando métodos conocidos en la técnica, tales como análisis de la estructura de cristal del polipéptido de anticuerpo. Por ejemplo, usando la estructura de cristal disuelto del dAb HEL4 V_H (SEQ ID NO: 3; un dAb que enlaza la isoenzima de huevo de gallina), se ha identificado que los residuos Gln-13, Pro- 14, Gly- 15, Pro-41, Gly-42, Lys-43, Asp-62, Lys-65, Arg-87, Ala-88, Glu-89, Gln-112, Leu-115, Thr-117, Ser-119, y Ser-120 son accesibles a solvente, y de acuerdo con la presente invención, serían candidatos atractivos para mutación a residuos de cisteína o lisina para la unión de un polímero de PEG. En adición, usando la estructura de cristal disuelto de el dAB simulado V_k (SEQ ID NO: 4), se ha identificado que los residuos Val-15, Pro-40, Gly-41, Ser-56, Gly-57, Ser-60, Pro-80, Glu-81, Gln- 100, Lys-107, y Arg-108 son accesibles a solvente, y de acuerdo con la presente invención, serían candidatos atractivos para mutación a residuos de cisteína o lisina para la unión de un polímero de PEG. En una realización de la invención, un polímero de PEG está enlazado a múltiples residuos de cisteína o lisina accesibles a solvente, o a residuos accesibles a solvente que han sido mutados a un residuo de cisteína o lisina. Alternativamente, solamente el residuo accesible a solvente es enlazado al PEG, ya sea cuando el polipéptido de anticuerpo particular solamente posee una cisteína o lisina accesible a solvente (o residuo modificao a una cisteína o lisina) o cuand un residuo accesible a solvente particular se selecciona entre varios de tales residuos para PEGilación.

Secuencia de Amino Ácido Primaria de HEL4 (SEQ ID NO: 5).

1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFRIS DEDMGWVRQA PGKGLEWVSS

51 YGPSGSTYY ADSVKGRPTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCASAL

101 EPLSEPLGFW GQGTLVTVSS

Secuencia de Amino Ácido Primaria de V_κ simulada (SEQ ID NO: 6).

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SYLNWYQQKP GKAPKLLI

51 ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SYSTPNTFGQ

101 GTKVEIKR

Varios esquemas de unión a PEG que son útiles en la invención son porporcionados por la compañía Nektar (SanCarlos, CA). Por ejemplo, cuando se desea la unión de PEG u otro polímero a un residuo de lisina, se pueden usar ésteres activos de polímeros de PEG que han sido derivatizados con N-hidroxilsuccinimida, tales como succinimidil propionato. Cuando se pretende la unión a un residuo de cisteína, se pueden usar los polímeros de PEG que han sido derivatizados con reactivos selectivos a sulfhidrilo tales como maleimida, vinil sulfona, o tioles. Otros ejemplos de realizaciones específicas de derivados de PEG que se pueden usar de acuerdo con la invención para generar anticuerpos PEGilados se pueden encontrar en el catálogo Nektar (disponible en la red en nektar.com). En adición, se pueden usar formas derivatizadas de PEG de acuerdo con la invención para facilitar la unión del polímero de PEG a un polipéptido de anticuerpo. Los derivados de PEG útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a PEG-succinimidil succinato, PEG unido a uretano, PEG fenilcarbonato, PEG succinimidil carbonato, PEG-carboximetil azida, anhídrido PEG dimetilmaléico, revivados de PEG ditiocarbonato, PEG-

tresilatos (2,2,2- trifluoroetanosulfonatos), imidoésteres de mPEG, y otros como se describen en Zalipsky y Lee, (1992) ("Use of functionalized poly(ethylene glycol)s for modification of peptides" in PolvfEthylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. Milton Harris, Ed., Plenum Press, NY).

En una realización, la invención provee una composición de dominio variable sencillo de anticuerpo anti-CD40L que comprende un dominio variable sencillo de anticuerpo y polímero de PEG, en donde la relación de polímero de PEG a dominio variable de anticuerpo es una relación molar de al menos 0.25:1 En una realización adicional, la relación molar del polímero de PEG a dominio variable de anticuerpo es 0.33:1 o mayor. En aún una realización adicional, la relación molar de polímero de PEG a dominio variable sencillo de anticuerpo es 0.5:1 o mayor.

Ligandos Específicos Duales

La invención también provee ligandos específicos duales que comprenden dominios variables sencillos de inmunoglobulina que tienen cada uno especificidades diferentes; esto es, los primero y segundo epítopos enlazados mediante el ligando específico dual son preferiblemente diferentes. Como se usa aquí, un "ligando específico dual" se refiere a un ligando que comprende un primer dominio variable sencillo de inmunoglobulina y un segundo dominio variable de inmunoglobulina como se define aquí, en donde las regiones variables son capaces de enlazarse a dos antígenos diferentes o dos epítopos en el mismo antígeno que no están normalmente enlazados por una inmunoglobulina monoespecífica. Por ejemplo, los dos epítopos pueden estar en el mismo hapteno, pero no son el mismo epítopo o están suficientemente adyacentes para estar enlazados por enligando monoespecífico. Los ligandos específicos duales de acuerdo con la invención están compuestos de dominios variables que tienen especificidades diferentes, y no contienen pares de dominio variable mutuamente complementarios que tienen la misma especificidad. Los ligandos específicos duales pueden ser, o ser parte de, polipéptidos, proteínas o ácidos nucleicos, que se pueden encontrar naturalmente o ser sintéticos. Con respecto a esto, el ligando de la invención puede enlazar un epítopo o antígeno y actuar como un antagonista o

agonista (p.e. agonista del receptor EPO). Los dominios de enlace a epítopo del ligando, en una realización, tienen la misma especificidad de epítopo, y pueden por ejemplo enlazar simultáneamente su epítopo cuando múltiples copias del epítopo están presentes en el mismo antígeno. En otra realización, estos epítopos se proveen en diferentes antígenos de forma que el ligando puede enlazar los epítopos y puentear los antígenos. El experto en la técnica apreciará que la elección de epítopos y antígenos es grande y variada. Ellos pueden ser por ejemplo, proteínas humanas o animales, citocinas, receptores de citocina, co-factores de enzimas para enzimas o proteínas de enlace a ADN. Citocinas y factores de crecimiento adecuados incluyen pero no se limitan a: ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, EGF, receptor de EGF, ENA-78, Eotaxina, Eotaxina-2, Exodus-2, EpoR, FGF-ácido, FGF-básico, factor-10 de crecimiento de fibroblasto, ligando FLT3, Fractalquina (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF-β1, insulina, IFN-γ, IGF-I, IGF-II, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL- 8 (72 a.a.), IL-8 (77 a.a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inhibina α, Inhibina β, IP-10, factor-2 de crecimiento de queratinocito (KGF-2), KGF, Leptina, LIF, Linfotactina, sustancia inhibidora mulleriana, factor inhibidor de colonia de monocito, proteína actractora de monocito, M-CSF, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 a a), MDC (69 a.a.), MIG, MIP-1α, MIP-1β, MIP-3α, MIP-3β, MIP-4, factor-1 de inhibición del progenitor mieloide (MPIF-1), NAP-2, Neurturina, factor de crecimiento nervioso, β-NGF, NT-3, NT-4, Oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1α, SDF1β, SCF, SCGF, factor de mastocito (SCF), TARC, TGF-α, TGF-β, TGF-β2, TGF-β3, factor de necrosis de tumor (TNF), TNF-α, TNF-β, receptor I de TNF, receptor II de TNF, TNIL-1, TPO, VEGF, receptor 1 del VEGF, receptor 2 del VEGF, receptor 3 del VEGF, GCP-2, GRO/MGSA, GRO-β, GRO-γ, HCCI, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3, HER 4, sitio de reconocimiento de TACE, TNF BP-I y TNF BP-II, así como cualquier objetivo revelado en el Anexo 2 o Anexo 3 de la presente, ya sea en combinación como se indicó en los Anexos, en una combinación diferente o individualmente. Los receptores de citocina incluyen receptores para las citocinas anteriores, p.e. IL-1 R1; IL-6R; IL-10R; IL- 18R, así como receptores para las citocinas indicadas en el Anexo 2 o Anexo 3, y también receptores revelados en el Anexo 2 y 3. Se apreciará que esta lista no es de ninguna forma exhaustiva. Cuando el ligando multiespecífico enlaza a dos epítopos

(sobre los mismos antígenos o diferentes), el(los) antígen(os) pueden ser seleccionados de esta lista.

En una realización de la segunda configuración de la invención, los dominios variables son derivados de un anticuerpo dirigido contra el primer y/o segundo antígeno o epítopo. En una realización preferida, los dominios variables se derivan de un repertorio de dominios de anticuerpo variables sencillos. En un ejemplo, el repertorio es un repertorio que no está creado en un repertorio animal o sintético En otro ejemplo, los dominios variables sencillos no están aislados (al menos en parte) por inmunización animal Así, los dominios sencillos pueden ser aislados de una biblioteca inocua.

En otro aspecto, la invención provee un ligando multi-específico que comprende un primer epítopo que enlaza un dominio que tiene una primera especificidad de enlace a epítopo y un segundo epítopo de no complementareidad que enlaza un dominio que tiene una segunda especificidad de enlace a epítopo. Las primera y segunda especificidades de enlace pueden ser las mismas o diferentes.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un ligando multi-espec´cifico de conformación cerrada que comprende un primer dominio de enlace a epítopo que tiene una primera especificidad de enlace a epítopo y un segundo epítopo de no complementariedad, que enlaza un dominio que tiene una segunda especificidad de enlace a epítopo, en donde las primera y segunda especificidades de enlace son capaces de competir para el enlace a epítopo de forma que el ligando multi-específico de conformación cerrada no puede enlazar ambos epítopos simultáneamente.

En aún un aspecto adicional, la invención provee ligandos de conformación abierta que comprenden dominios de enlace de no complementariedad, en donde los dominios son específicos para un epítopo diferente del mismo objetivo. Tales ligandos se enlazan a objetivos con avidez aumentada. Igualmente, la invención provee ligandos multivalentes que comprenden dominios de enlace de no complementariedad específicos para el mismo epítopo y dirigidos a objetivos que comprenden copias múltiples de dicho epítopo.

En un aspecto similar, los ligandos de acuerdo con la invención pueden ser configurados para enlazar epítopos individuales con baja afinidad, de forma que el enlace a epítopos individuales no es terapéuticamente significativo; pero la avidez aumentada resultante de enlazar a dos epítopos provee un beneficio terapéutico. En un ejemplo particular, los epítopos pueden ser marcados, para estár presentes individualmente sobre tipos de células normales, pero presentes juntos solamente en células anormales o enfermas, tales como células de tumor. En tal situación, solamente las células anormales o enfermas son efectivamente marcadas mediante ligandos biespecíficos de acuerdo con la invención.

Los ligandos específicos para múltiples copias del mismo epítopo, o adjacent epítopos, en el mismo objetivo (conocidos como dAbs quelantes) pueden también ser ligandos triméricos o poliméricos (tertraméricos o más) que comprenden tres, cuatro o más dominios de enlace de mo complementariedad. Por ejemplo, se pueden construir ligandos que comprenden tres o cuatro dominios V_H o dominios V_L.

Más aún, se proveen ligandos que enlazan a obtejivos de multi-subunidad, en donde cada dominio de enlace es específico para una sunbunidad de dicho objetivo. El ligando puede ser dimérico, trimérico o polimérico.

La invención también incluye un ligando específico dual que comprende un primer dominio variable sencillo de inmunoglobulina que tiene una especificidad de enlace a un primer antígeno y un segundo dominio variable sencillo que tiene una actividad de enlace a un segundo antígeno, en donde el primer antígeno es CD40L y el segundo dominio variable sencillo es un Antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno o un antígeno de superficie de célula T. El antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno (APC) puede ser seleccionado de uno del grupo que consiste de antígenos de superficie de célula dendrítica, antígenos de superficie de macrófago, antígenos de superficie de célula B activada, antígenos de superficie de la ruta de señalización co-estimuladora, y MHC, tal como MHC II alfa o beta.

El antígeno de superficie (APC) puede ser seleccionado del grupo que consiste de CD28, molécula coestimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, ligando de molécula coestimuladora inducible (ICOSL), OX40L, CD80, CD86, HVEM (Mediador de la Entrada del Virus Herpes), y LIGHT, pero es preferiblemente uno de CD28, molécula coestimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, o CD3.

El antígeno de superficie es preferiblemente un antígeno de superficie del gen B7 tal como B7-2 o B7-1.

Los antígenos de superficie de células dentríticas son conocidos en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a ICAM-1, ICAM-2, LFA-1, LFA-3, DEC205, Clase I MHC, Clase II MHC, B7-1, y B7-2. Antígenos de superficie de macrófago activado incluyen, pero no se limitan a, receptor de TNF, CD40, Clase I y II MHC, y moléculas B7. Los antígenos de superficie de célula B activada son conocidos en la técnica (p.e., incluyendo pero sin limitarse a CD20 y CD86) y se describieron mejor anteriormente (ver, por ejemplo, Janeway et al.} 1999, Immunobiology, Garland Publishing NY, NY).

Preferiblemente, los ligandos multi-específicos de acuerdo con los aspectos anteriores de la invención se pueden obtener mediante el que comprende los pasos de.

a) seleccionar un primer dominio de enlace a epítopo por su habilidad para enlazarse a un primero epítopo,

b) seleccionar un segundo dominio de enlace a epítopo por su habilidad para enlzarse a un segundo epítopo,

c) combinar los dominios de enlace a epítopo; y

d) seleccionar el ligando multiespecífico de conformación cerrada por su habilidad de enlazarse a dicho primer segundo epítopo y dicho segundo epítopo.

Convenientemente, el primer dominio de enlace a epítopo y los segundos dominios de enlace a epítopo son dominios variables de inmunoglobulina de no complementariedad, como se definen aquí. Esto es, cualquier dominio variable V_H-V_H o V_L-V_L.

Los dAbs quelantes en particular, se pueden preparar de acuerdo con un aspecto preferido de la invención, a saber, el uso de dAbs de anclaje, en los cuales se construye una biblioteca de dAbs diméricos, triméricos o multiméricos usando un vector que comprende un dAb constante ascendentemente o descendentemente de una secuencia enlazante, con un repertorio de un segundo, tercero o dAbs adicionales que son insertados en el otro lado del enlazante. En metodologías alternativas, el uso de enlazantes puede evitarse, por ejemplo mediante el uso de enlace no covalente o afinidad natural entre los dominios de enlace tales como V_H y V_k. En consecuencia, la invención provee un método para preparar un ligando multimérico que comprende los pasos de:

(a) proveer un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de enlace específico para un primer epítopo en un objetivo;

(b) proveer un vector que codifica un repertorio que comprende segundos dominios de enlace específicos para un segundo epítopo en dicho objetivo, cuyo epítopo puede ser el mismo o diferente del primer epítopo, dicho segundo epítopo está adyacente a dicho primer epítopo; y

(c) expresar dicho primer y segundo dominos de enlace; y

(d) aislar aquellas combinaciones de primer y segundo dominios de enlace que se combinan para producie un dímero de enlace a objetivo.

Los primer y segundo epítopos son adyacentes de forma que un ligando multimérico es capaz de enlazar a ambos epítopos simultáneamente. Esto provee al ligando con las ventajas de avidez aumentada en caso de enlace. Cuando los epítopos son los mismos, la avidez aumentada se obtiene por la presencia de copias múltiples del epítopo en el objetivo, permitiendo que al

menos dos copias estén enlazadas simultáneamente con el fin de obtener el efecto de avidez aumentada.

En una realización alternativa del aspecto anterior de la segunda configuración de la invención, al menos un dominio de enlace a epítopo comprende un "andamio de proteína" o 'esqueleto de proteína" diferente a inmunoglobulina como se define aquí. Andamios de proteínas diferentes a inmunoglobulina adecuadas incluyen pero no se limitan a cualquiera de aquellas seleccionadas del grupo que consiste de: SpA, fibronectina, GroEL y otras chaperonas, lipocalina, CCTLA4 y affibodies, como se estableció anteriormente.

De acuerdo con el aspecto anterior de la segunda configuración de la invención, convenientemente, los dominios de enlace a epítopo están unidos a un "esqueleto de proteína". Convenientemente, un esqueleto de proteína de acuerdo con la invención es un esqueleto de inmunoglobulina.

De acuerdo con la presente invención, el término "esqueleto de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que comprende al menos un pliegue de inmunoglobulina y que actúa como un núcleo para uno o más dominios de enlace a epítopo, como se definen aquí.

Esqueletos de inmunoglobulina preferidos, como se definen aquí, incluyen uno cualquiera o más de aquellos seleccionados de los siguientes: una molécula de inmunoglobulina que comprende al menos (i) el dominio CL (subclase kappa o lambda) de un anticuerpo; o (ii) el dominio CH1 de una cadena pesada de anticuerpo; una molécula de inmunoglobulina que comprende los dominios CH1 y CH2 de una cadena pesada de anticuerpo; una molécula de inmunoglobulina que comprende los dominios CH1, CH2 y CH3 de una cadena pesada de anticuerpo; o cualquiera del subconjunto (ii) en conjunto con el dominio CL (subclase kappa o lambda) de un anticuerpo. También se puede incluir un dominio de región bisagra. Tales combinaciones de dominios pueden, por ejemplo, imitar anticuerpos naturales, tales como IgG o IgM, o fragmentos de los mismos, tales como moléculas de Fv, scFv, Fab o $F(ab')_2$. Los expertos en la técnica sabrán que esta lista no pretende ser exhaustiva.

La unión del esqueleto a los dominios de enlace a epítopo, como se definen aquí, puede alcanzarse al nivel de polipéptido, esto es después de la expresión del ácido nucleico que codifica el esqueleto y/o los dominios de enlace a epítopo. Alternativamente, el paso de unión se puede realizar al nivel de ácido nucleico. Los métodos de unión de un esqueleto de proteína de acuerdo con la presente invención, a uno o más dominios de enlace a epítopo incluyen el uso de química de proteína y/o técnicas de biología molecular que serán familiares para los expertos en la técnica y que están descritas aquí.

Convenientemente, el ligando dual o multiespecífico puede comprender un primer dominio capaz de enlazar una molécula objetivo, y un segundo dominio capaz de enlazar una molécula o grupo que extiende la vida media del ligando. Por ejemplo, la molécula o grupo puede ser un agente de masa, tal como HSA o una proteína de matriz celular. Como se usa aquí, la frase "molécula o grupo que extiende la vida media de un ligando" se refiere a una molécula o grupo químico que, cuando está enlazado mediante un ligando específico dual como se describe aquí, aumenta la vida media in vivo de tal ligando específico dual cuando es administrado a un animal, con relación a un ligando que no se enlaza a esa molécula o grupo. Ejemplos de moléculas o grupos que extienden la vida media de un ligando se describen aquí más adelante. En una realización preferida, El ligando multiespecífico de conformación cerrada puede ser capaz de enlazarse a la molécula objetivo solamente al desplazamiento de la molécula o grupo mejorador de vida media. Así, por ejemplo, un ligando multiespecífico de conformación cerrada es mantenido en circulación en el torrente sanguíneo de un sujeto por una molécula de masa tal como HSA. Cuando se encuentra una molécula objetivo, la competencia entre los dominios de enlace del ligando multiespecífico de conformación cerrada produce el desplazamiento del HSA y en lace del objetivo. Las moléculas que aumentan la vida media se discutieron en mayor detalle anteriormente

Los ligandos de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invention, así como monómeros dAb útiles en la construcción de tales ligandos, pueden disociarse covenientemente de su(s) objetivo(s) cognato con una K_d de 300 nM a 5pM (pe, 3×10^{-7} a 5×10^{-12} M), preferiblemente 50nM a 20pM, o 5nM a 200pM o 1nM a 100pM, 1×10^{-7} M o menos, 1×10^{-8} M o menos, 1×10^{-9} M o

menos, 1 x 10^{-10} M o menos, 1 x 10^{-11} M o menos; y/o una constante de velocidad K_{off} de 5 x 10^{-1} a 1 x $10^{-7}S^{-1}$, preferiblemente 1 x 10^{-2} 1 x 10^{-6} S^{-1}, o 5 x 10^{-3} a 1 x 10^{-5} S^{-1}, o 5 x 10^{-1} S^{-1} o menos, o 1 x 10^{-2} S^{-1} o menos, o 1 x 10^{-3} S^{-1} o menos, o 1 x 10^{-4} S^{-1} o menos, o 1 x 10^{-5} S^{-1} o menos, o 1 x 10^{-6} S^{-1} o menos determinada mediante resonancia de plasmón superficial. La constante de velocidad K_d se define como K_{off}/K_{on}.

Adicionalmente, la invención provee un monómero dAb (o ligando específico dual que comprende tal dAb) que se enlaza a albúmina de suero (SA) con un K_d de 1nM a 500 μM (pe, x 10^{-9} a 5 x 10^{-4}), preferiblemente 100nM a 10μM. Preferiblemente, para un ligando específico dual que comprende un promer dAb anti-SA y un segundo dAb a otro objetivo, la afinidad (pe K_d y/o K_{off} medida por resonancia de plasmón superficial, pe usando BiaCore) del segundo dAb para su objetivo es de 1 a 100000 veces (preferiblemente 100 a 100000, más preferiblemente 1000 a 100000, o 10000 a 100000 veces) la afinidad del primer dAb para SA. Por ejemplo, el primer dAb se enlaza a SA con una afinidad de aproximadamente 10μM, mientras el segundo dAb se enlaza a su objetivo con una afinidad de 100pM, Preferiblemente, la albúmina de suero es una albúmina de suero humana (HSA).

En una realización, el primer dAb (o un monómero de dAb) se enlaza a SA (pe, HSA) con un K_d de aproximadamente 50, preferiblemente 70, y más preferiblemente 100, 150 o 200 nM.

La invención provee además dímeros, trímeros y polímeros de los monómeros de dAb menicionados anteriormente, de acuerdo con el aspecto anterior de la presente invención.

Los ligandos de acuerdo con la invención, incluyendo monómeros de dAb, dímeros y trímeros, pueden enlazarse a una región Fc de anticuerpo, que comprende uno o ambos dominios de C_H2 y C_H3, y opcionalmente una región bisagra. Por ejemplo, los vectores que codifican logandos enlazados a una sola secuencia de nucleótido a una región Fc se pueden usar para preparar tales polipéptidos. Alternativamente, los ligandos de acuerdo con la invención pueden esta rlibres de un dominio Fc.

En un aspecto adicional, la presente invención provee una o más moléculas de ácido nucleido que codifican al menos un ligando dual o multiespecífico como se define aquí. En una realización, el ligando es un ligando de conformación cerrada. En otra realización, es un ligando de conformación abierta. El ligando multiespecífico puede ser codificado en una sola molécula de ácido nucleico; alternativamente, cada dominio de enlace a epítopo puede ser codificado por una molécula de ácido nucleico separada. Cuando el ligando es codificado por una sol molécula de ácido nucleico, los dominios pueden ser expresados como un polipéptido de fusión, o pueden ser expresados separadamente y posteriormente enlazados juntos, por ejemplo usando agentes enlazantes químicos. Los ligandos expresados de ácidos nucleicos separados serán enlazados por medios apropiados.

El ácido nucleico puede además codificar una secuencia de señal para exportación de los polipéptidos desde una célula hospedera a la expresión, y puede estar fusionado con un componente de superficie de una partícula bacteriófaga filamentosa (u otro componente de un sistema de despliegue de selección) a la expresión. Las secuencias líder, que se pueden usar en la expresión bacteriana y/o despliegue del fago o fagémido, incluyen pelB, stII, ompA, phoA, bla y pelA.

En un aspecto adicional de la segunda configuración de la invención, la presente invención provee un vector que comprende ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

En ya un aspecto adicional, la presente invención provee una célula hospedera transfectada con un vector de acuerdo con la presente invención.

La expresión de tal vector puede ser configurada para producir, por ejemplo sobre la superficie de una partícula de bacteriófago, dominios de enlace a epítopo para selección. Esto permite la selección de dominios desplegados y por ende, selección de "ligandos multiespecíficos" usando el método de la presente invención.

<u>Combinación de dominios variables sencillos</u>

Los dominios útiles en la invención, una vez seleccionados usando los métodos ejemplificados anteriormente, pueden ser combinados por una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo métodos covalentes y no covalentes.

Los métodos preferidos incluyen el uso de enlazantes de polipéptido, como se describieron, por ejemplo, en conexión con moléculas scFv (Bird et al, (1988) Science 242:423- 426). La discusión de enlazantes adecuados se prevee en *Bird et al.* Science 242, 423-426; *Hudson et al*, Journal Immunol Methods 231 (1999) 177-189; *Hudson et al*, Proc Nat Acad Sci USA 85, 5879-5883. Los enlazantes son preferiblemente flexibles, permitiendo que los dos dominios sencillon interactúen. Un ejemplo de enlazante es un enlazante de $(Gly_4\ Ser)_n$, donde n=1 a 8, pe, 2, 3, 4, 5 o 7. También se pueden emplear enlazantes usados en diacuerpos, que son menos flexibles, (Holliger *et al.*, (1993) PNAS (USA) 90:6444-6448).

En una realización, el enlazante empleado no es una región bisagra de inmunoglobulina.

Los dominios variables pueden ser combinadosusando métodos diferentes a los enlazantes. Por ejemplo, el uso de puentes de disulfuro, proporcionados a través de residuos de cisteína que se encuentran naturalmente o diseñados, puede ser explotado para estabilizar dímeros V_H-V_H, V_L-V_L o V_H-V_L (Reiter *et al*, (1994) Protein Eng. 7:697-704) o mediante remodelamiento de la interfaz entre los dominios variables para mejorar el "ajuste" y, por ende, la estabilidad de interacción (Ridgeway *et al*, (1996) Protein Eng. 7:617-621; Zhu *et al.*, (1997) Protein Science 6:781-788).

Se pueden emplear otras técnicas para unir o estabilizar dominios variables de inmunoglobulinas, y en particular dominios V_H de anticuerpo VH dominios, según sea apropiado.

De acuerdo con la presente invención, los ligandos específicos duales pueden estar en conformaciones "cerradas" en solución. Una configuración "cerrada" es aquella en la cual los dos dominios (por ejemplo V_H y V_L) están presentes en forma asociada, tao como la de un par V_H-V_L asociado que forma

un sitio de enlace de anticuerpo. Por ejemplo, scFv puede estar en una conformación cerrada, dependiendo del reordenamiento del enlazante usado para enlazar los dominios V_H y V_L. Si este es suficientemente flexible para permitir que los dominios se asocien, o si se aferra rígidamente a estos en la posición asociada, es probable que los dominios adoptarán una conformación cerrada.

Igualmente, los pares de dominio V_H y pares de dominio V_L pueden existir en una conformación cerrada. Generalmente, esto será una función de asociación cercana de los dominios, tal como un enlazante rígido, en la molécula de ligando. Los ligandos en una conformación cerrada no seran capaces de enlazar tanto a la molécula que aumenta la vida media del ligando, como una segunda molécula objetivo. Así, el ligando típicamente solo enlazará la segunda molécula objetivo a la disociación de la molécula que aumenta la vida media del ligando.

Más aún, la construcción de dímeros V_H/V_H, V_L/V_L o V_H/V_L sin enlazantes provee la competición entre los dominios.

Los ligandos de acuerdo con la invención pueden además estar en una conformación abierta. En tal conformación, los ligandos serán capaces de enlazar simultáneamente la molécula que aumenta la vida media del ligando y la segunda molécula objetivo.

Típicamente, los dominios variables en una configuración abierta son (en el caso de pares V_H-V_L) se mantienen lo suficientemente lejos de los dominios para no interactuar y formar un sitio de enlace de anticuerpo y no competir para enlace a sus epítopos respectivos. En el caso de dímeros V_H/V_H o V_L/V_L, los dominios no están forzados juntos mediante enlazantes rígidos. Naturalmente, tales pares de dominio no competirán para el enlace de antígeno o formar un sition de enlace a anticuerpo.

Los fragmentos Fab y los anticuerpos enteros existirán principalemtne en la conformación cerrada, aunque se apreciará que es posible que existan ligandos específicos duales abiertos y cerrados en una veriedad de equilibrios bajo diferentes circunstancias. Es probable que el enlace del ligando a un

objetivo cambia el balance del equilibrio hacia la configuración abierta. Así, ciertos ligandos de acuerdo con la invención pueden existir en dos conformaciones en solución, una de las cuales (la forma abierta) puede enlazar dos antígenos o epítopos independientemente, mientras que la conformación alternativa (la forma cerrada) puede solamente enlazar un antígeno o epítopo; así, los antígenos o epítopos compiten para el enlace al ligando en esta conformación.

Aunque la forma abierta del ligando específico dual puede, por ende, existir en equilibrio con la forma cerrada en solución, se contempla que el equilibrio favorecerá la forma cerrada; más aún, la forma abierta puede ser secuestrada mediante enlace de objetivo en una conformación cerrada. Preferiblemente, por lo tanto, ciertos ligandos específicos duales de la invención están presentes en un equilibrio entre dos conformaciones (abierta u cerrada).

Los ligandos específicos duales de acuerdo con la invención pueden ser modificados con el fin de favorecen una conformación abierta o cerrada. Por ejemplo, la estabilización de las interacciones V_R-V_L con enlaces de disulfuro estabiliza la conformación cerrada. Más aún, los enlazantes usados para unir los dominios, incluyendo los pares de dominio V_R y V_L, se pueden construir de forma que se favorece la forma abierta; por ejemplo, los enlazantes pueden dificultar estéricamente la asociación de los dominios, tal como mediante la incorporación de residuos de amino ácido grandes en ubicaciones oportunas, o el diseño de una estructura rígida adecuada que mantendrá los dominios físicamente distanciados.

Caracterización del ligando específico dual.

El enlace del ligando específico dual a sus antígenos o epítopos específicos (p.e., CD40L y/o un epítopo enlazado por DOM8-24) puede ser probado mediante métodos que serán familiares a los expertos en la técnica, e incluyen ELISA. En una realización preferida de la invención el enlace es probado usando un ELISA de fago monoclonal.

La ELISA de fago se puede realizar de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado: un protocol ejemplar es el indicado a continuación.

Las poblaciones de fago producidas en cada ronda de selección pueden ser seleccionadas para enlace por ELISA al antígeno o epítopo seleccionado, para identificar anticuerpos de fago"policlonales". El fago de colonias bacterianas infectadas sencillas de estas poblaciones puede entonces ser seleccionado mediante ELISA para identificar anticuerpos de fago "monoclonales". También es deseable seleccionar fragmentos de anticuerpo solubles para enlace a antígeno o epítopo, y esto puede también ser realizado mediante ELISA usando reactivos, por ejemplo, contra una etiqueta de C o N terminal (ver por ejemplo Winter et al. (1994) Ann. Rev. Immunology 12, 433-55 y las referencias citadas allí.

La diversidad de los anticuerpos monoclonales de fago seleccionados también pueden ser evaluados mediante electroforesis de gel de los productos de PCR (Marks et al. 1991, supra; Nissim et al 1994 supra), sondeo (Tomlinson et al, 1992) J. Mol. Biol. 227, 776) o mediante secuenciamiento del vector de ADN.

Estructura de los "ligandos específicos duales".

Como se describió anteriormente, un anticuerpo se define aquí como un anticuerpo (por ejemplo IgG, IgM, IgA, IgA, IgE) o fragmento (Fab, Fv, Fv enlazado a disulfuro, scFv, diacuerpo) que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada y ligera, al menos dos dominios variables de cadena pesada o al menos dos dominios variables de cadena ligera. Puede derivarse al menos parcialmente de cualquier especie que procuce naturalmente un anticuerpo, o ser creado mediante tecnología de ADN recombinante; ya sea aislado del suero, células B, hibridomas, transfectomas, levadura o bacterias).

En una realización preferida de la invención, el ligando específico dual comprende al menos un dominio variable de cadena pesada sencillo de un anticuerpo y un dominio variable de cadena ligera sencillo de un anticuerpo, o dos dominios variables de cadena pesada o ligera sencillos. Por ejemplo, el

ligando puede comprender un par V_H/V_L, un par de dominios V_H o un par de dominios V_L.

Los primer y segundo dominios variables de tal ligando pueden estar en la misma cadena de polipéptido. Alternativamente pueden estar en cadenas de polipéptido separadas. En el caso que ellos estén en la misma cadena de polipéptido, pueden estar enlazados por medio de un enlazante, que es preferencialmente una secuencia de péptida, como se describió anteriormente

Los primer y segundo dominios variables pueden estar asociados covalentemente o no covalentemente. En el caso que ellos están covalentemente asociados, los enlaces covalentes pueden ser enlaces de disulfuro.

En caso que los dominios variables sean seleccionados de repretorios de gen V seleccionados, por ejemplo, usando tecnología de despliegue del fago como se describe aquí, entonces estos dominios variables comprenden una región de marco universal, de forma que ellos pueden ser reconocidos mediante un ligando genérico específico como se define aquí. El uso de marcos universales, ligandos genéricos y simirales se describen en WO99/20749.

Cuando se usan repertorios del ge V, la variación en la secuencia de polipéptido está preferiblemente localizada dentro de las asas estructurales de los dominios variables. Las secuencias de polipéptido de cualquier dominio variable pueden ser alteradas mediante mezclado de ADN o mediante mutación con el fin de mejorar la interacción de cada dominio variable que es su par complementario. El mezclado de ADN es conocido en la técnica y enseñado, por ejemplo, por Stemmer, 1994, Nature 370: 389-391 y pa Patente U.S. No. 6,297,053, cuyos contenidos de ambos están incorporados aquí por referencia. Otros métodos de mutagénesis son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización de la invención el "ligando específico dual" es un fragmento Fv de cadena sencilla. En una realización alternative de la invención, el "ligando específico dual" consiste de un formato Fab.

En un aspecto adicional, la presente invención provee ácido nucleico que codifica al menos un "ligando específico dual" como se define aquí.

El experto en la técnica apreciará que, dependiendo del aspecto de la invención, ambos antígenos o epítopos pueden enlazarse simultáneamente a la misma molécula de anticuerpo. Alternativamente, pueden competir para enlazarse a la misma molécula de anticuerpo. Por ejemplo, cuando ambos epítopos están enlazados simultáneamente, ambos dominios variables de un ligando específico dual son capaces de enlazar independientemente sus epítopos objetivos. Cuando los dominios compiten, un dominio variable es capaz de enlazar su objetivo, pero no al mismo tiempo que el otro dominio variable enlaza su objetivo cognato; o el primer dominio variable es capaz de enlazar su objetivo, pero no al mismo tiempo que el segundo dominio variable enlaza su objetivo cognato.

Las regiones variables pueden ser derivadas de anticuerpos dirigidos contra antígenos o epítopos objetivo. Alternativamente pueden ser derivados de un repertorio de dominios de anticuerpo sencillos tales como aquellos expresados en la superficie de bacteriófago filamentoso. La selección puede realizarse como se describe a continuación.

En general, las moléculas de ácido nucleico y las construcciones de vector requeridas para la realización de la presente invención pueden ser construidos y manipulados como de indica en los manuales de laboratorio estándar, tales como Sambrook (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, USA.

La manipulación de ácidos nucleicos en la presente invención se realiza típicamente en vectores recombinantes.

Así, en un aspecto adicional, la presente invención provee un vector que comprende ácido nucleico que codifica al menos un "ligando específico dual" como se describe aquí.

Como se usa aquí, vector se refiere a un elemento discreto que se usa para introducir ADN heterólogo en células para la expresión y/o replicación de los mismos. Los métodos por los cuales seleccionar o construir y, posterormente, usar tales vectores son bien conocidos por aquel de conocimiento común en la técnica. Numerosos vectores están disponibles públicamente, incluyendo plásmidos bacterianos, bacteriófago, cromosomas artificiales y vectores episomales. Tales vectores se pueden usar para clonación y mutagenesis sencilla; alternativamente se emplea el vector de expresión de gen. Un vector de uso de acuerdo con la invención puede ser seleccionado para acomodarse a una secuencia que codifica polipéptido de un tamaño deseado, típicamente de 0.25 kilobases (kb) a 40 kb o más de longitud. Una célula hospedera adecuada es transformada con el vector después de las manipulaciones de clonación *in vitro*. Cada vector contiene varios componentes funcionales, que incluyen generalmente un sitio de clonación (o "polienlazante"), un origen de replicación y al menos un gen marcador seleccionable Si un vector dado es un vector de expresión, este posee adicinalmente uno o más de los siguientes: elemento mejorador, promotor, secuencias de terminación de transcripción y de señal, cada uno posicionado en la vecidad del sitio de clonación, de forma que están enlazados operativamente al gen que codifica un ligando de acuerdo con la invención.

Los vectores de clonación y expresión contienen generalmente secuencias de ácido nucleico que permiten al vector replicarse en una o más células hospederas seleccionadas. Típicamente en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite al vector replicarse independientemene del ADN cromosómico hospedero e incluye orígenes de replicación o secuencias que se replican autónomamente. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levadura y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen de plásmido de 2 micrones es adeucado para la levadura, y varios origenes virales (p.e. SV 40, adenovirus) son útiles para clonar vectores en células mamíferas. Generalmente, no es necesario el origen de replicación para los vectores de expresión mamíferos a menos que estos se usen en células mamíferas capaces de replicar niveles altos de ADN, tales como células COS.

Covenientemente, un vector de clonación o expresión puede contener un gen de selección también referido como un marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células hospederas transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células hospederas no transformadas con el vector que cotiene el gen de selección, por lo tanto, no sobrevirtán en el medio de cultivo. Los genes de selección típica codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, p.e. ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, deficiencias autotróficas de complemento, o suministro de nutrientes críticos no disponibles en el medio de crecimiento.

Como la replicación de vectores que codifican un ligando de acuerdo con la presente invención se realiza más convenientemente en *E. coli*, se usa un marcador seleccionable de E. coli, por ejemplo, el gen de β-lactamasa que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Estos pueden ser obtenidos de plásmidos de *E. coli*, tal como pBR322 o un plásmido pUC tales como pUC18 o pUC19.

Los vectores de expresión contienen usualmente un promotor que es reconocido por el organismo hospedero y está enlazado operablemente a la secuencia de codificación de interés Tal promotor puede ser inducible o constitutivo El término "enlazado operablemente" se refiere a la juxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera destinada. Una secuencia de control "enlazada operablemente" a una secuencia de codificación está ligada de tal forma que la expresión de la secuencia de codificación se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

Promotores adecuados para uso con hospederos procarióticos incluyen, por ejemplo, los sistemas de promotor β-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema promotor de triptofano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac. Los promotores para uso en los sistemas bacterianos también contendrán generalmente una secuencia Shine-Dalgarno enlazada operablemente a la secuencia de codificación.

Los vectores preferidos son vectores de expresión que permiten la expresión de una secuencia de nucleótido correspondiente a un miembro de biblioteca de polipéptido. Así, la selección con el primer y/o segundo antígeno o epítopo se puede realizar meidante propagación y expresión separada de un clon sencillo que expresa al miembro de biblioteca de polipéptido, o mediante el uso de cualquier sistema de despliegue de selección. Como se describió anteriormente, el sistema de despliegue de selección preferido es el despliegue de bacteriófago. Así, se pueden usar vectores de fago o fagémido, pe pIT1 o pIT2. Las secuencias líder útiles en la invención incluyen pelB, stII, ompA, phoA, bla y pelA. Un ejemplo son vectores fagémidos que tienen un origen de replicación de *E. coli.* (para replicación de cadena doble) y también un origen de replicación fago (para producción de ADN de cadena sencilla). La manipulación y expresión de tales vectores es bien conocida en la técnica (Hoogenboom y Winter (1992) supra; Nissim et al. (1994) supra). Brevemente, el vector contiene un gen de β-lactamasa para conferir selectividad en el fagémido, y un promotor lac ascendentemente de un casete de expresión que consiste (N a C terminal) de una secuencia líder pelB (que dirige el polipéptido expresado al espacio periplásmico), un sitio de clonación múltiple (para clonar la versión de nucleótido del miembro de biblioteca), opcionalmente, una o más etiquetas de péptido (para detección), opcionalmente, uno o más codones de finalización TAG y la proteína PIII de fago. Así, usando varias cepas supresoras y no supresoras de *E. coli* y con la adición de glucosa, iso-propil tio-β-D-galactosida (IPTG) o un fago colaborador, tal como VCS MI 3, el vector es capaz de replicarse como un plásmido sin expresión, producir grandes cantidades del miembro de biblioteca de polipéptido o producir fago, algunos de loc cuales contienen al menos una copia de la fusión polipéptido-pIII en su superficie.

La construcción de vectores que codifican logandos de acuerdo con la invención emplea técnicas de ligadura convencionales. Vectores aislados o fragmentos de ADN son clivados, ajustados, y re-ligados en la forma deseada para generar el vector requerido. Si se desea, el análisis para confirmar que las secuencias correctas están presentes en el vector construído, se puede realizar de una forma conocida. Métodos adecuados para construir vectores de expresión, preparar transcriptos *in vitro*, introducir ADN en células hospederas, y realizar análisis para evaluar la expresión y función, son conocidos por los

expertos en la técnica. La presencia de una secuencia de gen en una muestra es detectada, o su amplificación y/o expresión cuantificada por métodos convencionales, tales como análisis Al Sur o al Norte (Southern o Northern), Manchado hacia el Occidente (Western blotting), manchado puntual (dot blotting) de ADN, ARN o proteína, hibridación *in situ*, inmunoccitoquímica o análisis de secuencia de moléculas de ácido nucleico o proteína. Los expertos en la técnica contamplerán fácilmente cómo se pueden modificar estos métodos, si se desea.

Estructura de los Ligandos

De acuerdo con un aspecto de la invención, dos o más dominios de enlace a epítopo no complementarios están enlazados de forma que están en una conformación cerrada como de definió aquí. Covenientemente, pueden estar unidos adicionalmente a un esqueleto que puede, como una alternativa, o en adición a un enlazante descrito aquí, facilitar la formación y/o mantenimiento de la conformación cerrada de los sitios de enlace de epítopo con respecto a otro. Alternativamente, los polipéptidos de dominio variable sencillo de anticuerpo anti-CD40L monoméricos de la invención pueden ser construidos usando marcos de andamio o esqueleto como se discutió aquí.

(1) Esqueletos

Los esqueletos pueden estar basados en moléculas de inmunoglobulina o pueden ser de origen diferente a inmunoglobulina como se indicó anteriormente. Esqueletos de inmunoglobulina preferidos como se definen aquí, incluyen uno cualquiera o más de aquellos seleccionados de lo siguientes: una molécula de inmunoglobulina que comprende al menos (i) el dominio CL (subclase kappa o lambda) de un anticuerpo; o (ii) el dominio CH1 de una cadena pesada de anticuerpo; una molécula de inmunoglobulina que comprende los dominios CH1 y CH2 de una cadena pesada de anticuerpo; una molécula de inmunoglobulina que comprende los dominios CH1, CH2 y CH3 de una cadena pesada de anticuerpo; o cualquiera del subconjunto (ii) en conjunto con el dominio CL (subclase kappa o lambda) de un anticuerpo. También se puede incluir un dominio de región bisagra. Tales combinaciones de dominios pueden, por ejemplo, imitar anticuerpos naturales, tales como IgG o IgM, o

fragmentos de los mismos, tales como moléculas de Fv, scFv, Fab o $F(ab')_2$. Los expertos en la técnica sabrán que esta lista no pretende ser exhaustiva.

(II) Andamios de Proteína

Cada dominio de enlace de epítopo comprende un andamio de proteína y una o más CDRs que están involucradas en la interacción específica del dominio con uno o más epítopos. Covenientemente, un dominio de enlace de epítopo de acuerdo con la presente invención comprende tres CDRs. Andamios de proteína adecuados, además de aquellos basados en dominos de inmunoglobulina, también se pueden basar en andamios o esqueletos de proteína diferentes a los dominios de inmunoglobulina. Por ejemplo, los receptores bacteriales naturales tales como SpA se han usado como andamios para el injerto de CDRs para generar ligandos que se enlazan específicamente a uno o más epítopos. Los detalles de este procedimiento se describen en US 5,831,012. Otros andamios adecuados incluyen aquellos basados en fibronectina y affibodies (Affibody, Bromma, Suecia). Los detalles de procedimientos adecuados se describen en WO 98/58965. Otros andamios adecuados incluyen lipocalina y CTLA4, como se describe en van den Beuken et al, J. Mol. Biol. (2001) 310, 591-601, y andamios tales como aquellos descritos en WO0069907 (Medical Research Council), que se basan, por ejemplo, en la estructura de anillo de GroEL bacteriano u otros polipéptidos chaperonas. Otros andamios no basados en inmunoglobulina que se pueden usar de acuerdo con la invención incluyen aquellos basados en la clase A del receptor de LDL, monómeros y multímeros del dominio EGF, y estructuras disponibles en Biorexis (King of Prussia, PA) o Avidia (Mountain View, CA). Otros andamios diferentes a inmunoglobulina que se pueden usar se describen, por ejemplo, en WO05/040229, WO04/044011, y US20050089932.

Andamios para uso en la construcción de Ligandos

i. Selección de la conformación de la cadena principal

Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulina comparten todos un pliegue similar para su cadena de polipéptido. Por ejemplo, aunque los anticuerpos son altamente diversos en términos de su secuencia primaria, la

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

Los ligandos de la presente invención son seleccionados covenientemente y/o ensamblados de bibliotecas de dominios, tales como bibliotecas de dominios V_H y/o bibliotecas de dominios V_L dominios Más aún, los ligandos de la invención pueden ellos mismos proveerse en la forma de bibliotecas. En un aspecto de la presente invención, las bibliotecas de ligandos y/o dominios son diseñadas en donde ciertas longitudes de asa y residuos claves han sido elegidos para asegurar que la conformación de cadena principal de los miembros es conocida. Covenientemente, estas son conformaciones reales de moléculas de la superfamilia de inmunoglobulina encontradas en la naturaleza, para minimizar las posibilidades que no sean funcionales, como se discutió anteriormente. Los segmentos de gen V de línea germinal sirven como un marco básico adecuado para construir bibliotecas de anticuerpo o de receptor de célula T, también se usan otras secuencias. Pueden ocurrir variaciones en una baja fracuencia, de foma que un pequeño número de miembros funcionales puede poseer una conformación de cadena alterada, que no afecta su función.

La teoría de la estructura canónica también se usa para evaluar el número de conformaciones de cadena principal diferentes codificadas por los

ligandos, para predecir la conformación de cadena principal con base en las secuencias de ligando y para elegir residuos para la diversificación que no afecten la estructura canónica. Es conocido que, en el dominio V_k humano, el asa L1 puede adoptar una de cuatro estructuras canócicas, el asa L2 tiene una estructura canónica sencilla y que el 90% de los dominios V_k adoptan una de las cuatro o cinco estructuras canónicas para el asa L3 (Tomlinson et al. (1995) supra); así, en el dominio V_k solo, diferentes estructuras canónicas pueden combinarse para crear un rango de diferentes conformaciones de cadena principal. Dado que el dominio $V\lambda$ codifica un rango diferente de estructuras canónicas para las asas L1, L2 y L3 y que los dominios V_k y $V\lambda$ pueden aparearse con cualquier dominio V_H que codifica varias estructuras canónicas para las asas H1 y H2, el número de combinaciones de estructura canónica observados para estas cinco asas es muy grande. Esto implica que la generación de diversidad en la conformación de cadena principal puede ser esencial para la producción de un amplio range de especificidades de enlace. Sin embargo, mediante la construcción de una bibioteca de anticuerpo basada en una conformación de cadena principal conocida sencilla, se ha encontrado, contrario a lo que se esperaba, que no se requiere la diversidad en la conformación de cadena principal para generar suficiente diversidad para marcar sustancialmente todos los antígenos. Incluso más sorprendentemente, la conformación de cadena principal sencilla no necesita ser una estructura de concenso – se puede usar una conformación sencilla que se encuentra naturalmente conformation como la base de una biblioteca entera. Así, en un aspecto preferido, los ligandos de la invención poseen una sola conformación de cadena principal conocida sencilla.

La conformación de cadena principal sencilla que es elegida es preferiblemente de lugar común entre las moléculas del tipo superfamilia de inmunoglobulina en cuestión. Una conformación es de lugar común cuando se observa que un número significativo de moléculas que se encuentran naturalmente la adoptan. En consecuencia, en un aspecto preferido de la invención, la ocurrencia natural de las diferentes conformaciones de cadena principal para cada asa de enlace de un dominio de inmunoglobulina son consideradas separadamente, y entonces se elige un dominio variable que se encuentra naturalmente que posee la combinación deseada de conformaciones de cadena principal para las diferentes asas. Si ninguna está disponible, se

puede elegir la más cercana equivalente. Es preferible que la combinación deseada de conformaciones de cadena principal par alas diferentes asas sea creado seleccionando segmentos de gen de línea germinal que codifican las conformaciones de cadena principal deseadas. Es más preferable, que los segmentos de gen de línea germinal seleccionados sean frecuentemente expresados en la naturaleza, y lo más preferido es que sean los expresados más frecuentemente de todos los segmentos de gen de línea germinal.

En el diseño de ligandos o bibliotecas de los mismos, la incidencia de las diferentes conformaciones de cadena principal para cada una de las asas de enlace de antígeno puede ser considerada separadamente. Para H1, H2, L1, L2 y L3, se elige una conformación dada que es adoptada por entre 20% y 100% de las asas de enlace de antígeno de moléculas que se encuentran naturalmente. Típicamente, su invidencia observada está por encima del 35% (p.e. entre 35% y 100%) e, idealmente, por encima del 50% o incluso por encima del 65%. Como la vasta mayoría de las asas H3 no tienen estructuras canónicas, es preferible seleccionar una conformación de cadena principal que es de lugar común entre aquellas asas que si muestran estructuras canónicas. Para cada una de las asas, la conformación que es observada más frecuentemente en el repertorio natural es por lo tanto seleccionada. En los anticuerpos humanos, las estructuras canónicas más populares (CS) para cada asa son las siguientes: H1 - CS 1 (79% del repertorio expresado), H2 - CS 3 (46%), L1 – CS 2 de V_k (39%), L2 - CS 1 (100%), L3 - CS 1 de V_k (36%) (el cálculo asume una relación κ:λ de 70:30, Hood et al. (1967) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 48: 133). Para las asas H3 que tienen estructuras canónicas, una longitud de CDR3 (Kabat *et al.* (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*, U.S Department of Health and Human Services) de siete residuos con un Puente de tal desl residuo 94 al residuo 101 parece ser la más común. Hay al menos 16 secuencias de anticuerpo humano en la biblioteca de datos EMBL con la longitud de H3 requerida y los residuos claves para formar esta conformación, y al menos dos estructuras cristalográficas en el banco de datos de proteína que se pueden usar como una base para el modelamiento del anticuerpo (2cgr y 1tet). Los segmentos de gen de línea germinal más frecuentemente expresados que esta combinación de estructuras canónicas, son el segmento 3-23 (DP-47) V_H, el segmento JH4b J_H, el segmento 02/012 (DPK49) V_k y el segmento $J_κ1$ Jk. Los segmentos DP45 y

DP38 V_H también son adecuados. Estos segmentos pueden, por lo tanto, usarse en combinación como una base para construir una biblioteca con la conformación de cadena principal sencilla deseada.

Alternativamente, en lugar de elegir la conformación de cadena principal sencilla basada en la ocurrencia natural de las diferentes conformaciones de cadena principal para cada una de las asas de enlace en aislamiento, la ocurrencia natural de combinaciones de conformaciones de cadena principal se usa como la base para elegir la conformación de cadena principal sencilla. En el caso de anticuerpos, por ejemplo, la ocurrencia natural de combinaciones de estructura canónica para cualesquiera dos, tres, cuatro, cinco o las seis asas de enlace de antígeno se pueden determinar. Aquí, es preferible que la conformación elegida, sea de lugar común en anticuerpos que se encuentran naturalmente y lo más preferido es que se observe más frecuentemente en el repertorio natural. Así, en los anticuerpos humanos, por ejemplo, cuando se consideran combinaciones naturales de las cinco asas de enlace de antígeno, H1, H2, L1, L2 y L3, se determina la combinación más frecuente de estructuras canónicas y luego se combina con la conformación más popular para el asa H3, como una base para elegir la conformación de cadena principal sencilla.

ii. Diversificación de la secuencia canónica

Habiendo seleccionado varias conformaciones de cadena principal conocidas, o, preferiblemente una conformación de cadena principal conocida sencilla, los ligandos de acuerdo con la invención o las bibliotecas para uso en la invención pueden ser construidas variando el sitio de enlace de la molécula con el fin de generar un repertorio con diversidad estructural y/o funcional. Esto significa que los variantes son generados de forma que poseen suficiente diversidad en su estructura y/o en su función de forma que son capaces de proveer un rango de actividades.

La actividad deseada es típicamente generada variando la molécula seleccionada en una o más posiciones. Las posiciones a ser cambiadas pueden ser elegidas aleatoramiente o se seleccionan preferiblemente. La variación puede entonces ser alcanzada ya sea mediante aleatorización, durante la cual el amino ácido residente es reempazado por cualquier amino

ácido o análogo del mismo, natural o sintético, produciendo un gran número de variantes, o reeplazando el amino ácido residente con uno o mas de un subconjunto de amino ácidos definido, produciendo un número de variantes más limitado.

Se han reportado varios métodos para introducir tal diversidad. PCR susceptible a error (Hawkins et al. (1992) J. Mol Biol, 226: 889), mutagenesis química (Deng et al. (1994) J. Biol. Chem., 269: 9533) o cepas mutadoras bacterianas (Low et al. (1996) J Mol Biol, 260: 359) se pueden usar para introducir mutaciones aleatorias en los genes que codifican la molécula. Los métodos para mutar posiciones seleccionadas también concocidas en la técnica e incluyen el uso de oligonucleótidos dispares o degenerados, con o sin el uso de PCR. Por ejemplo, se han creado varias bibliotecas de anticuerpo sintéticas mediante el marcado de mutaciones a las asas de enlace de anticuerpo. La región H3 de un Fab de enlace a toxoide tetánico humano ha sido aleatorizado para crear un rango de nuevas especificidades de enlace (Barbas et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 89: 4457). Las regiones H3 y L3 aleatorias o semi-aleatorias han sido añadidas a segmentos de gen V de línea germinal para producir bibliotecas grandes con regiones de marco no mutadas (Hoogenboom & Winter (1992) *J. Mol. Biol*, 227: 381; Barbas et al (1992) *Proc. Natl Acad. Sci.* USA, 89: 4457; Nissim *et al.* (1994) *EMBO* J, 13: 692; Griffiths *et al* (1994) *EMBO J*, 13: 3245; De Kruif *et al.* (1995) *J. Mol Biol,* 248: 97). Tal diversificación ha sido extendida para incluir algunas o todas las otras asas de enlace de antígeno (Crameri *et al* (1996) *Nature Med.*, 2: 100, Riechmann *et al.* (1995) *Bio/Technology*, 13: 475; Morphosys, WO97/08320, supra).

Como la aleatorización de asa tiene el potencial de crear aproximadamente más de 10^{15} estructuras para H3 solo y un número igualmente grande de variantes de las otras cinco asas, no es factible usar tecnología de transformación actual o incluso usar sistemas libres de células para producir una biblioteca que representa todas las combinaciones posibles. Por ejemplo, en una de las bibliotecas más grandes construidas a la fecha, se generaron 6 x 10^{10} anticuerpos diferentes, que es solamente una fracción de la diversidad potencial para una biblioteca de este diseño (Griffiths *et al* (1994) supra).

En una realización preferida, se diversifican solamente aquellos residuos que están directamente involucrados en la creación o modificación de la función deseada de la molécula. Para muchas moléculas, la function sera enlazar un objetivo y por lo tanto, la diversidad debe concentrarse en el sidio de enlace a objetivo, evitando cambiar residuos que son cruciales para el empaque global de la molécula o para mantener la conformación de cadena principal elegida.

Diversificación de la secuencia canonical según appliqué a los dominios de anticuerpo

En el caso de los ligandos de la invención, el sitio de enlace para el objetivo es el sitio de enlace de antígeno más usual. Así, en un aspecto altamente preferido, la invención provee bibliotecas de o para ensamble de ligandos de anticuerpo en los cuales son variados solamente aquellos residuos en el sitio de enlace de antígeno. Estos residuos son extremadamente diversos en el repertorio de anticuerpo humano y son conocidos para hacer contactos en complejos anticuerpo/antígeno de alta resolución. Por ejemplo, se conoce que en L2 las posiciones 50 y 53 son diversas en anticuerpos que se encuentran naturalmente y se oberva que hacen contacto con el antígeno. En contraste, el enfoque convencional habría sido diversificar todos los residuos en la Región Determinante de Complementariedad (CDR1) correspondiente, defnida según Kabat et at (1991, supra), unos siete residuos comparados con los dos diversificados en la bilioteca para uso de acuerdo con la invención. Esto representa una mejora significativa en términos de diversidad funcional requerida para crear un rango de especificidades de enlace de antígeno.

En la naturaleza, la diversidad de anticuerpo es el resultado de dos procesos: recombinación somática de segmentos de genes V, D y J de línea germinal para crear un repertorio primario inocuo (llamado línea germinal y diversidad de empalme) e hipermutación somática de los genes V reordenados resultantes. El análisis de las secuencias de anticuerpo humanas ha mostrado que la diverdidad en el repertorio primario está enfocado en el centro del sitio de enlace de enatígeno mientras que la hipermutación somática dispersa la diversidad a las regiones en la periferia del sitio de enlace de antígeno que son

altamente conservados en el repertorio primario (ver Tomlinson (1996) J Mol. Biol, 256: 813). Esta complementariedad ha probablemente evolucionado como una estragia eficiente para la búsqueda de espacio de secuencia y, aunque aparentemente única para anticuerpos, se puede aplicar fácilmente a otros repertorios de polipéptido. Los residuos que son variados son un subconjunto de aquellos que forman el sitio de enlace para el objetivo. Diferentes subconjuntos (incluyendo superposiciones) de residuos en el sitio de enlace del objetivo son diversificados en diferentes etapas durante la selección, si se desea.

En el caso de un repertorio de anticuerpo, se crea un repertorio inicial "inócuo" en donde algunos, pero no todos, los residuos en el sitio de enace de antígeno son diversificados. Como se usa aquí en este contexto, el término "inócuo" se refiere a moléculas de anticuerpo no tienen objetivo predeterminado. Estas moléculas asemejan quellas que son codificadas por por los genes de inmunoglobulina de un individual que no se ha sometido a diversificación inmune, como es el caso con individuos fetales recién nacidos, cuyos sistemas inmunes no han sido sometidos aún por una amplia variedad de estímulos antigénicos. Este repertorio es entonces seleccionado contra un rango de antígenos o epítopos. Si se requiere, la diversidad adicional puede entonces ser introducida fuera de la región diversificada en el repertorio inicial. Este repertorio madurado puede ser seleccionado para la función, especificidad o afinidad modificada.

La invención provee dos repertorios inócuos diferentes de dominios de enlace para la construcción de ligandos, o una biblioteca inocua de ligandos, en la cual algunos o todos los residuos en el sitio de enlace de antígeno son variados. La biblioteca "primaria" imita el repertorio primario natural, con diversidad restringida a los residuos en el centro del sitio de enlace de antígeno que son diversos en los segmentos de gen V de línea germinal (diversidad de línea germinal) o diversificados durante el proceso de recombinación (diversidad de empalme). Aquellos residuos que están diversificados incluyen, pero no se limitan a, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98, L50, L53, L91, L92, L93, L94 y L96 En la biblioteca "somática", la diversidad está restringida a los residuos que sin diversificados durante el proceso de recombinación (diversidad de empalme) o son altamente mutados

somáticamente). Aquellos resíduos que están diversificados incluyen, pero no se limitan a: H31, H33, H35, H95, H96, H97, H98, L30, L31, L32, L34 y L96. Todos los residuos listados anteriormente como adecuados para diversificación en estas bibliotecas son conocidos por hacer contactos en uno o más complejos de anticuerpo-antígeno. Como en ambas bibliotecas, no todos los resoduos en el sitio de enlace de antígeno están variados, diversidad adicional es incorporada durante la selección variando los residuos restantes, si se desea hacerlo. Será obvio para el experto en la técnica que se puede usar cualquier subconjunto de cualquiera de estos residuos (o residuos adicionales que comprenden el sitio de enlace de antígeno) para la diversificación inicial y/o posterior del sitio de enlace de antígeno.

En la construcción de bibliotecas para uso en la invención, la diversificación de posiciones elegidas se logra típicamente a nivel de ácido nucleico, alterando la secuencia de codificación que especifica la secuencia del polipéptido de forma que se puede incorporar un número de posibles amino ácidos (los 20 o un subconjunto de los mismos) en esa posición. Usando la nomenclarua IUPAC, el codón más versatile es NNK, que codifica todos los amino ácidos así como el codón finalizador TAG. El codón NNK se usa preferiblemente con el fin de introducir la diversidad requerida Otros codones que alcanzan los mismos propósitos también son de uso, incluyendo el codón NNN, que conduce a la producción de los codones finalizadotes TGA y TAA adicionales.

Una característica de la diversidad de cadena lateral en el sitio de enlace de antígeno de anticuerpos humanos es una tendencia pronunciada que favorece ciertos residuos de amino ácido. Si se suma la composición de amino ácido de las diez posiciones más diversas en cada una de las regiones V_H, V_K y V_λ, más del 76% de la diversidad de cadena lateral proviene de solamente siete residuos diferentes, siendo estos, serina (24%), tirosina (14%), asparagina (11%), glicina (9%), alanina (7%), aspartato (6%) y treonina (6%). Esta tendencia hacia residuos hidrofilicos y residuos pequeños que pueden proveer flexibilidad de la cadena principal probablemente refleja la evolución de las superficies que están predispuestas a enlazar un amplio rango de antígenos o epítopos y puede ayudar a explicar la promiscuidad requerida de anticuerpos en el repertorio primario.

Como es preferable imitar esta distribución de amino ácidos, la distribución de amino ácidos en las posiciones a ser variadas preferiblemente imitan las vistas en el sitio de enlace de antígeno de los anticuerpos. Tal tendencia en la sustitución de amino ácidos que permite la selección de ciertos polipéptidos (no solo, polipéptidos de anticuerpo) contra un rango de antígenos objetivo se aplica fácilmente a cualquier repertorio de polipéptido Hay varios métodos para desviar la distribución de amino ácido en la posición a ser variada (incluyendo el uso de mutagénesis de tri-nucleótido, ver WO97/08320), de la cual, el método preferido, debida a facilidad de síntesis, es el uso de codones degenerados convencionales. Al comparar el perfil de amino ácido codificado por todas las combinaciones de codones degenerados (con degeneración sencilla, doble, triple y cuadruple en relaciones iguales en cada posición) con el uso de amino ácido natural, es posible calcular el codón más representativo. Los codones (AGT)(AGC)T, (AGT)(AGC)C y (AGT)(AGC)(CT) – esto es, DVT, DVC y DVY, usando la nomenclatura IUPAC respectivamente – son aquellos más cercanos al perfil de amino ácido deseado: ellos codifican 22% de serina y 11% de tirosina, asparagina, glicina, alanina, aspartato, treonina y cisteína. Preferiblemente, por lo tanto, las bibliotecas son construidas usando cualquier codón de DVT, DVC o DVY en cada una de las posicones diversificadas.

Vide Media Aumentada

In vivo, los anticuerpos anti-CD40L monovalentes PEGilados como se describen aquí confieren una ventaja distinta sobre los polipéptidos de anticuerpo no PEGilados, en que las moléculas de anticuerpo PEGiladas tendrán una vida media in vivo prolongada en gran medida. Sin estar ligado a una teoría particular, se cree que la vida media aumentada de las moléculas descritas aquí es conferida por el tamaño hidrodinámico aumentado del polipéptido de anticuerpo resultante de la unión de polímero(s) de PEG. Más específicamente, se cree que dos parámetros juegan un papel importante en la determinación de vida media en suero de polipéptidos de anticuerpo PEGilados. El primer criterio es la naturaleza y tamaño de la unión del PEG, p.e., si el polímero usado es sencillamente una cadena lineal o una cadena ramificada/bifurcada, en donde la cadena ramificada/bifurcada da lugar a una

252

vida media más larga. El segundo es la ubicación de la mitad o mitades de PEG en el polipéptido de anticuerpo en el formato final y cuantos brazos de PEG no modificados "libres" tiene la molécula. El tamaño hidrodnámico resultante del polipéptido de anticuerpo PEgilado, estimado, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión de tamaño, refleja la vida media en suero de la molécula. En consecuencia, a mayor tamaño hidrodinámico de la molécula PEGilada, mayor vida media en suero.

La vida media aumentada es útil en aplicaciones in vivo de inmunoglobulinas, especialmente anticuerpos y más especialmente fragmentos de anticuerpo de tamaño pequeño. Tales fragmentos (Fvs, Fabs, scFvs, dAbs) sufren depuración rápida del cuerpo; así, aunque son capaces de alzanzar la mayoría de las partes del cuerpo rápidamente, y son rápidos de producir y más fáciles de manejar, sus aplicaciones in vivo ha sido limitadas por solamente su breve persistencia in vivo.

En un aspecto, un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente como se describe aquí es estabilizado in vivo mediante fusión con una mitad, tal como PEG, que aumenta el tamaño hidrodinámico del polipéptido de anticuerpo. Los métodos para análisis farmacocinético y determinación de vida media serán familiares para los expertos en la técnica. Los detalles se pueden encontrar en Kenneth et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists, y en Peters et al, Pharmacokinetc analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, publicada por Marcel Dekker, 2a Rev. ex edición (1982), que describe parámetros farmacocinéticas tales como vidas medias t alfa y t beta y área bajo la curva (AUC).

Típicamente, la vida media de un polipéptido de anticuerpo PEGilado como se describe aquí es aumentada en 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más con relación a un dAb no PEGilado (en donde el polipéptido de anticuerpo del polipéptido PEGilado y el polipéptido de anticuerpo no PEGilado son los mismos). Son posibles aumentos en el rango de 2x, 3x, 4x, 5x, 7x, 10x, 20x, 30x, 40x, y hasta 50x o más de la vida media. Alternativamente, o en adición, con posibles aumentos en el rango de hasta 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, 150x de la vida media.

Las vidas medias (t½ alfa y t½ beta) y AUC pueden ser determinadas a partir de una curva de concentración en suero de logando contra tiempo. Se puede usar el paquete de análisis WiriNonlin (disponible en Pharsight Corp., Mountain View, CA 94040, USA), por ejemplo, para modelar la curva. En una primera fase (la fase alfa) el ligando está sometiendose principalmente a distribución en el paciente, con alguna eliminación. Una segunda fase (fase beta) es la fase terminal cuando el ligando ha sido distribuido y la concentración en suero está disminuyendo en la medida que el ligando es depurado del paciente. La vida media tα es la vida media de la primera fase, y la vida media tβ es la vida media de la segunda fase. "Vida media" como se usa aquí, a menos que se note de otra forma, se refiere a la vida media global de un dominio variable de anticuerpo de la invención determinado mediante modelamiento sin compartimiento (contrastado con modelamiento bifásico, por ejemplo). La vida media beta es una medida del tiempo que toma la cantidad de monómero o multímero de dAb en ser depurada del mamífero al cual se le es administrado Así, covenientemente, la presente invención provee una composición que contiene dAb, p.e., una composición de grupo efectora de dAb, que tiene una vida media tα en el rango de 0.25 horas a 6 horas o más. En una realización, el límite inferior del rango es de 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1.3 horas, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o alternativamente, una composición que contiene dAb tendrá una vida media tα en el rango de hasta, e incluyendo 12 horas. En una realización, el límite superior del rango es 11, 10, 9, 8, 7, 6, o 5 horas. Un ejemplo de un rango adecuado es 1.3 a 6 horas, 2 a 5 horas o 3 a 4 horas.

Covenientemente, la presente invención provee una composición que contiene dAb que comprende un ligando de acuerdo con la invención, que tiene una vida media tβ en el rango de 1 - 170 horas o más. En una realización, el límite inferior del rango es 2.5 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o alternativamente, una composición que contiene dAb, p.e. una composición de grupo efector dAb tiene una vida media tβ en el rango de hasta, e incluyendo, 21 días. En una realización, el límite superior del rango es de 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, o 20 días. Covenientemente, una

composición que contiene dAb de acuerdo con la invención, tendrá una vida media tβ en el rango de 2-100 horas, 4-80 horas, y 10-40 horas. En una realización adicional, estará en el rango de 12-48 horas. En una realización aún adicional, estará en el rango de 12-26 horas. La presente invención provee una composición que contiene dAb que comprende un ligando de acuerdo con la invención, que tiene una vida media en el rango de 1-170 horas o más. En una realización, el límite inferior del rango es 1.3 horas, 2.5 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Adicionalmente, o alternativamente, una composición que contiene dAb, p.e. una composición de grupo efector de dAb tiene una vida media en el rango de hasta, e incluyendo 21 días. En una realización, el límite superior del rango es 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, o 20 días.

Adicionalmente, o alternativamente a los criterios anteriores, la presente invención provee una composición que contiene dAb que comprende un ligando de acuerdo con la invención, que tiene un valor de AUC (área bajo la curva) en el rango de 1 mg.min/ml o más. En una realización, el límite inferior del rango es 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 o 300 mg.min/ml. En adición, o alternativamente, un ligando o composición de acuerdo con la invención tiene un AUC en el rango de hasta 600 mg min/ml. En una realización, el extreme superior del rango es 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 o 50 mg.min/ml. Convenientemente, un ligando de acuerdo con la invención tendrá un AUC en el rango seleccionado del grupo que consiste de los siguientes: 15 a 150 mg.min/ml, 15 a 100 mg.min/ml, 15 a 75 mg.min/ml, y 15 a 50 mg.min/ml.

Los ligandos de acuerdo con la invención, incluyendo, mono, duales y multi-específicos, en una configuración de los mismos, son capaces del enlace a uno o más moléculas que pueden aumentar la vida media del ligando *in vivo*. Típicamente, tales moléculas son polipéptidos que se encuentran naturalmente *in vivo* y que resisten la degradación o remoción mediante mecanismos endógenos que remueven material no deseado del organismo. Por ejemplo, la molécula que aumenta la vida media del organismo puede seleccionarse de los siguientes:

Proteínas de la matriz extracelular; por ejemplo colágeno, lamininas, integrinas y fibronectina. Los colágenos son las proteínas más importantes de

la matriz extracelular. Aproximadamente 15 tipos de moléculas de colágeno se conocen actualmente, encontradas en diferentes partes del cuerpo, pe colágeno tipo 1 (que equivale al 90% del colágeno corporal) encontrado en hueso, piel, tendón, ligamentos, córnea, órganos internos, o colágeno tipo II, encontrado en cartílago, disco invertebral, notocordio, humor vítero del ojo.

Proteínas encontradas en la sangre, incluyendo:

Proteínas del plasma tales como fibrina, macroglobulina α-2, albúmina de suero, fibrinógeno A, fibrinógeno B, proteína A amieloide en suero, heptaglobina, profilina, ubiquitina, uteroglobulina y β-2-microglobulina;

Enzimas e inhibidores tales como plasminógeno, lisozima, cistatina C, alfa-1-antitripsina e inhibidor de tripsina pancreática. El plasminógeno es el precursor inactivo del plasmino de serina proteasa tipo tripsina. Se encuentran normalmente circulando en el torrente sanguíneo. Cuando el plasminógeno se vuelve activo y se convierte en plasmina, despliegua un dominio enzimático potente que disuelve las fibras de fibrinógeno que enreda las células sanguíneas en un coágulo de sangre. Esto se llama fibrinólidis.

Proteínas del sistema immune, tales como IgE, IgG, IgM.

Proteínas transportadoras tales como proteína de enlace de retinol, α-1 microglobulina.

Defensinas tales como beta-defensina 1, defensinas de neutrófilo 1, 2 y 3.

Las proteínas encontradas en la barrera cerebral sanguínea o en tejidos neurales, tales como el receptor de melanocortina, mielina, transportador de ascorbato.

Proteínas de fusión del agente neurofarmacéutico de ligando específico al receptor de transferrina (ver US5977307); receptor de célula endotelial capilar cerebral, transferrina, receptor de transferrina, insulina, receptor del factor 1 de crecimiento del tipo insulina (IGF 1). factor 2 de crecimiento del tipo insulina (IGF 2), receptor de insulina.

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

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

Factor X de coagulación de la sangre

α1 tripsina

HNF 1α

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

Proteínas localizadas en el corazón Heart, por ejemplo HSP 27. Esta está asociada con la cardiomiopatía dilatada.

Proteínas localizada en la piel, por ejemplo queratina.

Porteínas específicas del hueso, tales como proteínas morfogénicas oseas (BMPs), que son un subconjunto de la superfamilia del factor β de crecimiento de transformación que demuestran actividad osteogénica. Ejemplos incluyen BMP-2, 4, 5, 6, 7 (también referida como proteína osteogénica (OP-1) y 8 (OP-2).

Proteínas específicas de tumos, incluyendo antígeno de trofoblasto humano, receptor de herceptina, receptor de estrógeno, catepsinas, pe catepsina B (encontrada en el hígado y el bazo).

Proteínas específicas de enfermedad, tales como antígenos expresados solamente en células T acitvadas: incluyendo

LAG-3 (gen de activación de linfocito), ligando de osteoprotegerina (OPGL) ver *Nature* **402**, 304-309; 1999, OX40 (un miembro de la familia del receptor TNF, expresado en células T activadas y la única molécula de célula T

coestimuladora conocida por ser específicamente sobre regulada en el tipo-I del virus de leucemia de célula T (células productoras de HTLV-I)) Ver *J Immunol.* 2000 Jul 1;165(I).263-70, Metaloproteasas (asociadas con artritis/cánceres), incluyendo Drosophila CG6512, paraplegina humana, FtsH humana, AFG3L2 humana, ftsH murina; factores de crecimiento angiogénicos, incluyendo factor de crecimiento de fibroblasto ácido (FGF-1), factor de crecimiento de fibroblasto básico (FGF-2), factor de crecimiento endotelias vascular / factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF), factor-alfa de crecimiento de tranformación (TGF a), factor alfa de necrosis de tumor (TNF-α), angiogenina, interleucina-3 (IL-3), interleucina-8 (IL-8), factor de crecimiento endotelial derivado de plaqueta (PD-ECGF), factor de crecimiento placentario (PlGF), factor-BB de crecimiento derivado de plaqueta midquina (PDGF), fractalquina.

Proteínas de tension (proteínas de choque térmico)

Las HSPs se encuentran normalmente intracelularmente. Cuando se encuentran extracelularmente, es un indicador que una célula a muerto y a derramado sus contenidos. Esta muerte celular no programada (necrosis) ocurre solamente, como un resultado de trauma, enfermedad o lesión y por lo tanto las HSPs extracelulares *in vivo*, desencadenan una respuesta del sistema inmune que combatirá la infección y enfermedad. Una dual específica que se enlaza a HSP extracelular puede ser localizada a un sitio de enfermedad.

Proteínas involucradas en el trasnporte de Fc

Receptor de Brambell (también conocido como FcRB):

Este receptor Fc tiene dos funciones, que son ambas potencialmente útiles para la liberación

Las funciones son

(1) El transporte de IgG de la madre al hijo a través de la placenta

(2) la protección de IgG de degradación prolongando así su vida media de IgG en suero. Se piensa que el receptor recicla IgG del endosoma.

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

Otras proteínas involucradas en el transporte de Fc incluyen el receptor Fc neonatal (FcRn) descrito en Gastinel et al , 1992, PNAS 89:638; y Roopenian et al., 2003 J. Immunol. 170:3528.

Los ligandos de acuerdo con la invención pueden ser diseñados para ser específicos para los objetivos anteriores sin requerir ningún aumento o aumentando la vida media *in vivo*. Por ejemplo, los ligandos de acuerdo con la invención pueden ser específicos para objetivos seleccionados de los anteriores que son específicos de tejido, permitiendo así el marcado específico de tejido del ligando específico dual, o un monómero de dAb que se enlaza a un objetivo terapéuticamente relevante específico de tejido, sin imortar cualquier aumento en la vida media, aunque esto se puede producir. Más aún, cuando el ligando o monómero de dAb marca el riñón o hígado, esto puede redirigir el ligando o monómero de dAb a una ruta de depuración alternativa *in vivo* (por ejemplo, el ligando puede ser dirigido lejos de la depuración del hígado a la depuración del riñón).

Los polipéptidos útiles para aumentar la vida media incluyen, pero no se limitan a aquellos mostrados en el Anexo I.

<u>Estabilidad de Proteasa Aumentada</u>

Una ventaja adicional de la presente invención es que los dAbs PEGilados y multímeros de dAb descritos aquí poseen estabilidad aumentada a la acción de las proteasas. Dependiendo de las condiciones del ensayo, los dAbs son generalmente intrínsecamente estables a la acción de las proteasas. En la presencia de pepsina, sin embargo, muchos dAbs son totalmente degradados a pH 2 porque la proteína es desplegada bajo las condiciones ácidas, haciendo así a la proteína más accesible a la enzima proteasa. La presente invención provee moléculas de dAb PEGiladas, incluyendo multímeros de dAb, en donde se cree que el polímero de PEG provee

protección de la estructura del polipéptido debido al cubrimiento fçisico de la estructura por el polímero de PEG, evitando así que la proteasa gane acceso a la estructura del polipéptido y la clive. En una realización preferida, un dAb PEGılado que tiene un mayor tamaño hidrdinámico (p.e., 200 a 500 kDa) es generado de acuerdo con la invención, porque el mayor tamaño hidrodinámico confirmará un mayor nivel de protección de la degradación de proteasa qie im dAb PEGılado que tiene un menor tamaño hıdrodinámico. En una realización, un monómero o multímero de dominio variable sencillo de anticuerpo enlazado a polímero es degradado en no más del 10% cuando es expuesto a una o más de pepsina, tripsina, elastasa, quimotripsina, o carboxipeptidasa, en donde, sı la proteasa es pepsina, entonces la exposición se realiza a pH 2.0 por 30 minutos, y si la proteasa es una o más de tripsina, elastasa, quimotripsina, o carboxipeptidasa, entonces la exposición se realiza a pH 8.0 por 30 minutos. En una realización preferida, un monómero o multímero de dAb enlazado a otro polímero es degraded en no más del 10% cuando es expuesto a pepsina a pH 2.0 por 30 minutos, preferiblemente no más de 5%, y preferiblemente no se degrada de ninguna manera. En una realización preferida, un multímero de dAb enlazado a PEG u otro polímero (p.e., hetero u homodímero, trímero, tetrámero, octámero, etc.) de la invención es degradado en menos del 5%, y preferiblemente no es degradado de ninguna manera en la presencia de pepsina a pH 2.0 por 30 mınutos. En una realización preferıda, un monómero o multímero de dAb enlazado a PEG u otro polímero es degradado en no más del 10% cuando es expuesto a tripsina, elastasa, quimotripsina, o carboxipeptidasa a pH 8.0 por 30 minutos, preferiblemente no más de 5%, y preferiblemente no se degrada de ninguna manera. En una realización preferida adicional, un multímero de dAb enlazado a PEG u otro polímero (p.e., hetero u homodímero, trímero, tetrámero, octámero, etc.) de la invención es degradado en menos del 5%, y preferiblemente no es degradado de ninguna manera en la presencia de tripsina, elastasa, quimotripsina, o carboxipeptidasa a pH 8.0 por 30 minutos.

Las relaciones relativas de proteasa: polipéptido de dominıo variable sencillo de anticuerpo pueden ser alteradas de acuerdo con la invención para alcanzar el nivel deseado de degradación como se describió anteiormente. Por ejemplo, la relación de proteasa a dominio variable sencillo de anticuerpo puede ser de aproximadamente 1:30, a aproximadamente 10:40, a aproxımadamente 20:50, a aproxımadamente 30:50, aproxımadamente 40:50,

aproximadamente 50:50, aproximadamente 50:40, aproximadamente 50:30, aproximadamente 50:20, aproximadamente 50:10, aproximadamente 50: 1, aproximadamente 40:1, y aproximadamente 30:1.

En consecuencia, la presente invención provee un método para disminuir la degradación de un dominio variable sencillo de anticuerpo que comprende enlazar un monómero o multímero de dominio variable sencillo de anticuerpo a un polímero de PEG de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas aquí. De acuerdo con este aspecto de la invención, el dominio variable sencillo de anticuerpo es degradado en no más del 10% en la presencia de pepsina a pH 2.0 por 30 minutos. En particular, un multímero de dAb enlazado a PEG es degradado en no más del 5%, y preferiblemente no se degrada de ninguna manera en la presencia de pepsina a pH 2 0 por 30 minutos En una realización alterna, el dominio variable sencillo de anticuerpo es degradado en no más del 10% cuando es expuesto a tripsina, elastasa, quimotripsina, o carboxipeptidasa a pH 8.0 por 30 minutos, preferiblemente no más del 5%, y preferiblemente no se degrada de ninguna manera.

La degradación de los monómeros y multímeros de dAb enlazados a PEG de acuerdo con la invención se puede medir usando métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, siguiendo la incubación de un dAb enlazado a PEG con pepsina a pH 2.0 por 30 minutos, o con tripsina, elastasa, quimotripsina, o carboxipeptidasa a pH 8.0 por 30 minutos, las muestras de dAb pueden ser analizadas mediante filtración con gel, en donde la degradación del monómero o multímero de dAb es evidenciada por una banda de gel de un peso molecular menor que un dAb no degradado (p.e., dAb de control no tratado con pepsina, tripsina, quimotripsina, elastasa, o carboxipeptidasa). El peso molecular de las bandas de dAb sobre el gel puede ser determinado comparando la migración de la banda con la migración de una escalera de peso molecular (ver Figura 5). Otros métodos para medir la degradación de proteína son conocidos en la técnica y pueden ser adaptados para evaluar los monómeros y multímeros de dAb enlazados a PEG de la presente invención.

Composiciones Farmacéuticas, Dosis y Administración

Los polipéptidos de anticuerpo de la invención pueden ser incorporados en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa aquí, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" excluye medio de cultivo de tejido que comprende suero bovino o de caballo. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o mas de agua, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, sera preferable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Sustancias farmacéuticamente aceptables incluyen cantidades menores de sustancias auxiliaries tales como agentes humectantes o emulsificantes, preservantes o amortiguadores, que mejoran la vida de conservación o efectividad del polipéptido de anticuerpo.

Las composiciones como se describen aquí pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosis líquidas, semi-sólidas o sólidas, tales como soluciones líquidas (p.e., soluciones inyectables y para infusión), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo destinado de administración y la aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en la forma de soluciones inyectables o para infusión, tales como las composiciones similares a las usadas para inmunización pasiva de humanos con otros anticuerpos. El modo de administración preferido es parenteral (p.e., intravenoso, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular).

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición

puede ser formulada como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordendada adecuada para alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles pueden ser preparadas incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anterioremente, según se requiera, seguida por la esterilización por filtración. Genralmente, las dispersions se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada esterilizada de la misma. El fluidez apropiada de una solución puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión, y mediante el uso de surfactantes.

Los polipéptidos de anticuerpo descritos aquí se pueden administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo preferido de administración es inyección o infusión intravenosa. El polipéptido también puede ser administrado mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Como lo apreciará el técnico experto, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede ser preparado con un vehículo que protegerá al compuesto contra liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de liberación microencapsulada. Los dominios variables de inmunoglobulina sencillos y otros polipéptidos de anticuerpo monovalentes relativamente pequeños bien adecuadas para la formulación como preparaciones de liberación extendida debido, en parte, a su tamaño pequeño – el número de moles por dosis puede ser signidifcativamente mayor que la dosis de, por ejemplo, anticuerpos de tamaño total. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilen vinil acetato, polianhídridos,

ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser producida incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Ver, p.e., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Métodos adicionales aplicables a la liberación controlada o extendida de agentes de polipéptido tales como los polipéptidos de anticuerpo monovalentes revelados aquí se describen, por ejemplo, en las Patentes U.S. Nos. 6,306,406 y 6,346,274, así como, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente U.S. Nos. US20020182254 y US20020051808, todas incorporadas aquí por referencia.

En ciertas realizaciones, un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente puede ser administrado oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si de desea) también pueden ser adjuntados en una cápsula de gelativa dura o blanda, comprimidos en tabletas, o incorporados directamente a la dieta del individuo. Para administración terapéutica oral, los compuestos pueden ser incorporados con excipientes y usado en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elícires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto de la invención or una administración diferente a la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con un material para evitar su inactivación.

Compuestos activos adicionales también pueden ser incorporados en las composiciones. En ciertas realizaciones, un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente es coformulado con y/o coadministrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente puede ser coformulado y/o coadministrado con uno o más más anticuerpos adicionales que enlazan otros objetivos (p.e., anticuerpos que enlazan otras citocinas o que enlazan moléculas de superficie celular), o, por ejemplo, una o más citocinas. Tales terapias de combinación pueden usar menores dosis de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diferentes monoterapias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosis y por períodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido de anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y pero del individuo, y la habilidad del polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la cual cualquier efecto tóxico o en detrimento del anticuerpo o porción de anticuerpo es superada por los por los efectos benéficos terapéuticos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosi y por períodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como la dosis profiláctica se usa en sujetos antes o en cualquier estado de enfermedad temprano, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los regímenes de dosis pueden ser ajustados para proveer la respuesta deseada óptima (p.e., una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, un solo bolo puede ser administado, varias dosis divididas pueden ser administradas en el tiempo o la dosis puede ser reducida o aumentada proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es conveniente formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosis para facilidad de adminimistración y uniformidad de dosis. Forma de unidad de dosis como se usa aquí, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos mamíferos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

Un rango no limitante para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente es 0.1-20 mg/kg, más preferiblemente 1-10 mg/kg. También se notará que los valores de dosis pueden variar con el tipo y la severidad de la condición a ser aliviada. También se entenderá que para cualquier sujeto

particular, se deben ajustar regímenes de dosis específicos durante el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesiona del médico que lo administra.

La eficacia del tratamiento con un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente como se describe aquí, es juzgada por el médico experto con base en el mejoramiento en uno o más síntomas o indicadores del estado de enfermedad o trastorno que es tratado. Un mejoramiento de al menos 10% (aumento o descenso, dependiendo del indicador que es medido) en uno o más indicadores clínicos se considera "tratamiento efectivo", aunque se prefieren mejoramientos mayores, tales como 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90%, o incluso 100%, o, dependiendo del indicador que es medido, más del 100% (p e., dos veces, tres veces, diez veces, etc., hasta, e incluyendo el logro de un estado libre de enfermedad. Los indicadores pueden ser medidas físicas, p.e., niveles de enzima, citocina, factor de crecimiento o metabolito, velocidad de crecimiento celular o muerte celular, o la presencia o cantidad de células anormales. También se puede medir, por ejemplo, diferencias en la cantidad de tiempo entre empeoramiento de síntomas de la enfermedad o trastorno (p.e., para enfermedades remitentes/recurrentes, tales como esclerosis múltiple). Alternativamente, se pueden basar en medidas no físicas, tales como una reducción reportada del dolor o incomodidas u otro indicador de estado de enfermedad para medir la efectividad del tratamiento. Cuando se tman medidas no físicas, se pueden usar varias escalas o indices clínicamente aceptables, por ejemplo, el índice de Actividad de Enfermedad de Crohn, o CDAI (Best et al , 1976, Gastroenterology 70: 439), que combina indicadores físicos, tales como hematrocrito y el número de heces líquidas o muy blandas, entre otras, con factores reportados por el paciente tales como la severidad del dolor abdominal o espasmo y bienestar general, para asignar un puntaje de enfermedad.

Como se usa aquí, el término "profilaxis" realizado usando una composición como se describe aquí, es "efectivo" si la aparición o severidad de uno o más síntomas es retardado o reducido en al menos 10%, o abolido, con relación a tales síntomas en un individuo similar (modelo humano o animal) no tratado con la composición.

Mientras que los polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L monovalentes descritos aquí deben enlazar CD40L humano, cuando se evaluan sus efectos en un sistema de modelo animal, el polipéptido debe reaccionar cruzadamente con uno o más antígenos en el sistema de modelo animal, preferiblemente con alta afinidad. El expero en la técnica puede determinar fácilmente si esta condición es satisfecha para un sistema de modelo animal dado, y un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente dado. Si esta condición es satisfecha, la eficacia del polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente puede ser examinada administrandola a un modelo animal bajo condiciones que imitan un estado de enfermedad y monitoreando uno o más indicadores de estado de enfermedad para al menos un mejoramiento del 10%.

Modelos Animales:

Los polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L monovalentes como se describen aquí, son útiles para el tratamiento de trastornos autoinmunes en los cuales la señalización de CD40/CD40L está inapropiadamente activa. Existen varios modelos animales en los cuales se puede evaluar la eficacia de un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente dado, como se discute más adelante.

Lupus Eritematoso Sistémico (SLE):

El tratamiento con anticuerpo anti-CD40L previene el desarrollo de nefritis tipo lupus en ratones NZB/NZW y SNF1 SLE. El tratamiento de ratones SNF1 con anticuerpo anti-CD40L revierte la nefritis establecida y conserva la función renal. Ver, p.e., Mohan et al., 1995, J. Immunol. 154: 1470-1480; Early et al., 1996, J Immunol. 157: 3159-3164; Railed et al., 1998, J..Immunol. 160. 2158-2165, y Chess, 2001, "Blockade of the CD40L/CD40 Pathway," in Therapeutic Immunology 2a Edición, Austen, Burakof, Rosen and Strom, Eds., Blackwell Sciences (Pubs.), pp 441-456.

Esclerosis Múltiple:

El bloqueo específico de CD40L al momento de la inmunización suprime marcadamente la incidencia, mortalidad, día de aparición, y puntajes clínicos

de la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) en ratones B10P1L y ratones (PLJ x SJL)F1 inducidos ya se a por proteína básica de mielina o antígenos de mielina PLP. Ver, por ejemplo, Gerritse, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 2494; Grewal et al., 1996, Science 273: 186; Laman et al., 1998, Mult. Scler. 4: 14; y Chess, 2001, supra.

Artritis Reumatoide:

Anti-CD40L bloquea el desarrollo de la inflamación de articulación, títulos de anticuerpo en suero a colágeno, la infiltración de células inflamatorias en el tejido sinovial, y la erosión de cartílago y hueso en la artritis inducida por colágeno. Ver, p.e., Durie et al., 1993, Science 261: 132; y Chess, 2001, supra.

Modelos de Diabetes Tipo I dependiente de Insulina:

El ratón diabético no obeso (NOD) desarrolla espontáneamente la diabetes inmune dependiente de célula T. El tratamiento con anticuerpo anti-CD40L monoclonal tratamiento de hembras NOD de 3 a 4 semana de edad (la edad en la cual típicamente empieza la insulitis) evitó completamente la insulitis y la diabetes. El análisis de citocina reveló un descenso dramático en la liberación IFN-g e IL-2 son un aumento concomitatnte en la producción de IL-4 por células T de ratones tratados con anti-CD40L. Ver, p.e., Balasa et al., 1997, J. Immunol. 159: 1420; y Chess, 2001, supra.

Inhibición de Rechazo de Trasplante de Aloinjerto y Xenoinjerto:

Anti-CD40L evita el desarrollo del rechazo renal de injertos totalmente alogenéicos en ratones Más aún, la supervivencia de aloinjertos trasplantados en monos rehsus nefrectomizados es típicamente prolongada por la terapia con anti-CD40L sola. Igualmente, la terapua con anti-CD40L ha evitado el rechazo de injerto de puel, células islotes y trasplantes cardiacos así como GVHD en roedores. Ver, p.e., Kirk et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 8789-8794; Parker et al., 1995, Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 9560; Larsen et al., 1996, Transplantation 61 : 4; y Chess, 2001, supra.

Usos de Polipéptidos de anticuerpo Anti-CD40L monovalentes

Los polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L como se describen aquí, son útiles para el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos en los cuales está involucrada la activación inapropiada de la ruta mediada por CD40L/CD40. En particular, las enfermedades inmunes involucran frecuentemente la regulación o actividad inapropiada de las rutas de CD40L/CD40. La administración de un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L como se describe aquí a un individuo que sufre de una enfermedad, puede reducir uno o más síntomas de la enfermedad. Ejemplos no limitantes de enfermedades par alas cuales los polipéptidos de anticuerpo descritos aquí pueden ser terapéuticamente útiles incluyen Lupus Eritematoso Sistémico (SLE), Purpura trombocitopénico idiopático (ITP), rechazo de trasplante, enfermedad de Crohn, Enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), colitis, asma/alergia, aterosclerosis, Miastenia grave, respuesta inmune a productos de fármaco recombinante, p.e., factor VII en hemofilia, Esclerosis Múltiple, Psoriasis, Artritis Reumatoide, Espondilitis anquilosante, Enfermedad Cardiaca coronaria, y Diabetes, incluyendo Diabetes Tipo 1 y/o Tipo 2

Los polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L descritos aquí son adicionalmente útiles en la forma en que generalmente cualquier preparación de anticuerpo es útil, p.e., para usos de representación gráfica o diagnóstico in vivo, usos de diagnóstico in vitro, etc. Para estos y otros usos puede ser deseable marcar los polipéptidos de anticuerpo anti-CD40L, p.e., con una etiqueta fluorescente, colorimétrica, enzimática o radioactiva. Los métodos para etiquetar polipéptidos de anticuerpo son bien conocidos en la técnica.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Biotinilación de CD40L Recombinante

Se biotiniló CD40L recombinante humano soluble (PeproTech) y se utilizó durante las selecciones de fago. Los reactivos, equipos y fuentes a partir de las cuales están disponibles se proporcionan en la Tabla 1.

Se desarrolló la biotinilación de CD40L mediante la incubación de CD40L (0.5mg/ml) con EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin [Sulfosuccinimidil-6-

(biotinamido)hexanoato] (Pierce) a una proporción molar de 5:1 sobre hielo durante 2 horas de acuerdo con las instrucciones del producto. Posteriormente se sometió a diálisis la mezcla de reacción de biotinilación contra 3 intercambios de PBS (1000 x volumen de muestra) en un Casete de Diálisis Slide-A-Lyzer® a 4°C para remover el reactivo de biotinilación no incorporado.

Se evaluó el CD40L biotinilado mediante ensayo de enlace a receptor para enlace a CD40/Fc para confirmar su actividad biológica. También se monitoreó la calidad de la biotina-CD40L mediante análisis en un gel NuPaGE 4-12% Bis-Tris y se detectó mediante Simply Blue Safe-Stain (Tinción Segura Azul Simplemente) (Invitrogen) (Figura 1a), y western-blotting (manchado hacia el oeste) mediante sondeo con Estreptavidina-HRP (Figura 1b). Se analizó adicionalmente el CD40L biotinilado mediante espectrometría de masas con la mayoría de las sub-unidades de CD40L conteniendo 1 o 2 mitades de biotina (datos no mostrados).

Tabla 1.

Equipo/Reactivo	**Proveedor sugerido o requerido**
Ligando CD40 recombinante humano soluble / TRAP	PeproTech, No de Cat 310-02
	Reconstituido en fosfato de sodio 5 mM, pH 5 0 hasta una concentración de 0 5 mg/ml
EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotina	Pierce, No de Cat 21335
Casete de Diálisis Slide-A-Lyzer®	Pierce, No de Cat 66110
Quimera CD40 recombinante humana/ Fc	R&D Systems, No de Cat 1493-CD
Gel NuPAGE® 4-12% Bis-Tris	Invitrogen life technologies Ltd
	No de Cat NP0322
Estreptavidina-HRP	Amersham Biosciences
	No de Cat 1231V
Invitrogen™ Simply Blue Safe-stain (Tinción Segura Azul Simplemente)	Invitrogen No de Cat LC6065

Ejemplo 2. Selecciones de Fago utilizando Antígeno Biotinilado

Las bibliotecas de Anticuerpo de Dominio (dAb) se basan en un marco humano sencillo para el V_H (DP47 y JH4b) y para el VK (DPK9 y JK1) con diversidad de cadena lateral incorporada en posiciones en el sitio de enlace de antígeno que hace contacto con el antígeno en estructuras moleculares conocidas y residuos reflejos diversificados en el repertorio de anticuerpo humano. Los anticuerpos se despliegan como proteínas de fusión enlazadas

covalentemente al extremo N – terminal de la proteína pIII fago Fd, utilizando el vector fago pDOM4 (Fd- Tet) que codifica el genoma del fago Fd con expresión dAb bajo el control del promotor del gen-III. El casete dAb consiste de (5' a 3'): secuencia líder eucariótica, dAb, etiqueta myc, gIII. El vector contiene ambos orígenes de replicación *M13* y *colE1* y es seleccionable utilizando tetraciclina. Cada una de las bibliotecas V_H y V_K tiene un tamaño calculado de por encima de $1x10^{10}$ moléculas. Los reactivos, equipos y fuentes a partir de las cuales están disponibles se proporcionan en la Tabla 2.

Se incubaron aproximadamente $1x10^{11}$ fagos a partir de cada una de las bibliotecas Domantis dAb en un volumen final de 1 ml de PBS que contiene Marvel™ al 2% a temperatura ambiente durante 1 h. Se adicionó el antígeno biotinilado al fago bloqueado de tal forma que la mezcla de fago antígeno tiene una concentración final de Marvel™ al 2% en PBS. La concentración de antígeno utilizada para la primera ronda de selección fue de 60 nM; se disminuyó la concentración antígeno hasta 6 nM para la ronda 2, y hasta 0.6 nM para la ronda 3. Se incubó la mezcla antígeno/fago durante 1 h a temperatura ambiente con rotación a ~40 rpm.

Para cada selección, se prepararon 100 µl de perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynal Biotech) por medio de lavado una vez en 1 ml de PBS que contiene Tween-20 al 0.1% seguido por un segundo lavado en 1 ml de PBS. Posteriormente se bloquearon las perlas en 1 ml de PBS que contiene Marvel™ al 2% en un tubo eppendorf de 2 ml a temperatura ambiente sobre una rueda rotatoria durante 1 h.

Se colocó el tubo que contiene las perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina bloqueadas dentro de un soporte magnético, facilitando la captura de las perlas magnéticas. Se removió el sobrenadante y se resuspendieron las perlas en la mezcla antígeno/fago. Se rotó ésta mezcla durante 10 min para permitir la captura de perla de los complejos fago/antígeno.

Las perlas se capturaron utilizando un soporte magnético y se lavaron repetidamente 19 veces utilizando 1 ml de PBS que contiene Tween-20 al 0.1%, seguido por un lavado final de 1 ml de PBS. Se cambiaron los tubos

eppendorf siguiendo los pasos de lavado 3, 9, 15 y 19 para minimizar el sobrante de fago de fondo.

Posteriormente se recapturan las perlas lavadas y se remueve toda la solución de lavado. Los fagos se eluyeron a través de resuspensión en 500 µl de solución de tripsina (50 µl de solución patrón de tripsina 10 mg/ml añadida a 450 µl de PBS, recientemente diluido) y se rotó durante 10 min a temperatura ambiente. Se recuperaron los fagos eluídos mediante la captura de las perlas utilizando el soporte magnético y se recuperó el líquido que contiene el fago eluído. Se utilizaron los fagos para infectar *E. coli* TG1 para preparar fago para una ronda de selección adicional.

Se mezclaron los fagos eluídos (250 µl) con 1.75 ml de *E. coli* TG1 fase log (OD_{600} entre 0.3 y 0 6) y se permitió que ocurriera la infección durante 30 min a 37°C sin agitación. Se centrifugó el cultivo infectado de *E. coli* TG1 a 11,600 g en una micro centrífuga durante 1 min a temperatura ambiente. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron en 100 µl de 2xTY y se plaquearon sobre placas regulares de 9 cm de diámetro que contienen TYE complementado con tetraciclina 15 µg/ml. Las placas crecieron a 37°C durante la noche.

Después del crecimiento durante la noche, se adicionaron 2 ml de 2xTY que contiene glicerol al 15% a las placas de cultivo y células se aflojaron con un esparcidor, asegurando que las células se mezclaron a fondo. Se recuperaron dos millilitros del cultivo mediante pipeteado dentro de un crio-vial, a partir del cual se utilizaron 50 µl para inocular 50 ml del 2xTY complementado con tetraciclina 15 µg/ml. Las células remanentes en el crio-vial se almacenaron a -80°C.

El cultivo de 50 ml creció a 37°C durante 16 a 24 horas con agitación a 250 rpm.

Después del crecimiento durante la noche, se centrifugó el cultivo a 3,300 g durante 15 min para sedimentar la bacteria. Posteriormente se precipitaron los fagos del sobrenadante a través de la adición de 10 ml de PEG/NaCl a 40 ml de sobrenadante aclarado. Se mezcló la solución fago/PEG

y se incubó sobre hielo durante al menos 1 h. Para sedimentar el fago, se centrifugó la solución a 3,300 g durante 30 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se removió cualquier sobrenadante restante mediante aspiración.

El sedimento de fago resultante se resuspendió en 2 ml de PBS y se centrifugó a 11,600 g durante 10 min en una micro centrífuga para remover cualquier deshecho bacterial remanente. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.45 µm (Sartorius, Minisart). La solución de fago resuspendida se utilizó para la siguiente ronda de selección.

Tabla 2

Equipo/reactivo	**Proveedor sugerido o requerido**	**Ajuste del instrumento, preparación del reactivo**
Dynabeads® M-280 Streptvidin (Prod No 112 05)	Dynal Biotech UK 11 Bassendale Road, Croft Business Park, Bromborough, Wirral CH62 3QL UK	Resuspendido a fondo a través de pipeteado repetido
Tween 20	Sigma Chemical Company Ltd	0 1% en PBS
Leche en polvo descremada seca 99 5%	Marvel™ (marcas premier) de los supermercados	2% en PBS (preparar fresco y no almacenar)
Tripsina (T-8642) Tipo XIII de Pancreas Bovino	Sigma Chemical Company Ltd Fancy Road Dorset BH17 7NH U K Tel +44 1202 733114 Fax +44 1202 715460	hecho en Tris-HCl 50 mM pH 7 4, $CaCl_2$ 1 mM y almacenado a -20°C *La solución patrón de tripsina puede almacenarse alicuotada a -20 °C para evitar autoproteólisis*
PEG/NaCl	Sigma Chemical Company Ltd	Polietilenglicol 8000 20% [conocido formalmente como 6000], NaCl 2 5 M preenfriado a 4°C
Dynal MPC-S concentrador de particula magnética (Prod No 120 20)	Dynal Biotech UK 11 Bassendale Road, Croft Business Park, Bromborough, Wirral CH62 3QL UK	
2xTY		16 g de Triptona, 10 g de extracto de levadura y 5g de NaCl en 1 litro Autoclave (121°C, 15 min) y almacenar a TA

Ejemplo 3: <u>Clonación de Salidas de Selección de Fago Enriquecido dentro del Vector de Expresión dAb Soluble pDOM5</u>

Después de la segunda y tercera rondas de selección, se obtuvieron células de *E. coli* infectadas con el dAb enriquecido que exhibe poblaciones de

fago fd. Se utilizó una alícuota de estas células para preparar ADN de fago y los genes V enriquecidos se cortaron mediante digestión utilizando las endonucleasas de restricción, *Sal*I y *Not*I. Los genes V purificados se ligaron en los sitios correspondientes de pDOM5 (vector de expresión derivado de pUC119 con promotor LacZ, líder eucariótico, sitio de clonación dAb, etiqueta myc), y se utilizó el ADN ligado para electro-transformar las células de *E. coli* HB2151 que crecieron durante la noche sobre placas de agar que contienen el antibiótico carbenicilina. Se indujeron las colonias resultantes para expresar la proteína dAb bien sea como microcultivos de 200 µl o cultivos de 50 ml. Se analizó el dAb resultante para actividad inhibitoria utilizando el ensayo de enlace a receptor CD40L

Después de la selección del fago, se purificó el ADN de pDOM4 a partir del sedimento celular obtenido a partir de un cultivo de *E. coli* durante la noche de 50 ml utilizando el kit de purificación de ADN QIAfilter Plasmid Midi de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cortaron los genes dAb del vector pDOM4 mezclando: 10 µl de solución amortiguadora de *Sal*I 10x; 1 µl de BSA 100x; 20 µg de fragmento de ADN purificado; 2.5 µl de enzima de *Sal*I (10 U/µl); 2.5 µl de enzima de *Not*I (10 U/µl); se hizo la mezcla de digestión hasta un volumen final de 100 µl utilizando agua estéril. Se incubó la mezcla de digestión durante 5 horas a 37°C.

Las muestras de ADN sometidas a digestión se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa al 1.5% y se recortó la banda correspondiente a los genes V de dAb (~324 pb a 372 pb) del gel. Se purificó el ADN del gen de dAb a partir de la tajada de gel utilizando el kit de Extracción de Gel QIAquick de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se sometió a digestión el vector de expresión pDOM5 con *Sal*I y *Not*I tal como sigue: 10 µl de solución amortiguadora de *Sal*I 10x; 1 µl de BSA 100x; 20 µg de pDOM5 plásmido; 1.5 µl de enzima de *Sal*I (10 U/µl); 1.5 µl de enzima de *Not*I (10 U/µl); se hizo la mezcla de digestión hasta un volumen final de 100 µl utilizando agua estéril. Se incubó la mezcla de digestión durante 2 horas a 37°C Se purificó el fragmento de vector sometido a digestión utilizando el kit de Purificación QIAquick PCR.

Se ligaron los genes de pDOM5 sometidos a digestión y de dAb sometidos a digestión mezclando: 2 µl de solución amortiguadora de T4 ADN ligasa 10x; 400 ng de vector pDOM5 sometido a digestión; 100 ng de genes de dAb sometidos a digestión; 1 µl de T4 ADN ligasa (400 U/µl); se realizó la mezcla de ligación hasta 20 µl con agua estéril. Se incubaron las mezclas de ligación durante 2 horas a 25°C.

Se transfirieron dos microlitros de la mezcla de ligación al fondo de una cubeta de electroporación de 0.2 cm pre-enfriada (sobre hielo) a la cual se adicionaron 100 µl de células *E. coli* HB2151 electrocompetentes Se incubó la mezcla ADN / célula sobre hielo durante 1-2 min, posteriormente se sometió a electroporación a 2.5 kV (25 µF, 200 Ω). Se adicionó inmediatamente un mililitro de 2xTY a la cubeta y se resuspendieron las células suavemente. Se transfirieron las células resuspendidas a un tubo de cultivo desechable de 14 ml y se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación a 250 rpm. Se plaquearon diluciones de las células desde 10^{-0} hasta 10^{-3} sobre placas regulares de 9 cm de diámetro que contienen TYE complementado con glucosa al 5% y carbenicilina 50 µg/ml. Se incubaron las células durante la noche a 37°C en una posición invertida. Los reactivos, equipos y fuentes a partir de las cuales están disponibles se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 3

Equipo/reactivo	**Proveedor sugerido o requerido**	**Ajuste del instrumento, preparación del reactivo**
Kit de purificación de ADN QIAfilter Plasmid Midi	Qiagen Ltd No de cat 12143	Suministrado como el kit
Endonucleasa de restricción *Sal*I + solución amortiguadora *Sal*I 10X	New England Biolabs Cat No R0138S	
Endonucleasa de restricción *Not*I + Solución amortiguadora *Not*I 10X + BSA 100X	New England Biolabs Cat No R0189S	
Kit de Extracción de Gel QIAquick	Qiagen Ltd Cat No 28703	Suministrado como el kit
Plásmido de Expresión pDOM5		
T4 ADN Ligasa + solución amortiguadora de T4 ADN ligasa	New England Biolabs Cat No M0202L	La solución amortiguadora de T4 ADN ligasa debe ser almacenada alicuotada a -20°C Se debe evitar el congelamiento-descongelamiento repetido para minimizar la hidrólisis de ATP en la solución amortiguadora

Ejemplo 4. Expresión de Micropozo de dAbs solubles

Después de la clonación de las salidas de fago dAb seleccionadas dentro de pDOM5, se inocularon colonias bacterianas individuales como cultivos de micropozo y se indujeron utilizando IPTG para expresar la proteína dAb la cual se analizó para actividad inhibitoria utilizando el ensayo de enlace al receptor CD40L. Los reactivos, equipos y fuentes a partir de las cuales están disponibles se proporcionan en la Tabla 4.

Se escogieron cuidadosamente las colonias bacterianas individuales para asegurar que se evita la contaminación a partir de colonias circundantes. Las colonias escogidas se utilizaron para inocular placas de cultivo celular de 96 pozos que contienen 100 µl por pozo de 2xTY complementado con glucosa al 5% y carbenicilina 50 µg/ml. Se colocaron las tapas sobre las placas de cultivo celular las cuales se incubaron durante la noche en un agitador orbital HiGro (GeneMachines, 935 Washington St, San Carlos, CA 94070, USA) bajo una atmósfera humedecida a 37°C con agitación a 450 rpm (diámetro de agitación orbital 4 mm), con gas (30% O_2 + 70% N_2) pulsado durante 10 segundos cada 5 minutos a una velocidad de flujo de 5 SLPM (litros por minuto estándar). [Estas placas son referidas como las Placas Maestras]

Después del crecimiento durante la noche, se utilizó un dispositivo de transferencia de 96 pozos para transferir entre 1-5 µl del cultivo bacteriano dentro de una placa de cultivo de 96 pozos fresca que contiene 100 µl por pozo de 2xTY complementado con glucosa al 0.1% y carbenicilina 50 µg/ml.

Se incubaron las placas frescamente inoculadas a 37°C durante 3 a 4 h (agitación a 450 rpm, gas (30% O_2 + 70% N_2) pulsadas durante 10 segundos cada 5 minutos a una velocidad de flujo de 5 SLPM) hasta que el cultivo OD_{600} alcanzó aproximadamente 1 0. Posteriormente se indujeron los cultivos mediante la adición de 100 µl por pozo de 2xTY que contiene carbenicilina 50 µg/ml e IPTG 2 mM (concentración final de IPTG de 1 mM) y se incubaron durante la noche a 30°C con agitación a 450 rpm, con gas (30% O_2 + 70% N_2) pulsados durante 10 segundos cada 5 minutos a una velocidad de flujo de 5 SLPM. [Estas placas son referidas como Placas de Inducción].

Se prepararon las soluciones patrón de glicerol de las Placas Maestras originales mediante la adición de 100 µl por pozo de 2xTY que contiene glicerol estéril al 50%. Estas placas se almacenaron a -80°C.

Después de la incubación durante la noche de las Placas de Inducción, se sedimentaron las células bacterianas mediante centrifugación a 1,800 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante (que contiene dAb expresado) se analizó posteriormente para determinar si los dAbs eran capaces de inhibir el enlace de CD40L a la fusión CD40-Fc en un ensayo de enlace al receptor.

Tabla 4

Equipo/reactivo	**Proveedor sugerido o requerido**	**Ajuste del instrumento, preparación del reactivo**
Racimo de Cultivo celular de 96 pozos con borde redondo y tapa, No pirogénico, poliestireno	Corning Incorporated, Costar Número 3799	
2xTY		16 g de Triptona, 10 g de Extracto de Levadura y 5 g de NaCl en 1 litro Autoclave (121°C, 15 min) y almacenada a TA

Ejemplo 5. Expresión de dAb en *E. coli* a 50 ml

Para generar cantidades más grandes de proteína dAb para análisis, se utilizaron cultivos de 50 ml para inducción. Se inoculó una colonia sencilla del dAb deseado (por ejemplo DOM-24) crecida en placas TYE en 10 ml de 2xTY complementado con glucosa al 5% y carbenicilina 50 µg/ml en un tubo universal de 30 ml y creció durante la noche a 37°C con agitación a 250 rpm. Se adicionaron quinientos microlitros del cultivo de durante la noche en 50 ml de 2xTY complementado con glucosa al 0.1% y carbenicilina 50 µg/ml y crecieron a 37°C con agitación a 250 rpm. Se monitoreó el OD_{600} del cultivo regularmente en comparación con 2xTY estéril y a un OD_{600} de 0.9 se indujo el cultivo mediante la adición de IPTG 1 M hasta una concentración final de 1 mM. Se incubó el cultivo inoculado a 30°C con agitación a 250 rpm durante la noche. Al día siguiente, el cultivo se centrifugó a 6000 g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante aclarado se mezcló con 100 µl de línea de flujo de proteína-A o proteína-L agarosa (pre-lavado con $MgSO_4$ 5 mM) durante la noche a 4°C.

Posteriormente se centrifugó la mezcla sobrenadante/perla a 180 g a 4°C durante 2 minutos. El sobrenadante se decantó y las perlas retenidas se lavaron con 10 ml de PBS que contiene NaCl 0.5M. La solución de perla se transfirió dentro de un placa filtrante Whatman de 96 pozos y las perlas se lavaron una vez con 400 µl de PBS que contiene NaCl 0.5M, posteriormente una vez con 400 µl de PBS, seguido por centrifugación durante 2 minutos a 180 g después de cada paso de lavado. Se eluyó la proteína dAb utilizando 70 µl de glicina 0.1 M (pH 2.0) y la solución se neutralizó mediante la adición de 40 µl de Tris-HCl 1 M (pH 8.0) Se determinó la concentración de dAb purificada mediante OD_{280}.

Los reactivos, equipos y fuentes a partir de las cuales están disponibles se proporcionan en la Tabla 5

Tabla 5

Equipo/reactivo	Proveedor sugerido o requerido	Ajuste del instrumento, preparación del reactivo
TYE		1 5 g de Bacto-Agar, 8 g de NaCl, 10 g de Triptona, 5g de Extracto de Levadura en 1 litro de agua. Autoclave (121°C, 15 min) y almacenamiento a TA
2xTY		16 g de Triptona, 10 g de Extracto de Levadura y 5 g NaCl en 1 litro Autoclave (121°C, 15 min) y almacenamiento a TA
IPTG 1 M		solución patrón hecha en agua MQ se filtra estéril a través de filtros de 0 22 µM y se almacena en alícuotas a – 20°C
Carbenicilina		solución patrón 50 mg/ml hecha en agua, filtro 0 2 µm estenlizado y se almacena en alícuotas a – 20°C
Solución de glucosa al 40%		filtro 0 2 µm estenlizado, almacenar a TA
$MgSO_4$ 5 mM		preparar fresco a partir de solución patrón 1M, filtro 0 2 µm estenlizado y almacenar a TA
NaCl/PBS 0 5M		Autoclave o filtro 0 2 µm estenlizado y almacenar a TA
Agarosa de proteina A	Sigma P3476	almacenar a 4°C
Agarosa de proteina L	Sigma P3351	almacenar a 4°C
Línea de Flujo de rProteína A	Amersham Biosciences, cat no 17-1281-02 (300ml)	almacenar a 4°C
Tris-HCl 1 M, pH 8 0		filtro 0 2 µm estenlizado o autoclave

	y almacenar a TA
Glicina 0 2 M, pH2 0	filtro 0 2 µm esterilizado o autoclave
	y almacenar a 4°C

Ejemplo 6: Ensayo de enlace al receptor CD40L

Se utilizó el ensayo de CD40L para medir el enlace de CD40L a CD40 y la capacidad de las entidades de enlace (por ejemplo, fragmentos de anticuerpo monovalente tales como un dAbs) para bloquear esta interacción, tal como se describe a continuación y se muestra esquemáticamente en la Figura 7. (Las proteínas solubles de R&D Systems son CD40/Fc = homodímero y CD40L = homotrímero).

Se recubrió una placa de ensayo de 96 pozos Nunc Maxisorp durante la noche a 4°C con 100 µl por pozo de CD40/Fc recombinante humana (R&D Systems) a 0.5 µg/ml en solución amortiguadora de carbonato. La placa se lavó 3 veces con 300 µl de Tween 0.05%/PBS y 3 veces con 300 µl de PBS utilizando un lavador de placa Tecan. Los pozos se bloquearon utilizando 200 µl de PBS que contienen BSA al 2% (p/v) y se incubaron durante un mínimo de 1 h a temperatura ambiente Los pozos se lavaron como anteriormente, posteriormente se añadieron 50 µl de proteína dAb purificada (o sobrenadante no purificado que contiene dAb a partir de una expresión de micro-cultivo) a cada pozo. También se adicionaron a cada pozo 50 µl de CD40L, a 6 ng/ml en diluyente (para una concentración final de 3 ng/ml), y la placa se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente.

La placa se lavó tal como se describió previamente y se adicionaron 100 µl de anticuerpo anti-CD40L biotinilado, 0.5 µg/ml en diluyente, y se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente La placa se lavó tal como se describió anteriormente, posteriormente se adicionaron 100 µl de anticuerpo anti-biotina HRP conjugado (dilución en diluyente 1:5000) a cada pozo y la placa se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. La placa se lavó nuevamente tal como se describió previamente utilizando un lavador de placa Tecan y se desarrolló el ensayo utilizando 100 µl de solución SureBlue 1-Component TMB MicroWell Peroxidase (la placa se dejó a temperatura ambiente por hasta 20 min). Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de ácido clorhídrico 1 M. Se ensayó el OD_{450nm} de la placa dentro de los 30 minutos de la adición del ácido.

El OD_{450nm} es proporcional a la cantidad de conjugado estreptavidina-HRP enlazado, por lo tanto entre mayor sea el grado de inhibición de dAb menor es el OD_{450nm} de la señal resultante. Los reactivos, equipos y fuentes a partir de las cuales están disponibles se proporcionan en la Tabla 6.

Controles

Se incluyeron los siguientes controles:

- 0 ng/ml de CD40L (solamente diluyente)
- 3 ng/ml de CD40L
- 3 ng/ml de CD40L con 1 µg/ml de anticuerpo anti-CD40L

Tabla 6

Equipo/reactivo	Proveedor sugerido o requerido (específico)	Preparación del reactivo
Inmunoplaca de 96 pozos Maxisorp F96	Nunc, Cat No 439454	
Solución amortiguadora de bicarbonato de sodio carbonato 0 2 M pH9 4	Pierce, Cat No 28382	Disolver 1 bolsita en 500 ml de agua desionizada y mantener la solución a 4°C
Quimera CD40/Fc recombinante humana	R&D Systems, Cat No 1493-CD	Solución patrón 50 µg/ml a -80°C
Solución amortiguadora de fosfato salina (PBS)	Sigma, Cat No P4417	Solución 10x 100 tabletas/L de agua
Solución amortiguadora de lavado		Tween-20 0 05%/PBS
Diluyente		BSA 0 1%, Tween-20 en PBS 0 05%
Bloqueador		BSA 2% en PBS
CD40L recombinante humano	R&D Systems, Cat No 617-CL	Solución patrón 50 µg/ml a -80°C
Anticuerpo anti-CD40L de neutralización	Calbiochem, Cat No 217595	Solución patrón 1 mg/ml a 4°C
Anticuerpo anti-CD40L biotinilatado	R&D Systems, Cat No BAF617	Solución patrón 50 µg/ml a -80°C
Conjugado anti-biotina-HRP	Stratech, Cat No. 200-032-096	Solución patron 800 µg/ml a 80°C, diluido 1 5000 en diluyente de anticuerpo Guardar solamente durante 1 semana
Sustrato de peroxidasa de micropozo SureBlue TMB 1-component	KPL, Cat No 52-00-00	a 4°C

Ejemplo 7: Resultados

Los datos de enlace al receptor para la mayoría de los inhibidores potentes se resumen en las Figuras 2, 3, y 4, y en Tabla 7, a continuación. La Tabla 8, a continuación, proporciona la secuencia de ADN y de aminoácido traducido de dAbs únicos identificados como que inhiben el enlace de CD40L a CD40 en el ensayo de enlace al receptor.

La Figura 2 muestra una lectura de un ensayo de enlace a receptor (RBA) de respuesta a dosis, analizando la inhibición del enlace de CD40L a CD40-Fc mediante dAbs DOM-10, -20, -27, -30, -31, -62, -77, titulado desde 1 µM hacia abajo hasta 10 pM. Los dAbs DOM-20, -30, y -31 son los más potentes, con valores de IC_{50} de aproximadamente 8 nM.

La Figura 3 muestra una lectura de ensayo de enlace a receptor de respuesta a dosis, analizando la inhibición del enlace de CD40L a CD40-Fc mediante dAbs DOM-4 y DOM-5, titulada desde 1 µM hacia abajo hasta 500 pM. Los valores de IC_{50} para dAbs DOM-5 y DOM-4 son aproximadamente 3 nM y 100 nM respectivamente.

La Figura 4 muestra una lectura de ensayo de enlace a receptor de respuesta a dosis, analizando la inhibición del enlace de CD40L a CD40-Fc mediante dAb DOM-24, titulado desde 100 nM hacia abajo hasta 0.5 pM. Los datos se ajustaron a la curva utilizando el software GraphPad Prism.

Tabla 7

Nombre del Clon	Tipo de dAb	IC_{50} (nM)
DOM-2	VH	800
DOM-4	VH	100
DOM-5	VH	3
DOM-7	VH	1500
DOM-8	VK	900
DOM-10	VH	50
DOM-20	VH	8
DOM-24	VH	0 417
DOM-27	VH	aprox 100
DOM-30	VH	8
DOM-31	VH	8
DOM-77	VH	40

Tabla 8. Resumen de dAbs que exhiben un rango de valores IC_{50} inhibidores de CD40L determinados usando el ensayo de enlace del receptor CD40L/CD40-Fc

La secuencia de ADN y de amino ácido traducido de dAbs únicos identificados en el ensayo de inhibición de enlace como inhibidores del enlace de CD410L a CD40 se detallan a continuación:

DOM-2 SEQ ID NO: 7

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  D  Y
          E  M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCT
          GATTATGAGA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAAGA
          CTAATACTCT

            M  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  T  S  D  G  I  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K
          G  R
  101     TGATGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTACTTCGG ATGGTATTTC TACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACTACACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTGA TAATGAAGCC TACCATAAAG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

            F  T  I  F  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
          S  G
  201     GTTCACCATC TTCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAAAGTGGG
          CAAGTGGTAG AAGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTA TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTTCACCC

            R  F  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301     AGGTTTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO: 94)
          TCCAAAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  95)
```

DOM-4 SEQ ID NO: 8

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  D  N  Y
          E  M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT
          AATTATGAGA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTA
          TTAATACTCT

            T  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  T  S  D  G  T  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K
          G  R
  101     TGACGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTACGAGTG ATGGTACTTC GACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACTGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGA TAATGCTCAC TACCATGAAG CTGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

            F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
          P  N
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAACTAAT
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTA TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTGGATTA

            P  P  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301     CCGCCGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  96)
          GGCGGCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  97)
```

DOM-5 SEQ ID NO: 9

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  D  G  Y
          E  M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT
          GGGTATGAGA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTA
          CCCATACTCT

            A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  V  S  S  I  T  S  D  G  T  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K
          G  R
  101     TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTACGAGTG ATGGTACGAG TACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACCGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGA TAATGCTCAC TACCATGCTC ATGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

            F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
          P  G
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAACCGGGG
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTGGCCCC

            L  R  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301     CTGCGTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  98)
          GACGCAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  99)
```

DOM-7 SEQ ID NO: 10

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  N  L  Y
          E  M
```

```
1       GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAT
        TTGTATGAGA
        CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATTA
        AACATACTCT

          T  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  T  S  D  G  V  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K
        G  R
101     TGACTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTACTAGTG ATGGTGTTTC TACATACTAC GCAGACTCCG
        TGAAGGGCCG
        ACTGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGA TAATGATCAC TACCACAAAG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
        ACTTCCCGGC

          F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
        A  G
201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
        GAAAGCTGGG
        CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
        CTTTCGACCC

20
          V  I  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301     GTGATTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO: 100)
        CACTAAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  101)

25
```

DOM-8 SEQ ID NO: 11

```
          D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  F  I  D  T  S
        L  E
1       GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTCCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTTTATTGAT
        ACGTCGTTAG
        CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CAAATAACTA
        TGCAGCAATC

          W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  G  S  H  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S
        G  S
101     AGTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GGGTCCCATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG
        GCAGTGGATC
        TCACCATAGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATACTA CCCAGGGTAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC
        CGTCACCTAG

          G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  L  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  W  V  L  P  L  T  F
        G  Q
201     TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTAG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATTGGGTTC TTCCTCTGAC
        GTTCGGCCAA
        ACCCTGTCTA AAGTCAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAATC GATGCATGAT GACAGTTGTC ATAACCCAAG AAGGAGACTG
        CAAGCCGGTT

          G  T  K  V  E  I  K  R
301     GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO  102)
        CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO  103)
```

DOM-10 SEQ ID NO: 12

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  I  A  Y
        D  M
1       GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTAGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTATT
        GCTTATGATA
        CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AATCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATAA
        CGAATACTAT

          S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  W  I  D  E  W  G  L  Q  T  Y  Y  A  D  S  V  K
        G  R
101     TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCATGG ATTGATGAGT GGGGTCTGCA GACATACTAC GCAGACTCCG
        TGAAGGGCCG
        ACTCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGACCTCAC CCAGAGTACC TAACTACTCA CCCCAGACGT CTGTATGATG CGTCTGAGGC
        ACTTCCCGGC

          F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
        R  T
201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
        GAAAAAGACG
        CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
        CTTTTTCTGC

75        P  E  E  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301     CCTGAGGAGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG C (SEQ ID NO  104)
        GGACTCCTCA AACTGATGAC CCCAGTCCCT TGGGACCAGT GGCAGAGCTC G (SEQ ID NO  105)
```

DOM-11 SEQ ID NO: 13

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  G  D  Y
        E  M
1       GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGGT
        GATTATGAGA
        CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACCA
        CTAATACTCT

          S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  G  I  D  G  E  G  S  D  T  Y  Y  A  D  S  V  K
        G  R
101     TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGGG ATTGATGGTG AGGGTTCTGA TACATACTAC GCAGACTCCG
        TGAAGGGCCG
        ACTCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCCC TAACTACCAC TCCCAAGACT ATGTATGATG CGTCTGAGGC
        ACTTCCCGGC

          F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
        P  G
201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
        GAAACCGGGG
        CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTA TGGCGCCATA TAATGACACG
        CTTTGGCCCC

          R  S  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301     AGGAGTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  106)
        TCCTCAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO: 107)
```

DOM-12 SEQ ID NO: 14

```
                E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F R L Y
                E M
          1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAGG
                TTGTATGAGA
                CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATCC
                AACATACTCT

                  A W V R Q A P G K G L E W V S G I D I L G S R T Y Y A D S V K
                G R
    101         TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGGG ATTGATATTT TGGGTTCGAG GACATACTAC GCAGACTCCG
                TGAAGGGCCG
                ACCGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCCC TAACTATAAA ACCCAAGCTC CTGTATGATG CGTCTGAGGC
                ACTTCCCGGC

                  F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K
                D L
    201         GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
                GAAAGATCTG
                CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTA TGGCGCCATA TAATGACACG
                CTTTCTAGAC

                S W Q G F D Y W G Q G T L V T V S S
    301         TCGTGGCAGG GTTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC (SEQ ID NO 108)
                AGCACCGTCC CAAAACTGAT GACCCCAGTC CCTTGGGACC AGTGGCAGAG CTCG (SEQ ID NO 109)

DOM-13 SEQ ID NO: 15
                E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S Y Y
                S M
          1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCT
                TATTATTCGA
                CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAAGA
                ATAATAAGCT

                  Y W V R Q A P G K G L E W V S S I S P F G W G T Y Y A D S V K
                G R
    101         TGTATTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTTCGCCTT TTGGTTGGGG TACATACTAC GCAGACTCCG
                TGAAGGGCCG
                ACATAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGC TAAAGCGGAA AACCAACCCC ATGTATGATG CGTCTGAGGC
                ACTTCCCGGC

                  F T I S R D N S K D T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K
                Y G
    201         GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGGA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
                GAAATATGGG
                CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCCT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
                CTTTATACCC

                E T S G P I S E N F D Y W G Q G T L V T V S S
    301         GAGACGAGTG GTCCGATTTC TGAGAATTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC (SEQ ID NO 110)
                CTCTGCTCAC CAGGCTAAAG ACTCTTAAAA CTGATGACCC CAGTCCCTTG GGACCAGTGG CAGAGCTCG (SEQ ID NO 111)

DOM-14 SEQ ID NO: 16    E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A
S G F T F W S Y D M
          1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG
                TCTTATGATA
                CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAACC
                AGAATACTAT

                  T W V R Q A P G K G L E W V S S I M A S G D D T Y Y A D S V K
                G R
    101         TGACGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTATGGCTT CGGGTGATGA TACATACTAC GCAGACTCCG
                TGAAGGGCCG
                ACTGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGA TAATACCGAA GCCCACTACT ATGTATGATG CGTCTGAGGC
                ACTTCCCGGC

                  F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K
                W D
    201         GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
                GAAATGGGAT
                CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTA TGGCGCCATA TAATGACACG
                CTTTACCCTA

                R D F D Y W G Q G T L V T V S S
    301         CGGGATTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO 112)
                GCCCTAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO 113)

DOM-15 SEQ ID NO: 17
                E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F E E Y
                V M
          1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG
                GAGTATGTTA
                CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTC
                CTCATACAAT

                  S W V R Q A P G K G L E W V S T I S P I G L T T Y Y A D S V K
                G R
    101         TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCAACT ATTTCTCCTA TTGGTCTGAC TACATACTAC GCAGACTCCG
                TGAAGGGCCG
                ACAGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGACCTCAC CCAGAGTTGA TAAAGAGGAT AACCAGACTG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
                ACTTCCCGGC

                  F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A E
                F P
    201         GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
                GGAATTTCCT
                CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
                CCTTAAAGGA

                L I I L P D F D Y W G Q G T L V T V S S
    301         TTGATTATTC TTCCTGATTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC (SEQ ID NO 114)
                AACTAATAAG AAGGACTAAA ACTGATGACC CCAGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGCTCG (SEQ ID NO 115)
```

DOM-16 SEQ ID NO: 18

```
                E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F M E Y
                A M
          1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTATG
                GAGTATGCGA
                CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG GACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATAC
                CTCATACGCT

                  I W V R Q A P G K G L E W V S I I S P L G L S T Y Y A D S V K
                G R
         101    TGATTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAATT ATTTCTCCGC TTGGTTTGTC TACATACTAC GCAGACTCCG
                TGAAGGGCCG
                ACTAAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTAA TAAAGAGGCG AACCAAACAG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
                ACTTCCCGGC

                F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K
                Y Q
         201    GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
                GAAATATCAG
                CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
                CTTTATAGTC

                D S S D S Q Y T N F D Y W G Q G T L V T V S S
         301    GATTCGTCTG ATAGTCAGTA TACGAATTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC (SEQ ID NO 116)
                CTAAGCAGAC TATCAGTCAT ATGCTTAAAA CTGATGACCC CAGTCCCTTG GGACCAGTGG CAGAGCTCG (SEQ ID NO 117)

DOM-17 SEQ ID NO: 19
                E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F E D Y
                G M
          1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG
                GATTATGGGA
                CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTC
                CTAATACCCT

                  G W A R Q A P G K G L E W V S S I G P L G L W T Y Y A D S A K
                G R
         101    TGGGGTGGGC CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTGGTCCTC TGGGTCTTTG GACATACTAC GCAGACTCCG
                CGAAGGGCCG
                ACCCCACCCG GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTCA TAACCAGGAG ACCCAGAAAC CTGTATGATG CGTCTGAGGC
                GCTTCCCGGC

                F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K
                S P
         201    GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
                GAAATCTCCG
                CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
                CTTTAGAGGC

                L E G L I T N F D Y W G Q G T L V T V S S
         301    CTTGAGGGTT TGATTACGAA TTTTGACTAC TGGGGTCAGG GAACCCTGGT CACCGTCTCG AGC (SEQ ID NO 118)
                GAACTCCCAA ACTAATGCTT AAAACTGATG ACCCCAGTCC CTTGGGACCA GTGGCAGAGC TCG (SEQ ID NO 119)

DOM-18 SEQ ID NO: 20
                E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F P E Y
                D M
          1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCCT
                GAGTATGATA
                CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAGGA
                CTCATACTAT

                  T W V R Q A P G K G L E W V S Y I S S D G Y S T Y Y A D S V K
                G R
         101    TGACGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCATAT ATTAGTTCTG ATGGTTATTC TACATACTAC GCAGACTCCG
                TGAAGGGCCG
                ACTGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGACCTCAC CCAGAGTATA TAATCAAGAC TACCAATAAG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
                ACTTCCCGGC

                F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K
                P H
         201    GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
                GAAACCGCAT
                CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
                CTTTGGCGTA

                G S P R E F D Y W G Q G T L V T V S S
         301    GGGAGTCCGC GGGAGTTTGA CTACTGGGGT CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCGAGC (SEQ ID NO 120)
                CCCTCAGGCG CCCTCAAACT GATGACCCCA GTCCCTTGGG ACCAGTGGCA GAGCTCG (SEQ ID NO 121)

DOM-19 SEQ ID NO: 21
                E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F P F P Q Y
                Q M
          1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CCCCTTTCCG
                CAGTATCAGA
                CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GGGGAAAGGC
                GTCATAGTCT

                  A W V R Q A P G K G L E W V S M I T S D G L D T Y Y A D S V K
                G R
         101    TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAATG ATTACTTCTG ATGGTCTTGA TACATATTAC GCAGACTCCG
                TGAAGGGCCG
                ACCGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTAC TAATGAAGAC TACCAGAACT ATGTATAATG CGTCTGAGGC
                ACTTCCCGGC

                F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K
                P E
         201    GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
                GAAACCTGAG
                CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTA TGGCGCCATA TAATGACACG
                CTTTGGACTC

                P L F D Y W G Q G T L V T V S S
         301    CCTCTTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO 122)
                GGAGAAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO 123)
```

DOM-20 SEQ ID NO: 22

```
          E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F S  G Y
          Q M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG
          GGTTATGAGA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAAGC
          CCAATAGTCT
            A W V  R Q A  P G K G  L E W  V S G  I S S E  G L T  T Y Y  A D S V  K
          G R
  101     TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGGT ATTAGTTCGG AGGGTCTTAC TACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACCGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCCA TAATCAAGCC TCCCAGAATG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

            F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K
          L G
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAATTGGGG
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTAACCCC

          R R F D  Y W G  Q G T  L V T V  S S
  301     CGTAGGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  124)
          GCATCCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  125)
```

DOM-21 SEQ ID NO: 23

```
          E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F A  N Y
          E M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCG
          AATTATGAGA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACGC
          TTAATACTCT

            G W A  R Q A  P G K G  L E W  V S V  I S E W  G Y S  T Y Y  A D S A  K
          G R
  101     TGGGGTGGGC CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGTT ATTTCTGAGT GGGGTTATTC TACATACTAC GCAGACTCCG
          CGAAGGGCCG
          ACCCCACCCG GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCAA TAAAGACTCA CCCCAATAAG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
          GCTTCCCGGC

            F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K
          L V
  201     GTTCACCATC TCCCGCCACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAACTTGTG
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTGAACAC

          G G T Q  Y E F  D Y W  G Q G  T  L V T  V S S
  301     GGTGGGACTC AGTATGAGTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC (SEQ ID NO  126)
          CCACCCTGAG TCATACTCAA ACTGATGACC CCAGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGCTCG (SEQ ID NO  127)
```

DOM-22 SEQ ID NO: 24

```
          E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F H  N Y
          E M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCAT
          AATTATGAGA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAGTA
          TTAATACTCT

            S W V  R Q A  P G K G  L E W  V S S  I S S G  G S S  T Y Y  A D S V  K
          G R
  101     TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTTCTTCGG GTGGTTCTTC TACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACAGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTCA TAAAGAAGCC CACCAAGAAG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

            F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K
          P G
  201     GTTCACCATC TCCCGCCACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAACCGGGG
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTGGCCCC

          V K F D  Y W G  Q G T  L V T V  S S
  301     GTTAAGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  128)
          CAATTCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  129)
```

DOM-23 SEQ ID NO: 25

```
          E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F G  L Y
          E M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC CGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGGG
          CTGTATGAGA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG GCCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACCC
          GACATACTCT

            T W V  R Q A  P G K G  L E W  V S S  I T G D  G I S  T Y Y  A D S V  K
          G R
  101     TGACGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTACGGGTG ATGGTATTTC GACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACTGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTCA TAATGCCCAC TACCATAAAG CTGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

            F T I  S R D N  S R N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K
          A G
  201     GTTCACCATC TCCCGCCACA ATTCCAGGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAAGCTGGG
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTCCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTCGACCC

          R K F D  Y W G  Q G T  L V T V  S S
  301     AGGAAGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  130)
          TCCTTCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  131)
```

DOM-24 SEQ ID NO: 26

```
            E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F S  N Y
            Q M
      1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAGT
            AATTATCAGA
            CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATCA
            TTAATAGTCT

              A W V  R Q A  P G K G  L E W  V S S  I T S E  G G S  T Y Y  A D S V  K
            G R
    101     TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTACTAGTG AGGGTGGTTC GACATACTAC GCAGACTCCG
            TGAAGGGCCG
            ACCGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTCA TAATGATCAC TCCCACCAAG CTGTATGATG CGTCTGAGGC
            ACTTCCCGGC

              F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K
            P G
    201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACACTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
            GAAACCGGGT
            CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGTGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
            CTTTGGCCCA

            K N F D  Y W G  Q G T  L V T V  S S
    301     AAGAATTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO 132)
            TTCTTAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO 133)
```

DOM-25 SEQ ID NO: 27

```
            E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F D  N Y
            E M
      1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT
            AATTATGAGA
            CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTA
            TTAATACTCT

              T W V  R Q A  P G K G  L E W  V S T  I T S Q  G T S  T Y Y  A D S V  K
            G R
    101     TGACGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTACGTCGC AGGGTACTAG TACATACTAC GCAGACTCCG
            TGAAGGGCCG
            ACTGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTGA TAATGCAGCG TCCCATGATC ATGTATGATG CGTCTGAGGC
            ACTTCCCGGC

              F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K
            P D
    201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
            GAAACCTGAT
            CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
            CTTTGGACTA

            R S F D  Y W G  Q G T  L V T \  S S
    301     CGTTCTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO 134)
            GCAAGAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO 135)
```

DOM-26 SEQ ID NO: 28

```
            E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F R  S Y
            E M
      1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCGT
            AGTTATGAGA
            CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAGCA
            TCAATACTCT

              T W V  R Q A  P G K G  L E W  V S S  I T S D  G G T  T Y Y  A D S V  K
            G R
    101     TGACTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCATCT ATTACGTCGG ATGGTGGTAC TACATACTAC GCAGACTCCG
            TGAAGGGCCG
            ACTGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGACCTCAC CCAGAGTAGA TAATGCAGCC TACCACCATG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
            ACTTCCCGGC

              F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K
            P D
    201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
            GAAACCTGAT
            CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
            CTTTGGACTA

            K T F D  Y W G  Q G T  L V T V  S S
    301     AAGACGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO 136)
            TTCTGCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO 137)
```

DOM-27 SEQ ID NO: 29

```
            E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F N  L Y
            E M
      1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAT
            TTGTATGAGA
            CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATTA
            AACATACTCT

              T W V  R Q A  P G K G  L E W  V S S  I T S D  G V S  T Y Y  A D S V  K
            G R
    101     TGACTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTACTAGTG ATGGTGTTTC TACATACTAC GCAGACTCCG
            TGAAGGGCCG
            ACTGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGA TAATGATCAC TACCACAAAG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
            ACTTCCCGGC

              F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K
            P D
    201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
            GAAACCGGAT
            CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
            CTTTGGCCTA

            S P F D  Y W G  Q G T  L V T V  S S
    301     TCTCCGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO 138)
            AGAGGCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO 139)
```

DOM-28 SEQ ID NO: 30

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  G  H  Y
          D  M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGGG
          CATTATGATA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACCC
          GTAATACTAT

            A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  S  D  N  G  N  G  T  Y  Y  A  D  S  V  K
          G  R
  101     TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTAGTGATA ATGGTAATGG GACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACCGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTGA TAATCACTAT TACCATTACC CTGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

            F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
          P  G
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAACCGGGG
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTGGCCCC

            R  D  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301     CGTGATTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  140)
          GCACTAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  141)
```

DOM-29 SEQ ID NO: 31

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  G  R  Y
          Q  M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGGT
          CGTTATCAGA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACCA
          GCAATAGTCT

            A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  S  S  D  G  G  G  T  Y  Y  A  D  S  V  K
          G  R
  101     TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTTCTTCTG ATGGTGGGGG GACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACCGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGA TAAAGAAGAC TACCACCCCC CTGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

            F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
          P  G
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAACCTGGG
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTA TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTGGACCC

            R  A  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301     CGGGCGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  142)
          GCCCGCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  143)
```

DOM-30 SEQ ID NO: 32

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  A  R  Y
          Q  M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCG
          AGGTATCAGA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACGC
          TCCATAGTCT

            A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  S  D  D  G  D  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K
          G  R
  101     TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCAACT ATTTCTGATG ATGGTGATTC GACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACCGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGACCTCAC CCAGAGTTGA TAAAGACTAC TACCACTAAG CTGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

            F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
          L  D
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAACTGGAT
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTGACCTA

            K  L  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301     AAGTTGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  144)
          TTCAACAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  145)
```

DOM-31 SEQ ID NO: 33

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  E  E  Y
          Q  M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG
          GAGTATCAGA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTC
          CTCATAGTCT

            A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  S  D  D  G  S  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K
          G  R
  101     TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCGGATG ATGGTTCTTC GACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACCGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTGC TAAAGCCTAC TACCAAGAAG CTGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

            F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
          P  D
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAACCTGAT
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTGGACTA

            L  Y  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301     CTTTATTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  146)
          GAAATAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  147)
```

DOM-32 SEQ ID NO: 34

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  E  V  Y
          Q  M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG
          GTGTATCAGA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTC
          CACATAGTCT

            G  N  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  F  I  V  P  G  G  D  L  T  Y  Y  A  D  S  V  K
          G  R
  101     TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATTT ATTGTGCCTG GGGGTGATTT GACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACCCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAAA TAACACGGAC CCCCACTAAA CTGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

            F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  E
          T  W
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GGAAACGTGG
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
          CCTTTGCACC

            P  E  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301     CCGGAGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO 148)
          GGCCTCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO. 149)
```

DOM-33 SEQ ID NO: 35

```
          D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  T  I  G  E  S
          L  H
    1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GACGATTGGG
          GAGAGTTTAC
          CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTGCTAACCC
          CTCTCAAATG

            W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  R  L  L  I  Y  F  A  S  L  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S
          G  S
  101     ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATTTT GCTTCCCTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCG CGTTTCAGTG
          GCAGTGGATC
          TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATCCGAGGA CTAGATAAAA CGAAGGGACA ACGTTTCACC CCAGGGTAGC GCAAAGTCAC
          CGTCACCTAG

            G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  H  H  N  L  P  S  T  F
          G  Q
  201     TGGGACAGAT TTTACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CATCATATGC TTCCTTCTAC
          GTTCGGCCAA
          ACCCTGTCTA AAATGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC GTAGTATACG AAGGAAGATG
          CAAGCCGGTT

            G  T  K  V  E  I  K  R
  301     GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO 150)
          CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO 151)
```

DOM-34 SEQ ID NO: 36

```
          D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  W  I  G  D  S
          L  S
    1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGT
          GATAGTTTAT
          CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CACCTAACCA
          CTATCAAATA

            W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  F  A  S  Y  L  Q  S  G  V  P  T  R  F  S  G  S
          G  S
  101     CTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTTT GCTTCCTATT TGCAAAGTGG GGTCCCAACA CGTTTCAGTG
          GCAGTGGATC
          GAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAAAA CGAAGGATAA ACGTTTCACC CCAGGGTTGT GCAAAGTCAC
          CGTCACCTAG

            G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  F  E  N  P  V  T  F
          G  Q
  201     TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATTTTGAGA ATCCTGTTAC
          GTTCGGCCAA
          ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC ATAAAACTCT TAGGACAATG
          CAAGCCGGTT

            G  T  K  V  G  I  K  R
  301     GGGACCAAGG TGGGAATCAA ACGG (SEQ ID NO 152)
          CCCTGGTTCC ACCCTTAGTT TGCC (SEQ ID NO 153)
```

DOM-35 SEQ ID NO: 37

```
          D  I  Q  M  T  Q  S  P  G  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  F  I  G  D  S
          L  S
    1     GACATCCAAA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTTTATTGGT
          GATTCTTTAT
          CTGTAGGTTT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CAAATAACCA
          CTAAGAAATA

            W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  F  S  S  I  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S
          G  S
  101     CTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTTT TCTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG
          GCAGTGGATC
          GAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAAAA AGAAGGTAAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC
          CGTCACCTAG

            G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  N  D  I  F  I  T  F
          G  Q
  201     TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATATGGATA TTCCTATTAC
          GTTCGGCCAA
          ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC ATATACCTAT AAGGATAATG
          CAAGCCGGTT

            G  T  K  V  E  I  K  R
  301     GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO 154)
          CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO 155)
```

DOM-36 SEQ ID NO: 38

```
          D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  D  I  D  H  N
          L  E
   1      GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTGAT
          CATAATTTAG
          CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GTACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CCTATAACTA
          GTATTAAATC

            W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  S  S  N  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S
          G  S
 101      AGTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT AGTTCCATGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG
          GCAGTGGATC
          TCACCATAGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATACTA TCAAGGTACA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC
          CGTCACCTAG

            G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  H  S  I  P  V  T  F
          G  Q
 201      TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATTCTA TTCCTGTTAC
          GTTCGGCCAA
          ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC ATAGTAAGAT AAGGACAATG
          CAAGCCGGTT

            G  T  K  V  E  I  K  R
 301      GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO  156)
          CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO  157)
```

DOM-37 SEQ ID NO: 39

```
          D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  Q  I  E  T  N
          L  E
   1      GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCAGATTGAG
          ACGAATTTAG
          CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GTACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CGTCTAACTC
          TGCTTAAATC

            W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  G  S  W  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S
          G  S
 101      AGTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GGTTCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG
          GCAGTGGATC
          TCACCATAGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATACTA CCAAGGACCA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC
          CGTCACCTAG

            G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  H  S  L  P  A  T  F
          G  Q
 201      TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATAGTT TGCCTGCTAC
          GTTCGGCCAA
          ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC ATAGTATCAA ACGGACGATG
          CAAGCCGGTT

            G  T  K  V  E  I  K  R
 301      GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO: 158)
          CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO: 159)
```

DOM-38 SEQ ID NO: 40

```
          D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  D  I  G  N  N
          L  E
   1      GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTGGT
          AATAATTTAG
          CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CCTATAACCA
          TTATTAAATC

            W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  R  L  L  I  Y  H  G  S  W  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S
          G  S
 101      AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATCAT GGGTCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCG CGTTTCAGTG
          GCAGTGGATC
          TCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATCCGAGGA CTAGATAGTA CCCAGGACCA ACGTTTCACC CCAGGGTAGC GCAAAGTCAC
          CGTCACCTAG

            G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  D  F  N  P  T  T  F
          G  Q
 201      TGGGACAGAT TTCACTCTTA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATGATTTTA ATCCTACTAC
          GTTCGGCCAA
          ACCCTGTCTA AAGTGAGAAT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC ATACTAAAAT TAGGATGATG
          CAAGCCGGTT

            G  T  K  V  E  I  K  R
 301      GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO  160)
          CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO: 161)
```

DOM-39 SEQ ID NO: 41

```
          D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  C  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  N  I  D  G  L
          L  W
   1      GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CTGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAATATTGAT
          GGTCTGTTAT
          CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GACACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTTATAACTA
          CCAGACAATA

            W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  A  G  S  G  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S
          G  S
 101      GGTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCG GGGTCCGGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG
          GCAGTGGATC
          CCACCATAGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATACGC CCCAGGCCCA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC
          CGTCACCTAG

            G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  K  A  F  E  P  F  T  F
          G  Q
 201      TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGGCTTTTG AGCCTTTTAC
          GTTCGGCCAA
          ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC TTCCGAAAAC TCGGAAAATG
          CAAGCCGGTT

            G  T  K  V  E  I  K  R
 301      GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO  162)
          CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO: 163)
```

DOM-40 SEQ ID NO: 42

```
                E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  K  A  Y
                D  M
    1           GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAG
                GCGTATGATA
                CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATTC
                CGCATACTAT
10
                  G  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  Q  I  G  R  D  G  S  F  T  Y  Y  A  D  S  V  K
                G  R
  101           TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCACAG ATTGGGAGGG ATGGTTCTTT TACATACTAC GCAGACTCCG
                TGAAGGGCCG
15              ACCCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTGTC TAACCCTCCC TACCAAGAAA ATGTATGATG CGTCTGAGGC
                ACTTCCCGGC

                  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
                P  R
20  201         GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
                GAAACCTCGT
                CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
                CTTTGGAGCA
25
                  R  Y  A  I  F  T  F  D  R  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301           CGGTATGCTA TTTTTACTTT TGATCGGGGT CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCGAGC (SEQ ID NO  164)
                GCCATACGAT AAAAATGAAA ACTAGCCCCA GTCCCTTGGG ACCAGTGGCA GAGCTCG (SEQ ID NO  165)
```

DOM-41 SEQ ID NO: 43

```
                E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  F  E  Y
                E  M
    1           GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTTT
                GAGTATGAGA
                CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAAAA
                CTCATACTCT

                  T  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  A  N  D  G  S  T  T  Y  Y  A  D  S  V  K
                G  R
  101           TGACGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTGCGAATG ATGGTTCGAC TACATACTAC GCAGACTCCG
                TGAAGGGCCG
                ACTGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGA TAACGCTTAC TACCAAGCTG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
                ACTTCCCGGC

                  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
                P  D
  201           GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
                GAAACCTGAT
                CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
                CTTTGGACTA

                  R  Q  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301           CGGCAGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO: 166)
                GCCGTCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  167)
```

DOM-42 SEQ ID NO: 44

```
                E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  G  P  Y
                E  M
    1           GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGGT
                CCGTATGAGA
                CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACCA
                GGCATACTCT

                  T  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  V  G  D  G  L  D  T  Y  Y  A  D  S  V  K
                G  R
  101           TGACTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGTTGGTG ATGGTCTGGA TACATACTAC GCAGACTCCG
                TGAAGGGCCG
                ACTGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGC TAACAACCAC TACCAGACCT ATGTATGATG CGTCTGAGGC
                ACTTCCCGGC

                  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
                P  D
  201           GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
                GAAACCGGAT
                CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
                CTTTGGCCTA

                  R  V  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301           CGGGTTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  168)
                GCCCAAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  169)
```

DOM-43 SEQ ID NO: 45

```
                E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  A  S  Y
                E  M
    1           GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCT
                TCTTATGAGA
                CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACGA
                AGAATACTCT

                  A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  G  S  D  G  G  P  T  Y  Y  A  D  S  V  K
                G  R
  101           TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGGTAGTG ATGGTGGGCC GACATACTAC GCAGACTCCG
                TGAAGGGCCG
                ACCGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGC TAACCATCAC TACCACCCGG CTGTATGATG CGTCTGAGGC
                ACTTCCCGGC

                  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A  K
                P  D
```

```
201        GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC TCCGCGGTAT ATTACTGTGC
           GAAACCTGAT
           CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG AGGCGCCATA TAATGACACG
           CTTTGGACTA

            R  A  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301        AGGGCTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  170)
           TCCCGAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  171)
```

DOM-44 SEQ ID NO: 46

```
            E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  T  S  Y
           E  M
1          GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTACG
           TCTTATGAGA
           CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATGC
           AGAATACTCT

             G  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  S  P  T  G  I  T  T  Y  Y  A  D  S  V  K
           G  R
101        TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTGAGCCTA CTGGTATTAC GACATACTAC GCAGACTCCG
           TGAAGGGCCG
           ACCCCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGA TAACTCGGAT GACCATAATG CTGTATGATG CGTCTGAGGC
           ACTTCCCGGC

             F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
           P  H
201        GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
           GAAACCTCAT
           CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
           CTTTGGAGTA

            F  T  E  L  G  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301        TTTACTGAGC TTGGTTTTGA CTACTGGGGT CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCGAGC (SEQ ID NO  172)
           AAATGACTCG AACCAAAACT GATGACCCCA GTCCCTTGGG ACCAGTGGCA GAGCTCG (SEQ ID NO  173)
```

DOM-45 SEQ ID NO: 47

```
            E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  G  N  Y
           A  M
1          GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGGT
           AATTATGCGA
           CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACCA
           TTAATACGCT

             A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  K  I  G  A  Q  G  L  H  T  Y  Y  A  G  S  V  K
           G  R
101        TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAAG ATTGGGGCGC AGGGTCTTCA TACATACTAC GCAGGCTCCG
           TGAAGGGCCG
           ACCGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTTC TAACCCCGCG TCCCAGAAGT ATGTATGATG CGTCCGAGGC
           ACTTCCCGGC

             F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
           Q  T
201        GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
           GAAACAGACG
           CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
           CTTTGTCTGC

            T  M  D  Y  E  R  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301        ACGATGGATT ATGAGAGGTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC (SEQ ID NO  174)
           TGCTACCTAA TACTCTCCAA ACTGATGACC CCAGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGCTCG (SEQ ID NO  175)
```

DOM-46 SEQ ID NO: 48

```
            E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  E  L  Y
           A  M
1          GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG
           TTGTATGCTA
           CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTC
           AACATACGAT

             A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  G  I  G  A  V  G  E  T  T  Y  Y  A  D  S  V  K
           G  R
101        TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGGT ATTGGTGCTG TGGGTGAGAC TACATACTAC GCAGACTCCG
           TGAAGGGCCG
           ACCGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCCA TAACCACGAC ACCCACTCTG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
           ACTTCCCGGC

             F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
           E  A
201        GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
           GAAAGAGGCT
           CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
           CTTTCTCCGA

             N  N  L  S  D  N  L  V  F  D  Y  W  G  C  G  T  L  V  T  V  S  S
301        AATAATCTTT CTGATAATCT TGTGTTTGAC TACTGGGGTC AGGGAACCCT GGTCACCGTC TCGAGC (SEQ ID NO  176)
           TTATTAGAAA GACTATTAGA ACACAAACTG ATGACCCCAG TCCCTTGGGA CCAGTGGCAG AGCTCG (SEQ ID NO  177)
```

DOM-47 SEQ ID NO: 49

```
            D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  W  I  G  D  S
           L  S
1          GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGG
           GATTCGTTAA
           CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CACCTAACCC
           CTAAGCAATT

             W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  F  G  S  Y  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S
           G  S
```

```
101     GTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT CATCTATTTT GGTTCCTATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG
        GCAGTGGATC
        CAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAAAA CCAAGGATAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC
        CGTCACCTAG

          G  T  D   F  T  L  T   I  S  S   L  Q  P   E  D  F  A   T  Y  Y   C  Q  Q   Y  L  H  T   P  S  T   F
        G  Q
201     TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT CAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATTTGCATA CTCCTTCGAC
        GTTCGGCCAA
        ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC ATAAACGTAT GAGGAAGCTG
        CAAGCCGGTT

          G  T  K  V   E  I  K   R
301     GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO  178)
        CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO  179)
```

DOM-48 SEQ ID NO: 50

```
          D  I  Q  M   T  Q  S   P  S  S   L  S  A  S   V  G  D   R  V  T   I  T  C   R  A  S  Q   W  I  G   D  S
        L  S
  1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGG
        GATTCGTTAA
        CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACCG CCCGTTCAGT CACCTAACCC
        CTAAGCAATT

            W  Y  Q   Q  K  P   G  K  A   P  K  L  L   I  Y  F   G  S  Y   L  Q  N   G  V  P  S   R  F  S  G   S
        G  S
101     GTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTTT GGTTCCTATT TGCAAAATGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG
        GCAGTGGATC
        CAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAAAA CCAAGGATAA ACGTTTTACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC
        CGTCACCTAG

          G  T  D   F  T  L  T   I  S  S   L  Q  P   E  D  F  A   T  Y  Y   C  Q  Q   Y  M  I  T   P  T  T   F
        G  Q
201     TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATATGATTA CTCCTACTAC
        GTTCGGCCAA
        ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC ATATACTAAT GAGGATGATG
        CAAGCCGGTT

          G  T  K  V   E  I  K   R
301     GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO  180)
        CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO  181)
```

DOM-49 SEQ ID NO: 51

```
          D  V  Q  M   T  Q  S   P  S  S   L  S  A  S   V  G  D   R  V  T   I  T  C   R  A  S  Q   W  I  G   D  S
        L  S
  1     GACGTCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGG
        GATTCGTTAA
        CTGCAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CACCTAACCC
        CTAAGCAATT

            W  Y  Q   Q  K  P   G  K  A   P  K  L  L   I  Y  F   G  S  Y   L  Q  S   G  V  P  S   R  F  S  G   S
        G  S
101     GTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTTT GGTTCCTATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG
        GCAGTGGATC
        CAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAAAA CCAAGGATAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC
        CGTCACCTAG

          G  T  D   F  T  L  T   I  S  S   L  Q  P   E  D  F  A   T  Y  Y   C  Q  Q   Y  M  S  A   P  S  T   F
        G  Q
201     TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATATGAGTG CTCCTTCTAC
        GTTCGGCCAA
        ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC ATATACTCAC GAGGAAGATG
        CAAGCCGGTT

          G  T  K  V   E  I  K   R
301     GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO  182)
        CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO  183)
```

DOM-50 SEQ ID NO: 52

```
          D  I  Q  M   T  Q  S   P  S  S   L  S  A  S   V  G  D   R  V  T   I  T  C   R  A  S  Q   W  I  G   D  S
        L  S
  1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGG
        GATTCGTTAA
        CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CACCTAACCC
        CTAAGCAATT

            W  Y  Q   Q  K  P   G  K  A   P  K  L  L   I  Y  F   G  S  Y   L  Q  S   G  V  P  S   R  F  S  G   S
        G  S
101     GTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTTT GGTTCCTATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG
        GCAGTGGATC
        CAACCATGGT CGTCTTTCGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAAAA CCAAGGATAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC
        CGTCACCTAG

          G  T  D   F  T  L  T   I  S  S   L  Q  P   E  D  S  A   T  Y  Y   C  Q  Q   Y  Q  Y  V   P  S  T   F
        G  Q
201     TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTCTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCAGTATG TTCCTTCTAC
        GTTCGGCCAA
        ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAGAC GATGCATGAT GACAGTTGTC ATAGTCATAC AAGGAAGATG
        CAAGCCGGTT

          G  T  K  V   E  I  K   Q
301     GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACAG (SEQ ID NO  184)
        CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGTC (SEQ ID NO  185)
```

DOM-51 SEQ ID NO: 53

```
          D  I  Q  M   T  Q  S   P  S  S   L  S  A  S   V  G  D   R  V  T   I  T  C   R  A  S  Q   P  I  V   D  E
        L  D
```

```
      1  GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCCTATTGTT
         GATGAGTTAG
         CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA CACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CGGATAACAA
         CTACTCAATC

                    W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  A  A  S  I  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S
         G  S
    101  ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT CATCTATGCT GCGTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG
         GCAGTGGATC
         TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATACGA CGCAGGTAAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC
         CGTCACCTAG

                    G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  H  Q  W  S  T  Y  P  T  T  F
         G  Q
    201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT CAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCATCAG TGGTCTACTT ATCCTACGAC
         GTTCGGCCAA
         ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTAGTC ACCAGATGAA TAGGATGCTG
         CAAGCCGGTT

                    G  T  K  V  E  I  K  R
    301  GGGACCAAGG TGGAAATTAA ACGG (SEQ ID NO  186)
         CCCTGGTTCC ACCTTTAATT TGCC (SEQ ID NO  187)
```

DOM-52 SEQ ID NO: 54

```
                    D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  D  I  G  S  A
         L  R
      1  GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGTGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTGGG
         TCTGCGTTAA
         CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCACT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CCTATAACCC
         AGACGCAATT

                    W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  L  G  S  D  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S
         G  S
    101  GGTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTTG GGTTCCGATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG
         GCAGTGGATC
         CCACCATAGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAAAC CCAAGGCTAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC
         CGTCACCTAG

                    G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  T  Q  Y  F  P  T  T  F
         G  Q
    201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGCAGTATT TTCCTACGAC
         GTTCGGCCAA
         ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC TGCGTCATAA AAGGATGCTG
         CAAGCCGGTT

                    G  T  K  V  E  I  K  R
    301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO  188)
         CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO  189)
```

DOM-53 SEQ ID NO: 55

```
                    D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  A  I  Y  G  G
         L  R
      1  GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGCGATTTAT
         GGGGGGTTAC
         CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CCGCTAAATA
         CCCCCCAATG

                    W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  G  E  S  M  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S
         G  S
    101  GGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGGG GAGTCCATGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG
         GCAGTGGATC
         CCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATACCC CTCAGGTACA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC
         CGTCACCTAG

                    G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  H  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  V  Y  H  K  P  F  T  F
         G  Q
    201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCATCCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTTATCATA AGCCTTTTAC
         GTTCGGCCAA
         ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTAGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC CAAATAGTAT TCGGAAAATG
         CAAGCCGGTT

                    G  T  K  V  E  I  K  R
    301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO  190)
         CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO  191)
```

DOM-54 SEQ ID NO: 56

```
                    E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  T  A  Y
         R  M
      1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTACG
         GCGTATAGGA
         CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATGC
         CGCATATCCT

                    A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  W  I  S  P  S  G  S  G  T  Y  Y  A  D  S  V  K
         G  R
    101  TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATGG ATTTCGCCTT CTGGTTCGGG GACATACTAC GCAGACTCCG
         TGAAGGGCCG
         ACCGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTACC TAAAGCGGAA GACCAAGCCC CTGTATGATG CGTCTGAGGC
         ACTTCCCGGC

                    F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
         T  L
    201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
         GAAAACTTTG
         CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
         CTTTTGAAAC

                    T  D  S  P  S  G  H  Y  E  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
    301  ACGGATTCGC CGTCGGGGCA TTATGAGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC (SEQ ID NO  192)
         TGCCTAAGCG GCAGCCCCGT AATACTCAAA CTGATGACCC CAGTCCCTTG GGACCAGTGG CAGAGCTCG (SEQ ID NO  193)
```

DOM-55 SEQ ID NO: 57

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  A  R  Y
          E  M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCG
          CGGTATGAGA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG CACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACGC
          GCCATACTCT

                    G  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  R  I  T  A  Q  G  L  G  T  Y  Y  A  D  S  V  K
          G  R
  101     TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCACGG ATTACTGCTC AGGGTCTTGG GACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGCCCG
          ACCCCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTGCC TAATGACGAG TCCCAGAACC CTGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

                    F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
          Y  L
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ACTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAATATCTT
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TGAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTA TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTATAGAA

          T  D  F  S  S  G  H  Q  E  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301     ACTGATTTTA GTAGTGGGCA TCAGGAGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC (SEQ ID NO  194)
          TGACTAAAAT CATCACCCGT AGTCCTCAAA CTGATGACCC CAGTCCCTTG GGACCAGTGG CAGAGCTCG (SEQ ID NO  195)
```

DOM-56 SEQ ID NO: 58

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  N  D  Y
          T  M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAT
          GATTATACTA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATTA
          CTAATATGAT

                    G  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  W  I  N  G  T  G  G  Q  T  Y  Y  A  D  S  V  K
          G  R
  101     TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATGG ATTCATGGGA CTGGTGGTCA GACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGCCCG
          ACCCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTACC TAAGTACCCT GACCACCAGT CTGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

                    F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
          A  L
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAAGCTTTG
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTCGAAAC

          A  D  R  S  G  G  V  V  E  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301     GCTGATAGGA GTGGGGGGGT TGTTGAGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC (SEQ ID NO: 196)
          CGACTATCCT CACCCCCCCA ACAACTCAAA CTGATGACCC CAGTCCCTTG GGACCAGTGG CAGAGCTCG (SEQ ID NO: 197)
```

DOM-57 SEQ ID NO: 59

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  E  Y
          D  M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCT
          GAGTATGATA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAAGA
          CTCATACTAT

                    Y  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  W  I  D  T  D  G  G  D  T  Y  Y  A  D  S  V  K
          G  R
  101     TGTATTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATGG ATTGATACTG ATGGTGGGGA TACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGCCCG
          ACATAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTACC TAACTATGAC TACCACCCCT ATGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

                    F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
          P  G
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAACCTGGT
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTGGACCA

          L  K  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301     CTGAAGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO: 198)
          GACTTCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO: 199)
```

DOM-58 SEQ ID NO: 60

```
          E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  E  V  Y
          T  M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG
          GTTTATACTA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTC
          CAAATATGAT

                    A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  D  E  S  G  R  D  T  Y  Y  A  D  S  V  K
          G  R
  101     TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCAACG ATTGATGAGT CTGGTCGTGA TACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGCCCG
          ACCGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGACCTCAC CCAGAGTTGC TAACTACTCA GACCAGCACT ATGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC

                    F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
          P  G
```

```
201        GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
           GAAACCTGGT
           CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
           CTTTGGACCA

            V  W  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301        GTTTGGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  200)
           CAAACCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  201)
```

DOM-59 SEQ ID NO: 61

```
            E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  L  D  Y
           A  M
1          GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCTG
           GATTATGCGA
           CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG CACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAGAC
           CTAATACGCT

             G  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  S  P  N  G  M  G  T  Y  Y  A  D  S  V  K
           G  R
101        TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG CGTCTCAACT ATTTCTCCGA TGGGTATGGG TACATACTAC GCAGACTCCG
           TGAAGGGCCG
           ACCCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGACCTCAC CCAGAGTTGA TAAAGAGGCT ACCCATACCC ATGTATGATG CGTCTGAGGC
           ACTTCCCGGC

             F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
           S  S
201        GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
           GAAATCGAGT
           CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
           CTTTAGCTCA

            A  I  S  F  T  S  D  I  S  N  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301        GCTATTTCGT TTACTTCTGA TATTTCTAAT TTTGACTACT GGGGTCAGGG AACCCTGGTC ACCGTCTCGA GC (SEQ ID NO: 202)
           CGATAAAGCA AATGAAGACT ATAAAGATTA AAACTGATGA CCCCAGTCCC TTGGGACCAG TGGCAGAGCT CG (SEQ ID NO  203)
```

DOM-61 SEQ ID NO: 62

```
            E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  A  A  Y
           A  M
1          GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCT
           GCTTATGCTA
           CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACGA
           CGAATACGAT

             T  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  Y  I  S  P  N  G  T  A  T  Y  Y  A  D  S  V  K
           G  R
101        TGACGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATAT ATTAGTCCGA ATGGTACGGC GACATACTAC GCAGACTCCG
           TGAAGGGCCG
           ACTGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTATA TAATCAGGCT TACCATGCCG CTGTATGATG CGTCTGAGGC
           ACTTCCCGGC

             F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  E
           Y  V
201        GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
           GGAATATGTG
           CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
           CCTTATACAC

            G  M  R  W  N  S  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301        GGGATGCGTT GGAATTCTTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC (SEQ ID NO  204)
           CCCTACGCAA CCTTAAGAAA ACTGATGACC CCAGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGCTCG (SEQ ID NO  205)
```

DOM-62 SEQ ID NO: 63

```
            E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y
           E  M
1          GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG
           AGTTATGAGA
           CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAAGC
           TCAATACTCT

             A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  T  S  L  G  T  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K
           G  R
101        TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTACGAGTC TTGGTACTTC TACATACTAC GCAGACTCCG
           TGAAGGGCCG
           ACCGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGA TAATGCTCAG AACCATGAAG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
           ACTTCCCGGC

             F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
           P  G
201        GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
           GAAACCGGGT
           CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
           CTTTGGCCCA

            R  K  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301        AGGAAGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  206)
           TCCTTCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  207)
```

DOM-65 SEQ ID NO: 64

```
            E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  N  E  Y
           E  M
1          GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAT
           GAGTATGAGA
           CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATTA
           CTCATACTCT

             T  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  T  S  E  G  S  G  T  Y  Y  A  D  S  V  K
           G  R
```

```
        101  TGACGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTACTAGTG AGGGTAGTGG GACATACTAC GCAGACTCCG
             TAAAGGGCCG
             ACTGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTGC TAATGATCAC TCCCATCACC CTGTATGATG CGTCTGAGGC
             ATTTCCCGGC

             F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K
             P N
        201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
             GAAACCTAAT
             CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
             CTTTGGATTA

             G K F D Y W G Q G T L V T V S S
        301  GGTAAGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO: 208)
             CCATTCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO: 209)
```

DOM-66 SEQ ID NO: 65

```
             E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S D Y
             E M
          1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCT
             GATTATGAGA
             CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG CACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAAGA
             CTAATACTCT

               L W V R Q A P G K G L E W V S T I T S E G H S T Y Y A D S V K
             G R
        101  TGTTGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCAACT ATTACTAGTG AGGGTCATTC TACATACTAC GCAGACTCCG
             TGAAGGGCCG
             ACAACACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGACCTCAC CCAGAGTTGA TAATGATCAC TCCCAGTAAG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
             ACTTCCCGGC

             F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K
             P G
        201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
             GAAACCTGGG
             CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
             CTTTGGACCC

             T S F D Y W G Q G T L V T V S S
        301  ACTTCGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO: 210)
             TGAAGCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  211)
```

DOM-67 SEQ ID NO: 66

```
             E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S D Y
             E M
          1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAGT
             GATTATGAGA
             CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATCA
             CTAATACTCT

               S W V R Q A P G K G L E W V S T I D S D G S F T Y Y A D S V K
             G R
        101  TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTGATTCTG ATGGTAGTTT TACATACTAC GCAGACTCCG
             TGAAGGGCCG
             ACTCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTGC TAACTAAGAC TACCATCAAA ATGTATGATG CGTCTGAGGC
             ACTTCCCGGC

             F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K
             P G
        201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
             GAAACCGGGT
             CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
             CTTTGGCCCA

             V K F D Y W G Q G T L V T V S S
        301  GTGAAGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  212)
             CACTTCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO: 213)
```

DOM-68 SEQ ID NO: 67

```
             E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K D Y
             E M
          1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAG
             GATTATGAGA
             CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATTC
             CTAATACTCT

               T W V R Q A P G K G L E W V S S I S S T G Q S T Y Y A D S V K
             G R
        101  TGACTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTTCTTCTA CTGGTCAGTC TACATACTAC GCAGACTCCG
             TGAAGGGCCG
             ACTGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGA TAAAGAAGAT GACCAGTCAG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
             ACTTCCCGGC

             F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K
             P G
        201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
             GAAACCGGGT
             CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
             CTTTGGCCCA

             N K F D Y W G Q G T L V T \ S S
        301  AATAAGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO: 214)
             TTATTCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO: 215)
```

DOM-69 SEQ ID NO: 68

```
             E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L D Y
             G M
```

```
          1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCTT
             GATTATGGTA
             CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAGAA
             CTAATACCAT

               A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  A  I  S  P  L  G  L  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K
             S  R
        101  TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTC GGTCTCAGCT ATTTCGCCTC TTGGTCTTAG TACATACTAC GCAGACTCCG
             TGAAGAGCCG
             ACCGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCGA TAAAGCGGAG AACCAGAATC ATGTATGATG CGTCTGAGGC
             ACTTCTCGGC

               F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
             E  V
        201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
             GAAAGAGGTG
             CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTA TGGCGCCATA TAATGACACG
             CTTTCTCCAC

               R  V  G  R  G  V  H  P  P  K  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
        301  AGGGTGGGTA GGGGTGTTCA TCCTCCGAAG TTTGACTACT GGGGTCAGGG AACCCTGGTC ACCGTCTCGA GC (SEQ ID NO  216)
             TCCCACCCAT CCCCACAAGT AGGAGGCTTC AAACTGATGA CCCCAGTCCC TTGGGACCAG TGGCAGAGCT CG (SEQ ID NO  217)
```

DOM-70 SEQ ID NO: 69

```
               E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  E  N  Y
             A  M
          1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG
             AATTATGCTA
             CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTC
             TTAATACGAT

               S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  A  P  L  G  V  P  T  Y  Y  A  D  S  V  K
             G  R
        101  TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTGCTCCGC TGGGTGTTCC GACATACTAC GCAGACTCCG
             TGAAGGGCCG
             ACAGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTGC TAACGAGGCG ACCCACAAGG CTGTATGATG CGTCTGAGGC
             ACTTCCCGGC

               F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
             K  K
        201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
             GAAAAAGAAG
             CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTA TGGCGCCATA TAATGACACG
             CTTTTTCTTC

               V  G  A  W  L  Q  S  R  S  F  D  Y  W  J  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
        301  GTTGGGGCGT GGCTGCAGTC GCGGAGTTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC (SEQ ID NO  218)
             CAACCCCGCA CCGACGTCAG CGCCTCAAAA CTGATGACCC CAGTCCCTTG GGACCAGTGG CAGAGCTCG (SEQ ID NO  219)
```

DOM-71 SEQ ID NO: 70

```
               E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  E  G  Y
             P  M
          1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG
             GGTTATCCTA
             CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTC
             CCAATAGGAT

               S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  S  P  L  G  P  D  T  Y  Y  A  D  S  V  K
             G  R
        101  TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTAGTCCTT TGGGTCCTGA TACATACTAC GCAGACTCCG
             TGAAGGGCCG
             ACAGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTGA TAATCAGGAA ACCCAGGACT ATGTATGATG CGTCTGAGGC
             ACTTCCCGGC

               F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
             L  L
        201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
             GAAACTGTTG
             CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTA TGGCGCCATA TAATGACACG
             CTTTGACAAC

               M  G  E  Y  L  N  S  R  T  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
        301  ATGGGGGAGT ATTTGAATTC TAGGACGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC (SEQ ID NO  220)
             TACCCCCTCA TAAACTTAAG ATCCTGCAAA CTGATGACCC CAGTCCCTTG GGACCAGTGG CAGAGCTCG (SEQ ID NO  221)
```

DOM-72 SEQ ID NO: 71

```
               E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  E  A  Y
             P  M
          1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG
             GCGTATCCTA
             CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTC
             CGCATAGGAT

               S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  S  P  L  G  L  W  T  Y  Y  A  D  S  V  K
             G  R
        101  TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTTCCCCTC TTGGTTTGTG GACATACTAC GCAGACTCCG
             TGAAGGGCCG
             ACAGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTCA TAAAGGGGAG AACCAAACAC CTGTATGATG CGTCTGAGGC
             ACTTCCCGGC

               F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
             L  S
        201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
             GAAACTTAGT
             CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
             CTTTGAATCA

               A  G  A  E  T  H  V  Y  R  L  F  D  Y  P  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
        301  GCTGGGGCGG AGACTCATGT TTATCGGCTT TTTGACTACT GGGGTCAGGG AACCCTGGTC ACCGTCTCGA GC (SEQ ID NO  222)
             CGACCCCGCC TCTGAGTACA AATAGCCGAA AAACTGATGA CCCCAGTCCC TTGGGACCAG TGGCAGAGCT CG (SEQ ID NO  223)
```

DOM-73 SEQ ID NO: 72

```
          E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F S  K Y
          D M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCT
          AAGTATGATA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAAGA
          TTCATACTAT
          
            S W V  R Q A  P G K G  L E W  V S T  I L E D  G L T  T Y Y  A D S V  K
          G R
  101     TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTCTGGAGG ATGGTCTGAC TACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACAGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTGA TAAGACCTCC TACCAGACTG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC
          
            F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K
          P G
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAACCGGGG
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTGGCCCC
          
          R L F D  Y W G  Q G T  L V T V  S S
  301     CGTTTGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO 224)
          GCAAACAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO 225)
```

DOM-74 SEQ ID NO: 73

```
          E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F S  D Y
          P M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG
          GATTATCCTA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAAGC
          CTAATAGGAT
          
            T W V  R Q A  P G K G  L E W  V S T  I L S P  G T E  T Y Y  A D S V  K
          G R
  101     TGACGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCAACT ATTCTGTCTC CGGGTACGGA GACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACTGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGACCTCAC CCAGAGTTGA TAAGACAGAG GCCCATGCCT CTGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC
          
            F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K
          A E
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAAGCTGAG
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTCGACTC
          
          K D F D  Y W G  Q G T  L V T V  S S
  301     AAGGATTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO 226)
          TTCCTAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO 227)
```

DOM-75 SEQ ID NO: 74

```
                                                                        AvaI
                                                                        ------
          E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F L  Q Y
          P M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCGGGATT CACCTTTTTG
          CAGTATCCGA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGCCCTAA GTGGAAAAAC
          GTCATAGGCT
          
            G W V  R Q A  P G K G  L E W  V S T  I S P V  G L T  T Y Y  A D S V  K
          G R
  101     TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTTCTCCTG TTGGTTTGAC TACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACCCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTGA TAAAGAGGAC AACCAAACTG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC
          
            F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K
          L F
  201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
          GAAATTGTTT
          CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTA TGGCGCCATA TAATGACACG
          CTTTAACAAA
          
          E G S R  I Q R  D V G  F D Y W  G Q G  T L V  T V S S
  301     GAGGGGTCGA GGATTCAGCG TGATGTGGGT TTTGACTACT GGGGTCAGGG AACCCTGGTC ACCGTCTCGA GC (SEQ ID NO 228)
          CTCCCCAGCT CCTAAGTCGC ACTACACCCA AAACTGATGA CCCCAGTCCC TTGGGACCAG TGGCAGAGCT CG (SEQ ID NO: 229)
```

DOM-77 SEQ ID NO: 75

```
          E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F E  E Y
          G M
    1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG
          GAGTATGGTA
          CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTC
          CTCATACCAT
          
            A W V  R Q A  P G K G  L E W  V S T  I S P L  G I S  T Y Y  A D S V  K
          G R
  101     TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTTCTCCGC TGGGTATTTC GACATACTAC GCAGACTCCG
          TGAAGGGCCG
          ACCGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTGA TAAAGAGGCG ACCCATAAAG CTGTATGATG CGTCTGAGGC
          ACTTCCCGGC
```

```
                F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
               H  A
       201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAI CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
               GAAACATGCT
       5       CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATP GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
               CTTTGTACGA

                T  S  Q  E  S  L  R  S  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
       301     ACGTCTCAGG AGTCTTTGCG GTCTTTTGAC TACTGGGGTC AGGGAACCCT GGTCACCGTC TCGAGC (SEQ ID NO  230)
       10      TGCAGAGTCC TCAGAAACGC CAGAAAACTG ATGACCCCAG TCCCTTGGGA CCAGTGGCAG AGCTCG (SEQ ID NO  231)
```

DOM-78 SEQ ID NO: 76

```
                E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  E  R  Y
       15      Q  M
         1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG
               AGGTATCAGA
               CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTC
       20      TCCATAGTCT

                  A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  S  S  D  G  G  G  T  Y  Y  A  D  S  V  K
               G  R
       101     TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCGGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTAGTTCTG ATGGTGGGGG GACATACTAC GCAGACTCCG
               TGAAGGGCCG
       25      ACCGCACCCA GGCGGTCCGA GGCCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTGC TAATCAAGAC TACCACCCCC CTGTATGATG CGTCTGAGGC
               ACTTCCCGGC

                F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
               P  G
       30      GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
               GAAACCTGGT
               CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
               CTTTGGACCA
       35
                N  R  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
       301     CATCGGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO: 232)
               GTAGCCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  233)
```

DOM-80 SEQ ID NO: 77

```
       40      E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  G  R  Y
               Q  M
         1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGGT
               CGTTATCAGA
       45      CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACCA
               GCAATAGTCT

                  A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  S  S  D  G  G  G  T  Y  Y  A  D  S  V  K
               G  R
       50      TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTTCTTCTG ATGGTGGGGG GACATACTAC GCAGACTCCG
               TGAAGGGCCG
               ACCGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGA TAAAGAAGAC TACCACCCCC CTGTATGATG CGTCTGAGGC
               ACTTCCCGGC
       55
                F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
               P  S
       201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
               GAAACCGTCT
               CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
       60      CTTTGGCAGA

                R  R  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
       301     CGTCGGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  234)
               GCAGCCAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  235)
       65
```

DOM-81 SEQ ID NO: 78

```
                E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  F  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  E  L  Y
               P  M
       70      GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTT CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG
               TTGTATCCGA
               CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAA GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTC
               AACATAGGCT
       75
                  A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  S  P  V  G  F  L  T  Y  Y  A  D  S  V  K
               G  R
       101     TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCATCG ATTTCTCCGG TTGGTTTTCT GACATACTAC GCAGACTCCG
               TGAAGGGCCG
               ACCGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGACCTCAC CCAGAGTAGC TAAAGAGGCC AACCAAAAGA CTGTATGATG CGTCTGAGGC
       80      ACTTCCCGGC

                F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
               G  H
       201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
       85      GAAAGGGCAT
               CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTA TGGCGCCATA TAATGACACG
               CTTTCCCGTA

                E  G  S  Y  T  P  R  S  A  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
       90      GAGGGGTCGT ATACTCCGCG GTCGGCTTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC (SEQ ID NO  236)
               CTCCCCAGCA TATGAGGCGC CAGCCGAAAA CTGATGACCC CAGTCCCTTG GGACCAGTGG CAGAGCTCG (SEQ ID NO  237)
```

DOM-82 SEQ ID NO: 79

```
       95      E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  E  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  V  A  Y
               P  M
         1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGTG
               GCGTATCCTA
               CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACAC
      100      CGCATAGGAT
```

```
                A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  A  P  L  G  G  N  T  Y  Y  A  D  S  V  K
G  R
  101   TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCAACT ATTGCGCCTC TGGGTGGTAA TACATACTAC GCAGACTCCG
TGAAGGGCCG
        ACCGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGACCTCAC CCAGAGTTGA TAACGCGGAG ACCCACCATT ATGTATGATG CGTCTGAGGC
ACTTCCCGGC

                F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
R  P
  201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
GAAACGGCCG
        CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
CTTTGCCGGC

                E  G  L  Q  I  D  S  Q  N  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301   GAGGGGCTGC AGATTGATTC TCAGAATTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC (SEQ ID NO  238)
        CTCCCCGACG TCTAACTAAG AGTCTTAAAA CTGATGACCC CAGTCCCTTG GGACCAGTGG CAGAGCTCG (SEQ ID NO  239
```

DOM-83 SEQ ID NO: 80

```
                E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  A  L  Y
Q  M
    1   GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCG
TTGTATCAGA
        CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACGC
AACATAGTCT

                A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  D  S  S  G  S  D  T  Y  Y  A  D  S  V  K
G  R
  101   TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGATTCTT CTGGTAGTGA TACATACTAC GCAGACTCCG
TGAAGGGCCG
        ACCGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGC TAACTAAGAA GACCATCACT ATGTATGATG CGTCTGAGGC
ACTTCCCGGC

                F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
P  E
  201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
GAAACCTGAG
        CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
CTTTGGACTC

                R  D  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301   CGTGATTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  240)
        GCACTAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  241)
```

DOM-84 SEQ ID NO: 81

```
                E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  R  Q  Y
Q  M
    1   GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAGG
CAGTACCAGA
        CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATCC
GTCATGGTCT

                A  W  A  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  A  S  D  G  V  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K
G  R
  101   TGGCTTGGGC CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTGCGTCGG ATGGTGTTTC TACATACTAC GCAGACTCCG
TGAAGGGCCG
        ACCGAACCCG GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTGC TAACGCAGCC TACCACAAAG ATGTATGATG CGTCTGAGGC
ACTTCCCGGC

                F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
V  G
  201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC
GAAAGTTGGT
        CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG
CTTTCAACCA

                R  D  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
  301   CGTGATTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC (SEQ ID NO  242)
        GCACTAAAAC TGATGACCCC AGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGCTCG (SEQ ID NO  243)
```

DOM-116 SEQ ID NO: 82

```
                D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  P  I  G  P  D
L  L
    1   GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCCTATTGGT
CCTGATTTAC
        CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CGGATAACCA
GGACTAAATG

                W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  Q  T  S  I  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S
G  S
  101   TGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG ACGTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG
GCAGTGGATC
        ACACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAGTC TGCAGGTAAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC
CGTCACCTAG

                G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  W  A  F  P  V  T  F
G  Q
  201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATTGGGCTT TTCCTGTGAC
GTTCGGCCAA
        ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC ATAACCCGAA AAGGACACTG
CAAGCCGGTT

                G  T  K  V  E  I  K  R
  301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG (SEQ ID NO: 244)
        CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC (SEQ ID NO  245)--
```

DOM-85 – SEQ ID NO.: 246

```
      E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F E Q Y D M
  1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG CAGTATGATA
      R W V R Q A P G K G L E W V S W I D E A G H E T Y Y A D S V K G R
101 TGAGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATGG ATTGATGAGG CGGGTCATGA GACATACTAT GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
      F T I S R D N S R N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G M
201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAGGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGATG
      D G F D Y W G Q G T L V T V S S
301 GATGGGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC – SEQ ID NO.: 361
```

DOM-86 – SEQ ID NO.: 247

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I G D A L F
  1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTGGG GATGCTTTAT
      W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y S S M L Q S G V P S R F S G G G S
101 TTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTAT TCTTCCATGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCGGTGGATC
      G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R H S T P A T F G Q
201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGGCATAGTA CTCCTGCTAC GTTCGGCCAA
      G T K V E I K R
301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG – SEQ ID NO.: 362
```

DOM-87 – SEQ ID NO.: 248

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I D E S L M
  1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTGAT GAGTCTTTAA
      W Y Q Q K P G K A P R L L I Y G V S Y L Q S G V P S R F S G S G S
101 TGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGGG GTGTCCTATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
      G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R W K A P F T F G Q
201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTCG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGGTGGAAGG CTCCTTTTAC GTTCGGCCAA
      G T K V E I K R – SEQ ID NO.: 363
```

DOM-88 – SEQ ID NO.: 249

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q E I V E D L Y
  1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTTACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGAGATTGTG GAGGATTTAT
      W Y Q Q K P G K A A K L L I Y G A S W L Q S G V P S R F S G S G S
101 ATTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCG CTAAGCTCCT GATCTATGGT GCGTCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
      G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T R R R P Y T F G Q
201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGCGTAGGC GTCCTTATAC GTTCGGCCAA
      G T K V E I K R
301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG – SEQ ID NO.: 364
```

DOM-89 – SEQ ID NO.: 250

```
      D I Q M T Q S P A S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I D P M L R
  1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCAGCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTGAT CCTATGTTAA
      W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A G S I L Q S G V P S R F S G S G S
101 GGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCG GGTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
```

```
      G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  T L V T  P Y T  F G Q
201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGCTGGTGA CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
      G T K V  E I K  R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 365

DOM-90 – SEQ ID NO.: 251

```
      D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C  R A S Q  S I S  D A L F
1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTCGATTTCG GATGCGTTAT
      W Y Q  Q K P  G K A P  R L L  I Y Y  G S V L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
101   TTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATTAT GGTTCCGTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
      G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  R F Q E  P V T  F G Q
201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTTTCAGG AGCCTGTGAC GTTCGGCCAA
      G T K V  E I K  R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 366

DOM-91 – SEQ ID NO.: 252

```
      D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C  R A S Q  Q I S  D E L N
1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCCGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCAGATTAGT GATGAGTTAA
      W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y A  V S I L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
101   ATTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GTGTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
      G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  W L S F  P S T  F G Q
201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TGGTTGAGTT TTCCTTCGAC GTTTGGCCAA
      G T K V  E I K  R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 367

DOM-92 – SEQ ID NO.: 253

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F V  D Y P M
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGTT GATTATCCGA
      G W V  R Q A  P G K G  L E W  V S T  I S T G  G F S  T Y Y  A D S V  K G R
101   TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCTACGG GGGGTTTTTC GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
      F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K A R
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGCGCGG
      Y Y Y L  S Q I  K N F  D Y W G  Q G T  L V T  V S S
301   TATTATTATC TTAGTCAGAT TAAGAATTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC
```

– SEQ ID NO.: 368

DOM-93 – SEQ ID NO.: 254

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F D  I Y G M
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT ATTTATGGGA
      T N V  R Q A  P G K G  L E W  V S S  I S P  L G L V  T Y Y  A D P V  K G R
101   TGACTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCAAGT ATTTCGCCTC TTGGTCTTGT TACATACTAC GCAGACCCCG TGAAGGGCCG
      F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K L K
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACTGAAG
      E H G D  V P F  D Y W  G Q G T  L V T  V S S
```

```
301  GAGCATGGGG ATGTTCCTTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
```
– SEQ ID NO.: 369

DOM-94 – SEQ ID NO.: 255

```
       E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  E  L  Y  P  M
1    GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG CTTTATCCGA
       S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  S  P  T  G  L  L  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101  TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTTCTCCTA CGGGTTTGTT GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
       F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  F  X
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAATTTAAG
       R  S  G  K  T  D  D  T  N  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301  AGGAGTGGGA AGACTGATGA TACTAATTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC
```
– SEQ ID NO.: 370

DOM-95 – SEQ ID NO.: 256

```
       E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  R  E  Y  D  M
1    GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCGG GAGTATGATA
       L  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  V  G  D  G  N  G  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101  TGCTGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTGTGGGGG ATGGTAATGG TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
       F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  Q  D
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGGAT
       R  Q  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301  CGTCAGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC
```
– SEQ ID NO.: 371

DOM-96 – SEQ ID NO.: 257

```
       E  V  Q  P  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  T  D  Y  K  M
1    GAGGTGCAGC CGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTACT GATTATAAGA
       L  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  S  P  S  G  R  W  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101  TGCTTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTTCTCCTA GTGGTCGTTG GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
       F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  S  L
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAGTCTT
       F  E  G  S  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301  TTTGAGGGTA GTTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC
```
– SEQ ID NO.: 372

DOM-97 – SEQ ID NO.: 258

```
       E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  E  E  Y  G  M
1    GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG GAGTATGGTA
       S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  S  P  I  G  V  T  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101  TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCGCCTA TTGGTGTTAC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
       F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  N  A
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAATGCT
       Y  D  R  K  S  N  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301  TATGATCGGA AGTCTAATTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
```
– SEQ ID NO.: 373

DOM-98 - SEQ ID NO.: 259

```
      E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F D R Y V M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT CGGTATGTGA
        V W V R Q A P G K D L E W V S G I T P S G R R T Y Y A D S V K G R
  101 TGGTGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG ATCTAGAGTG GGTCTCAGGT ATTACTCCGA GTGGTAGGAG GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I S R D N S K D T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K V L
  201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGGA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGTTG
        G R H F D P L L P S F D Y W G Q G T L V T V S S

  301 GGGCGTCATT TTGATCCTCT TCTGCCTTCG TTTGACTACT GGGGTCAGGG AACCCTGGTC ACCGTCTCGA GC - SEQ ID NO.: 374
```

DOM-99 - SEQ ID NO.: 260

```
      E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F E D Y A M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG GATTATGCTA
        S W V R Q A P G K G L E W V S T I T P G G F W T Y Y A D S V K G R
  101 TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTACTCCGG GTGGTTTTTG GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K T S
  201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAACGTCT
        S G E L Q L V E D F D Y W G Q G T L V T V S S

  301 AGTGGGGAGT TGCAGTTGGT TGAGGATTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC - SEQ ID NO.: 375
```

DOM-100 - SEQ ID NO.: 261

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q N I K H S L R
    1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GAGCAAGTCA GAATATTAAG CATTCGTTAC
        W Y Q Q K P G K A P K L L I Y H R S Q L Q S G V P S R F S G S G S G
  101 GGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATCAT CGTTCCCAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q V R H R P Y T F G Q
  201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTAGGCATC GTCCTTATAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R

  301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG - SEQ ID NO.: 376
```

DOM-101 - SEQ ID NO.: 262

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q A I G H R L R
    1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCT CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGCTATTGGG CATCGGTTAC
        W Y Q Q K P G K A P K L L I Y H R S K L Q S G V P S R F S G S G S G S
  101 GTTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAT CGGTCCAAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q V A L F P Y T F G Q
  201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTGCTTTGT TTCCCTATAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R

  301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG - SEQ ID NO.: 377
```

DOM-102 - SEQ ID NO.: 263

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q H I G H H L R
    1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTGGT CATCATTTAA
```

```
      W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y H  R S H L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
101 GGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CCAAGCTCCT GATCTATCAT AGGTCCCATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
      G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D S A  T Y Y  C Q Q  W D R P  P Y T  F G Q
201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTCTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TGGGATAGGC CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
      G T K V  E I K  R
301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 378

DOM-103 – SEQ ID NO.: 264

```
      D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  A I G  H R L R
  1 GACATCCAGA TGACCCAGTC CCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGCTATTGGG CATCGGTTAC
      W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y H  R S K L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
101 GTTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAT CGGTCCAAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
      G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  V R A V  P Y T  F G Q
201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTGCGGGCTG TGCCTTATAC GTTTGGCCAA
      G T K V  E I K  R
301 GGGACCAAGG TGGAAATTAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 379

DOM-104 – SEQ ID NO.: 265

```
      D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  A I G  H R L R
  1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGCTATTGGG CATCGGTTAC
      W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y H  R S K L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
101 GTTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAT CGGTCCAAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
      G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  V R F S  P Y T  F G Q
201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTCGTTTTT CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
      G T K V  E I K  R
301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 380

DOM-105 – SEQ ID NO.: 266

```
      D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  A I G  H R L R
  1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGCTATTGGG CATCGGTTAC
      W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y H  R S K L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
101 GTTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAT CGGTCCAAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
      G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  S Y A R  P V T  F G Q
201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TCTTATGCTA GGCCTGTGAC GTTCGGCCAA
      G T K V  E I K  R
301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 381

DOM-106 – SEQ ID NO.: 267

```
      D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  S I N  H R L Y
  1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA AAGTATTAAT CATAGGTTAT
      W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y H  R S R L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
101 ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAT CGGTCCAGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
      G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  Y K V R  P N T  F G Q
```

```
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAGGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATAAGGTTA GGCCTAATAC GTTCGGCCAA
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 382

DOM-107 – SEQ ID NO.: 268

```
       D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  A  I  G  H  R  L  R
  1  GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGCTATTGGG CATCGGTTAC
         W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  H  R  S  K  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101  GTTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATTTATCAT CGGTCCAAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
       G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  T  Y  S  S  P  N  T  F  G  Q
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTATTCGT CTCCTCATAC GTTCGGCCAA
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 383

DOM-108 – SEQ ID NO.: 269

```
       D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  A  I  G  H  R  L  R
  1  GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGCTATTGGG CATCGGTTAC
         W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  H  R  S  K  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101  GTTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAT CGGTCCAAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
       G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  R  A  V  R  P  F  T  F  G  Q
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTACAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGGCGGTGA GGCCTTTTAC GTTCGGCCAA
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGGACCAAAG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 384

DOM-109 – SEQ ID NO.: 270

```
       D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  A  I  G  H  R  L  R
  1  GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGCTATTGGG CATCGGTTAC
         W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  H  R  S  K  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101  GTTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAT CGGTCCAAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
       G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  T  Y  Y  R  P  L  T  F  G  Q
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTATTATC GTCCTCTTAC GTTCGGCCAA
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 385

DOM-110 – SEQ ID NO.: 271

```
       D  I  Q  M  T  Q  S  P  A  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  D  I  D  P  W  L  R
  1  GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCAGCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTGAT CCTATGTTAA
         W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  A  G  S  I  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101  GGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCG GGTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
       G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  T  S  I  R  P  Y  T  F  G  Q
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTAGTATTA GGCCTTATAC GTTCGGCCAA
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 386

DOM8-111 - SEQ ID NO.: 272

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F E  R Y P M
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG CGTTATCCTA
        T W V  R Q A  P G K G  L E W  V S T  I H G S  G S A  T Y Y  A D S V  K G R
101   TGACGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTCATGGTT CTGGTAGTGC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K G P
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGCCG
        Y T S R  H N S  L G H  F D Y W  G Q G  T L V  T V S S
301   TATACTAGTC GGCATAATAG TCTTGGGCAT TTTGACTACT GGGGTCAGGG AACCCTGGTC ACCGTCTCGA GC - SEQ ID NO.: 387
```

DOM-112 - SEQ ID NO.: 273

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F M  D Y P M
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTATG GATTATCCTA
        G W V  R Q A  P G K G  L E W  V S S  I G P V  G M S  T Y Y  A D S V  K G R
101   TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTGGGCCTG TTGGTATGAG TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K Y G
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAATATGGG
        G T S G  R H N  T K F  D Y W G  Q G T  L V T  V S S
301   GGGACTAGTG GTAGGCATAA TACTAAGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC - SEQ ID NO.: 388
```

DOM-113 - SEQ ID NO.: 274

```
      E V Q L  L F S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F T  E Y P M
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTACT GAGTATCCTA
        S W V  R Q A  P G K G  L E W  V S V  I S P L  G F T  T Y Y  A D S V  K G R
101   TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGTT ATTTCTCCTC TTGGTTTTAC GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K W T
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAATGGACT
        G G S G  I L N  S S F  D Y W G  Q G T  L V T  V S S
301   GGTGGGAGTG GTATTTTGAA TTCTTCTTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC - SEQ ID NO.: 389
```

DOM-114 - SEQ ID NO.: 275

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  R V S  N Y D L
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT TAGGGTTAGC AATTACGATT
        T W V  R Q A  P G K G  L E W  V S T  I S A T  N G S  T Y Y  A D S V  K G R
101   TGACCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTATCAACC ATTAGTGCCA CAAACGGTAG CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  A V T
201   GTTCACCATC TCCCGTGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTATTGCGC GGCAGTGACG
        W W L L  R H N  D N L  G F W G  Q G T  L V T  V S S
301   TGGTGGTTGT TGCGTCATAA CGACAACTTG GGGTTTTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC - SEQ ID NO.: 390
```

DOM-115 - SEQ ID NO.: 276

```
      E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F S I S Y K N M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT TAGCATTAGC TATAAGAATA
        A W V R Q A P G K G L E W V S A I K A A N G S T Y Y A D S V K G R
  101 TGGCCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTATCAGCC ATTAAGCCGG CAAACGGTAG CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A T G S
  201 GTTCACCATC TCCCGTGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTATTGCGC GACAGGGAGT
        Q K K R T Y T F D F W G Q G T L V T V S S
  301 CAGAAGAAGC GGACCTACAC GTTCGACTTT TGGGGTCAGG GAACCCTGGT CACCGTCTCG AGC - SEQ ID NO.: 391
```

DOM-120 - SEQ ID NO.: 277

```
      E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F R S Y T M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAGG TCTTATACGA
        G W V R Q A P G K G L E W V S S I N P M G Y Q T Y Y A D S V K G R
  101 TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTAATCCTA TGGGTTATCA GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K H G
  201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACATGGG
        V G K G T K P H N F D Y W G Q G T L V T V S S
  301 GTGGGGAAGG GTACTAAGCC GCATAATTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC - SEQ ID NO.: 392
```

DOM-121 - SEQ ID NO.: 278

```
      E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F E L Y R M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG CTGTATAGGA
        S W V R Q A P G K G L E W V S E I S G S G G R T I Y Y A D S V K G R
  101 TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGAG ATTAGTGGTA GTGGTTTTCC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S L
  201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAGTCTG
        H D K T Q H H Q E F D Y W G Q G T L V T V S S
  301 CATGATAAGA CTCAGCATCA TCAGGAGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC - SEQ ID NO.: 393
```

DOM-123 - SEQ ID NO.: 279

```
      E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F I E Y P M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTIATT GAGTATCCTA
        R W V R Q A P G K G L E W V S L I S P S G V F T Y Y A D S V K G R
  101 TGCGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCACTT ATTTCTCCGT CTGGTGTGTT TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G D
  201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGGAT
        E S S T F D Y W G Q G T L V T V S S
  301 GAGTCTAGTA CTTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC - SEQ ID NO.: 394
```

DOM-124 - SEQ ID NO.: 280

```
      E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K R Y D M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAG CGGTATGATA
```

```
      D  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  G  S  S  G  Y  P  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101   TGGATTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTGGGAGTT CGGGTTATCC GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  E  R  M
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GGAAAGGATG
        P  G  Y  F  P  G  F  A  R  Q  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301   CCTGGTTATT TTCCTGGGTT TGCTCGGCAG TTTGACTACT GGGGTCAGGG AACCCTGGTC ACCGTCTCGA GC
```

– **SEQ ID NO.: 395**

DOM-125 – SEQ ID NO.: 281

```
      E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  W  R  Y  A  M
  1   GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGG CGGTATGCTA
        G  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  N  D  E  G  R  E  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101   TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTAATGATG AGGGTCGGGA GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  K  R
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAAGCGG
        V  S  S  S  V  N  A  P  Y  E  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301   GTGTCTAGTT CTGTGAATGC TCCGTATGAG TTTGACTACT GGGGTCAGGG AACCCTGGTC ACCGTCTCGA GC
```

– **SEQ ID NO.: 396**

DOM-126 – SEQ ID NO.: 282

```
      E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  A  N  Y  S  M
  1   GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCG AATTATAGTA
        S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  D  R  L  G  T  H  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101   TGAGTTGGGT CCGCCAGGCC CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGATCGTC TTGGTACGCA TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  V  L
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA TACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTTTGC GAAAGTGCTG
        A  D  L  I  A  G  H  A  F  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301   GCTGATCTTA TTGCTGGGCA TGCGGAGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 397**

DOM-127 – SEQ ID NO.: 283

```
      E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  P  S  Y  D  M
  1   GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCCG TCGTATGATA
        A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  G  I  S  R  S  G  S  M  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101   TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGGG ATTTCGAGGT CTGGTTCTAT GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  G  V
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT TTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTGTT
        D  A  H  V  Y  Y  M  E  P  F  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301   GATGCGCATG TTTATTATAT GGAGCCTTTT TTTGACTACT GGGGTCAGGG AACCCTGGTC ACCGTCTCGA GC
```

– **SEQ ID NO.: 398**

DOM-128 – SEQ ID NO.: 284

```
      E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  E  R  Y  Q  M
  1   GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG AGGTATCAGA
        A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  S  D  G  G  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101   TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTAGTTCTG ATGGTGGGGG GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  P  G
```

```
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCGGGT
       T  V  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301  ACTGTTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 399**

DOM-129 – SEQ ID NO.: 285

```
         E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  P  K  Y  E  M
   1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACATTTCCG AAGTATGAGA
         A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  D  G  D  G  K  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
 101  TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTGATGGTG ATGGTAAGTC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
         F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  P  D
 201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCGGAT
         Q  F  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
 301  CAGTTTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 400**

DOM-130 – SEQ ID NO.: 286

```
         E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  T  A  S  G  F  T  F  A  G  Y  Q  M
   1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTACAG CCTCCGGATT CACCTTTGCG GGTTATCAGA
         S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  T  N  E  G  V  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
 101  TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTACTAATG AGGGTGTTTC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
         F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  P  G
 201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCGGGG
         K  Y  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
 301  AAGTATTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 401**

DOM-131 – SEQ ID NO.: 287

```
         E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  G  E  Y  E  M
   1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGGG GAGTATGAGA
         V  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  T  S  D  G  L  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
 101  TGGTGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCATCT ATTACGTCGG ATGGTCTGAG TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
         F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  P  G
 201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCTGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCGGGT
         I  R  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
 301  ATTCGTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 402**

DOM-132 – SEQ ID NO.: 288

```
         E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  A  D  Y  D  M
   1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCT GATTATGATA
         A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  G  I  V  D  D  G  L  M  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
 101  TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGGT ATTGTTGATG ATGGTCTTAT GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
         F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  P  D
 201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCGGAT
         V  A  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  N
```

```
301  GTTGCTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGGACC CTGGTCACCG TCTCGAAC
```
– **SEQ ID NO.: 403**

DOM-133 – SEQ ID NO.: 289

```
       E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F I  G Y A M
  1    GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTATT GGTTATGCTA
         A W V  R Q A  P G K  G L E W  V S S  I G P L  G A T  T Y Y  A D S V  K G R
 101     TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTGGTCCTT TGGGTGCGAC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
         F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K L P
 201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAATTGCCT
         A G T S  S H S  V D F  D Y W G  Q G T  L V T  V S S
 301     GCTGGTACGA GTAGTCATAG TGTGGATTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC
```
– **SEQ ID NO.: 404**

DOM-134 – SEQ ID NO.: 290

```
       E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F A  D Y E M
  1    GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCG GATTATGAGA
         T W V  R Q A  P G K  G L E W  V S S  I T S  D G V S  T Y Y  A D S V  K G R
 101     TGACTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTACTAGTG ATGGTGTTTC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
         F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K P S
 201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCGTCG
         V Q F  D Y W G  Q G T  L V T V  S S
 301     GTTCAGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC
```
– **SEQ ID NO.: 405**

DOM-135 – SEQ ID NO.: 291

```
       E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F R  R Y V M
  1    GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCGT AGGTATGTTA
         G W V  R Q A  P G K  G L E W  V S W  I E A  D G R T  T Y Y  A D S V  K G R
 101     TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATGG ATTGAGGCTG ATGGTCGTAC GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
         F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K G L
 201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGCTT
         T D Q H  V I E  F D Y  W G Q G  T L V  T V S  S
 301     ACGGATCAGC ATGTTATTGA GTTTGACTAC TGGGGTCAGG GAACCCTGGT CACCGTCTCG AGC
```
– **SEQ ID NO.: 406**

DOM-136 – SEQ ID NO.: 292

```
       E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F D  G Y R M
  1    GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT GGTTATCGTA
         G W V  R Q A  P G K  G L E W  V S S  I A P  D G N Y  T Y Y  A D S V  K G R
 101     TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGCTCCGG ATGGTAATTA TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
         F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K F W
 201     GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAATTTTGG
         G M Q F  D Y W  G Q G  T L V T  V S S
 301     GGGATGCAGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG C
```
– **SEQ ID NO.: 407**

DOM-137 - SEQ ID NO.: 293

```
      E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F A S Y P M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCT TCGTATCCGA
        G W V R Q A P G K G L E W V S S I G P I G F T T Y Y A D S V K G R
  101 TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTGGTCCTA TTGGTTTTAC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A E M K
  201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GGAAATGAAG
        S P Y K P Q F D Y W G Q G T L V T V S S
  301 TCGCCTTATA AGCCGCAGTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 408**

DOM-138 - SEQ ID NO.: 294

```
      E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L A Y W M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTTG GCTTATTGGA
        V W V R Q A P G K G L E W V S S I S P S G T H T Y Y A D S V K G R
  101 TGGTTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTTCTCCGT CGGGTACGCA TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A K Y T
  201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGTCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAATATACT
        E P G L G S F D Y W G Q G T L V T V S S
  301 GAGCCGGGGT TGGGTTCTTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 409**

DOM-139 - SEQ ID NO.: 295

```
      E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S N Y E M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG AATTATGAGA
        - G W V P Q A P C K C L D W V S V I S E v G b L T Y Y A D S V K G R
  101 TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGTG ATTTCTGAGG TGGGTTCTCT GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K P H
  201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCTCAT
        D S S I G F D Y W G Q G T L V T V S S
  301 GATAGTTCGA TTGGGTTTGA CTACTGGGGT CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 410**

DOM-141 - SEQ ID NO.: 296

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q W I G D T L T
    1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGG GATACGTTAA
        W Y Q Q K L G K A P K L L I Y G G S E L Q S G V P P R F S G S G S
  101 CGTGGTACCA GCAGAAACTA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGGT GGTTCCGAGT TGCAAAGTGG GGTCCCACCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q C I S S P C T F G Q
  201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TGTATTAGTA GTCCTTGTAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R
  301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– **SEQ ID NO.: 411**

DOM-142 - SEQ ID NO.: 297

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q F I G D S L S
    1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTTTATTGGT GATTCTTTAT
```

```
      W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  F  S  S  I  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101   CTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTTT TCTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
      G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  H  T  S  P  T  T  F  G  R
201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATACTT CGCCTACTAC GTTCGGCCGA
      G  T  K  V  K  I  K  R
301   GGGACCAAGG TGAAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 412

DOM-143 – SEQ ID NO.: 298

```
      D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  T  I  E  T  N  L  E
1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCCGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GACTATTGAG ACTAATTTAG
      W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  S  S  Q  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101   AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCCAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
      G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  L  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  H  G  Y  P  T  T  F  G  Q
201   TGGGACAGAT TTTACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTAG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATGGGT ATCCTACGAC GTTCGGCCAA
      G  T  K  V  E  I  K  R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 413

DOM-144 – SEQ ID NO.: 299

```
      D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  M  I  D  Q  D  L  E
1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GATGATTGAT CAGGATTTAG
      W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  N  A  S  W  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101   AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCGTCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGCG GCAGTGGATC
      G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  H  G  Y  P  I  T  F  G  Q
201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATGGTT ATCCTATTAC GTTCGGCCAA
      G  T  K  V  E  I  K  R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 414

DOM-145 – SEQ ID NO.: 300

```
      D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  T  I  Y  T  S  L  S
1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GACGATTTAT ACTTCGTTAA
      W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  H  Y  G  S  V  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101   GTTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCCATTAT GGTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
      G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  S  A  T  Y  Y  C  Q  Q  V  H  Q  A  P  T  T  F  G  Q
201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTCTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTCATCAGG CTCCTACGAC GTTCGGCCAA
      G  T  K  V  E  I  K  R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 415

DOM-146 – SEQ ID NO.: 301

```
      D  I  R  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  W  I  G  D  S  L  A
1     GACATCCGGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGG GATTCTTTAG
      W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  G  I  S  E  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101   CGTGGTACCA GCAGAAGCCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGGT ATTTCCGAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
      G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  S  A  T  Y  Y  C  Q  L  S  S  S  M  P  H  T  F  G  Q
```

```
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTCTG CTACGTACTA CTGTCAACTG TCTAGTAGTA TGCCTCATAC GTTCGGCCAA
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– **SEQ ID NO.: 416**

DOM-147 – SEQ ID NO.: 302

```
       D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  E  I  E  T  N  L  E
  1  GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGAGATTGAG ACGAATTTAG
       W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  S  S  H  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101  AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCGTCCCATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
       G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  H  Q  N  P  P  T  F  G  Q
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATCAGA ATCCTCCGAC GTTCGGCCAA
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGAACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– **SEQ ID NO.: 417**

DOM-149 – SEQ ID NO.: 303

```
       D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  W  I  G  R  Q  L  V
  1  GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGG AGGCAGTTAG
       W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  G  A  T  E  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101  TTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGGG GCGACCGAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTTAGTG GCAGTGGATC
       G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Q  S  K  G  P  L  T  F  G  H
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CAGTCGAAGG GTCCTCTTAC GTTCGGCCAT
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– **SEQ ID NO.: 418**

DOM-150 – SEQ ID NO.: 304

```
       D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  G  I  G  T  D  L  N
  1  GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGGATTGGT ACTGATTTAA
       W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  M  G  S  Y  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101  ATTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATATG GGTTCCTATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
       G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  I  Y  S  F  P  I  T  F  G  Q
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ATTTATTCTT TTCCTATTAC GTTCGGCCAA
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– **SEQ ID NO.: 419**

DOM-154 – SEQ ID NO.: 305

```
       D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  D  I  E  E  M  L  H
  1  GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTGAG GAGATGTTAC
       W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  F  G  S  L  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  R  S
101  ATTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTTT GGTTCCCTGT TGCAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTAGATC
       G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  H  H  T  R  P  Y  T  F  G  Q
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CATCATACTC GTCCTTATAC GTTCGGCCAA
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– **SEQ ID NO.: 420**

DOM-155 - SEQ ID NO.: 306

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I G M D L E
1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTGGG ATGGATTTAG
        W Y Q Q I P G K V P K L L I Y D A S Y L Q S G V P S R F S G S G S
101   AGTGGTACCA GCAGATACCA GGGAAAGTCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GCGTCCTATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y H K L P A T F G Q
201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATAAGC TTCCTGCGAC GTTTGGCCAA
        G T K V E I K R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

- SEQ ID NO.: 421

DOM-156 - SEQ ID NO.: 307

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I M D N L E
1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTATG GATAATTTAG
        W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S W L Q S G V P S R F S G S G S
101   AGTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCG GCGTCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y H K L P V T F G Q
201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATAAGT TGCCTGTGAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

- SEQ ID NO.: 422

DOM-157 - SEQ ID NO.: 308

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q N I G E D L E
1     CACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GAGCAAGTCA GAATATTGGG GAGGATTTAG
        W Y Q Q K P G N A P K L L I Y S A S H L Q S G V P S R F S G S G S
101   AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAATGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGT GCGTCCCATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y S S Y P V T F G Q
201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATTCTAGTT ATCCTGTTAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

- SEQ ID NO.: 423

DOM-158 - SEQ ID NO.: 309

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q P I D E D L E
1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CCGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCCGATTGAT GAGGATTTAG
        W Y Q Q K P G N A P K L L I Y S A S Y L Q S G V P S R F S G S G S
101   AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAATGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGT GCGTCCTATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G T D F T L T I S R L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y H L L P A T F G Q
201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG ACTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATCTTC TGCCTGCTAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

- SEQ ID NO.: 424

DOM-159 - SEQ ID NO.: 310

```
      D I Q M I Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I N E D L E
  1 GACATCCAGA TGATCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTAAT GAGGATTTAG
        W Y Q Q K P G K A P K L L I Y N A S M L Q S G V P S R F S G S G S
101 AGTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCTTCCATGT TGCAAAGCGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G T D F T L T I S S L Q P K D F A T Y Y C Q Q Y H T N P T T F G Q
201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT AAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATACTA ATCCTACTAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R
301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 425

DOM-160 – SEQ ID NO.: 311

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I E A D L E
  1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTGAG GCGGATTTAG
        W Y Q Q K P G K A P K L L I Y H S S E L Q S G V P S R F S G S G S
101 AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAT TCTTCCGAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GAAGTGGATC
        G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y H M S P V T F G Q
201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATATGT CGCCTGTGAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R
301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 426

DOM-161 – SEQ ID NO.: 312

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I D S D L E
  1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTGAT AGTGATTTAG
        W Y Q Q K P G K A P M L L I Y S S S D L Q S G V P S R F S G S G S
101 AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTATGCTCCT GATCTATTCT TCGTCCGATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y H S L P V T F G Q
201 GGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATAGTC TGCCTGTTAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R
301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 427

DOM-162 – SEQ ID NO.: 313

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I S D D L E
  1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTTCG GATGATTTAG
        W Y Q Q K P G K A P K L L I Y N S S F L Q S G V P S R F S G S G S
101 AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT TCGTCCTTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G A D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y H S L P V T F G Q
201 TGGGGCAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATAGTT TGCCTGTTAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R
301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 428

DOM-163 – SEQ ID NO.: 314

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I E G N L E
  1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTGAG GGTAATTTAG
        W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D S S Q L Q S G V P S R F S G S G S
```


943

```
101  AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCGTCCCAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGGTC
       G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  H  H  L  P  T  T  F  G  Q
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATCATC TTCCTACGAC GTTCGGCCAA
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– **SEQ ID NO.: 429**

DOM-164 - SEQ ID NO.: 315

```
         D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  S  I  D  T  D  L  E
1    GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGTATTGAT ACGGATTTAG
         W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  G  S  W  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101  AGTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GGGTCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
       G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  R  W  I  P  V  T  F  G  Q
201  TGGGACAGAT TTTACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCGGTGGA TTCCTGTTAC GTTCGGCCAA
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– **SEQ ID NO.: 430**

DOM-165 - SEQ ID NO.: 316

```
         D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  S  I  S  T  D  L  E
1    GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGTATTAGT ACTGATTTAG
         W  Y  Q  Q  K  L  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  A  S  L  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101  AGTGGTACCA GCAGAAACTA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GCTTCCCTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
       G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  S  S  L  P  V  T  F  G  Q
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATTCGAGTC TGCCTGTTAC GTTCGGCCAA
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– **SEQ ID NO.: 431**

DOM-166 - SEQ ID NO.: 317

```
         D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  P  I  T  T  S  L  E
1    GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCCTATTACG ACGTCTTTAG
         W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  A  S  M  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101  AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GCGTCCATGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
       G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  W  V  T  P  V  T  F  G  Q
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATTGGGTTA CGCCTGTTAC GTTCGGCCAA
       G  T  K  V  E  I  K  R
301  GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– **SEQ ID NO.: 432**

DOM-167 - SEQ ID NO.: 318

```
         D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  N  I  H  T  N  L  E
1    GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACCTGCC GGGCAAGTCA GAATATTCAT ACGAATTTAG
         W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  G  S  M  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101  AGTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GGTTCCATGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
       G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  S  A  N  P  V  T  F  G  Q
201  TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATTCGGCTA ATCCTGTTAC GTTCGGCCAA
```

```
      G  T  K  V  G  I  K  R
301   GGGACCAAGG TGGGAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 433

DOM-168 – SEQ ID NO.: 319

```
      D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  W  I  H  T  D  L  E
1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTCAT ACGGATTTAG
        W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  G  S  M  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101   AGTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GGTTCCATGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  S  V  S  P  V  T  F  G  Q
201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATAGTGTGT CGCCTGTTAC GTTCGGCCAA
      G  T  K  V  E  I  K  R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 434

DOM-169 – SEQ ID NO.: 320

```
      D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  S  I  D  N  N  L  E
1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGTATTGAT AATAATTTAG
        W  Y  Q  Q  K  P  G  E  A  P  K  L  L  I  Y  D  G  S  L  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101   AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGGAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GGGTCCCTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  H  L  H  P  V  T  F  G  Q
201   TGGGACAGAT TTCACTCTTA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATCTTC ATCCTGTTAC GTTCGGCCAA
      G  T  K  V  E  I  K  R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 435

DOM-170 – SEQ ID NO.: 321

```
      D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  D  I  D  T  N  L  E
1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGATATTGAT ACGAATTTAG
        W  Y  Q  Q  K  P  G  E  A  P  K  L  L  I  Y  D  R  S  T  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101   AGTGGTATCA GCAGAAACCA GGGGAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT CGTTCCACGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  D  S  Y  P  V  T  F  G  Q
201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATGATTCTT ATCCTGTGAC GTTCGGCCAA
      G  T  K  V  E  I  K  R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 436

DOM-171 – SEQ ID NO.: 322

```
      D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  S  I  E  S  N  L  E
1     GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTCTATTGAG TCTAATTTAG
        W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  N  A  S  E  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
101   AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCGTCCGAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  R  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  Y  D  Q  W  P  T  T  F  G  Q
201   TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCGACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATGATCAGT GGCCTACGAC GTTCGGCCAA
      G  T  K  V  E  I  K  R
301   GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
```

– SEQ ID NO.: 437

DOM-172 - SEQ ID NO.: 323

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q A I G N T L R
    1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACT ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGCTATTGGT AATACTTTAC
        W Y Q Q K P G K A P K L L I Y L S S R L Q S G V P S R F S G S G S
  101 GGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCTT AGTTCCAGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q L K K P P Y T F G Q
  201 TGGGACAGAT TTTACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CTGAAGAAGC CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R
  301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG - SEQ ID NO.: 438
```

DOM-173 - SEQ ID NO.: 324

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q K I K N R L A
    1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTAAG AATCGGTTAG
        W Y Q Q K P G K A P K L L I Y E V S H L Q S G V P S R F S G S G S
  101 CGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAG GTTTCCCATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G T D F T L T I G S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R R Q S P Y T F G Q
  201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCGGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGAGGCAGT CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R
  301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG - SEQ ID NO.: 439
```

DOM-174 - SEQ ID NO.: 325

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S E D I G E E L F
    1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTACCAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTGA GGATATTGGG GAGGAGTTAT
        W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S T L Q S E V P S R F S G S G S
  101 TTTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTCG GCGTCCAGT TGCAAAGTGA GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G T D F T L T I S S L Q H E D F A T Y Y C Q Q V Y E W P Y T F G Q
  201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACAT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTTATGAGT GGCCTTATAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R
  301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG - SEQ ID NO.: 440
```

DOM-175 - SEQ ID NO.: 326

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q P I S G G L R
    1 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCCTATTTCT GGGGGTTTAA
        W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S T S M L Q S G V P S R F S G S G S
  101 GGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTCT ACTTCCATGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
        G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q L Y S A P Y T F G Q
  201 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CTTTATTCTG CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
        G T K V E I K R
  301 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG - SEQ ID NO.: 441
```

DOM-176 - SEQ ID NO.: 327

```
      E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F D A Y E M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT GCGTATGAGA
```


SEQ

```
      G  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  I  I  D  W  D  G  N  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101   TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAATT ATTGATTGGG ATGGTAATTC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  P  G
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCTGGG
        D  N  V  G  I  F  D  Y  W  G     Q  G  T  L     V  T  V     S  S
301   GATAATGTTG GTATTTTTGA CTACTGGGGT CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCGAGC - SEQ ID NO.:  442
```

DOM-177 - SEQ ID NO.: 328

```
      E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  N  Y  Y  M
  1   GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC CCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAGT AATTATTATA
        V  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  A  I  D  E  W  G  F  A  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101   TGGTGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCG ATTGATGAGT GGGGTTTTGC GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  H  W
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACATTGG
        E  F  T  S     D  T  S     R  F  D     Y  W  G  Q     G  T  L     V  T  V     S  S
301   GAGTTTACGT CTGATACGTC GCGTTTTGAC TACTGGGGTC AGGGAACCCT GGTCACCGTC TCGAGC - SEQ ID NO.:  443
```

DOM-178 - SEQ ID NO.: 329

```
      E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  E  D  F  D  M
  1   GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC CCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG GATTTTGATA
        A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  N  D  Q  G  S  L  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101   TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTAATGATC AGGGTTCTCT GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  P  D
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACTTGAT
        Q  F  F  D  Y  W  C  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301   CAGTTTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC - SEQ ID NO.:  444
```

DOM-179 - SEQ ID NO.: 330

```
      E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  A  Y  D  M
  1   GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC CCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAGT GCTTATGATA
        M  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  R  I  S  P  Q  G  Q  R  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101   TGATGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCACGG ATTAGTCCTC AGGGTCAGCG GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  I  R
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAATTCGT
        G  Q  S  R  I  P  M  R  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V
301   GGGCAGTCGC GGATTCCTAT GAGGTTTGAC TACTGGGGTC AGGGAACCCT GGTC - SEQ ID NO.:  445
```

DOM-180 - SEQ ID NO.: 331

```
      E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  T  D  Y  E  M
  1   GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC CCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTACG GATTATGAGA
        G  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  T  S  L  G  E  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101   TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTACTAGTT TGGGTGAGAG TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  P  G
```

```
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCTGGT
       R  I  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301  CGTATTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 446**

DOM-181 – SEQ ID NO.: 332

```
         E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  A  F  Y  P  M
  1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCT TTTTATCCTA
       M  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  W  I  D  A  T  G  T  R  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101  TGATGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATGG ATTGATGCTA CGGGTACGAG GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
       F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  E  G  N
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GGAAGGTAAT
       Y  G  S  S  Y  T  M  G  V  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301  TATGGGAGTT CGTATACTAT GGGGGTTTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 447**

DOM-182 – SEQ ID NO.: 333

```
         E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  D  E  Y  P  M
  1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT GAGTATCCGA
       Y  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  G  P  S  G  P  N  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101  TGTATTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGGTCCTT CTGGTCCGAA TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
       F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  S  P
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAATCTCCG
       Y  F  D  V  I  P  S  Y  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301  TATTTTGATG TTATTCCTAG TTATTTTGAC TACTGGGGTC AGGGAACCCT GGTCACCGTC TCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 448**

DOM-183 – SEQ ID NO.: 334

```
         E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  A  D  Y  G  M
  1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCG GATTACGGTA
       G  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  Q  S  S  G  L  R  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101  TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTCAGTCGT CGGGTTTGCG GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
       F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  R  A
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACGGGCT
       N  S  R  R  G  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301  AATTCTCGTA GGGGTTTTGA CTACTGGGGT CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 449**

DOM-184 – SEQ ID NO.: 335

```
         E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  D  Y  E  M
  1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCT GATTATGAGA
       M  N  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  T  S  H  G  G  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101  TGATGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTACTAGTC ATGGTGGGTC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
       F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  P  D
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCTGAT
       K  D  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301  AAGGATTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 450**

DOM-185 - SEQ ID NO.: 336

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F A  H Y P M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCG CATTATCCGA
      S W V  R Q A  P G K G  L E W  V S S  I G R L  G N R  T Y Y  A D S V  K G R
  101 TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGGTAGGC TGGGTAATCG TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
      F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K R A
  201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACGTGCT
      T P V P  I K G  L F D  Y W G Q  G T L  V T V  S S
  301 ACGCCTGTGC CGATTAAGGG TTTGTTTGAC TACTGGGGTC AGGGAACCCT GGTCACCGTC TCGAGC - SEQ ID NO.: 451
```

DOM-186 - SEQ ID NO.: 337

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G L  T F G  P Y E M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGACT CACCTTTGGG AGGTATGAGA
      A W V  R Q A  P G K G  L E W  V S S  I D S D  G W V  T Y Y  A D S V  K G R
  101 TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTGATTCGG ATGGTTGGGT GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
      F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  Q F D
  201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GCAACCGGAT
      S L F D  Y W G  Q G T  L V T V  S S
  301 TCGTTGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC - SEQ ID NO.: 452
```

DOM-187 - SEQ ID NO.: 338

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F S  S Y S M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCT AGTTATTCTA
      V W V  R Q A  P G K G  L E W  V S G  I N R G  G T R  T Y Y  A D S V  K G R
  101 TGGTGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGGT ATTAATCGGG GTGGTACTCG TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
      F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K G W
  201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTTGG
      R R G F  D Y W  G Q G  T L V T  V S S
  301 AGGAGGGGGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG C - SEQ ID NO.: 453
```

DOM-188 - SEQ ID NO.: 339

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F T  R Y R M
    1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTACG CGTTATAGGA
      S W V  R Q A  P G K G  L E W  V S G  I S R D  G Y R  T Y Y  A D S V  K G R
  101 TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCAGGG ATTTCGAGGG ATGGTTATCG GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
      F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K G M
  201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTATG
      T A S F  D Y W  G Q G  T L V T  V S S
  301 ACTGCGTCGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG C - SEQ ID NO.: 454
```

DOM-189 - SEQ ID NO.: 340

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F Q  M Y P M
  1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCAG ATGTATCCGA
      G W V  R Q A  P G K  G L E W  V S M  I E P  A G D L  T Y Y  A D S V  K G R
101 TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAATG ATTGAGCCGG CTGGTGATCT TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
      F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K Y Q
201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAATATCAG
      E Q P W  F D Y  W G Q  G T L V  T V S  S
301 GAGCAGCCTT GGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC - SEQ ID NO.: 455
```

DOM-190 - SEQ ID NO.: 341

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F S  M Y D M
  1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAGT ATGTATGATA
      H W V  R Q A  P G K  G L E W  V S T  I L S  D G T  D T Y  Y A D S  V K G R
101 TGCATTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTTGTCTG ATGGTACGGA TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
      F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  A Y G
201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAATATGGG
      A M F D  Y W G  Q G T  L V T V  S S
301 GCTATGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC - SEQ ID NO.: 456
```

DOM-191 - SEQ ID NO.: 342

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F K  L Y P M
  1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAG TTGTATCCGA
      T W V  R Q A  P G K  G L E W  V S S  I D A  G G H  E T Y  Y A D S  V K G R
101 TGACCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTGATGTCT? GGGGTTATTA GACATACTAC GCAGACTCCG TCAACCCCCC
      F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K D W
201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGATTGG
      W D Y L  F D Y  W G Q  G T L V  T V S  S
301 TGGGATTATC TGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC - SEQ ID NO.: 457
```

DOM-192 - SEQ ID NO.: 343

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F S  R Y P M
  1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG CGGTATCCGA
      S W V  R Q A  P G K  G L E W  V S S  I N R  S G M  R T Y  Y A D S  V K G R
101 TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTAATCGTT CGGGTATGCG GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
      F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  E G H
201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GGAAGGGCAT
      Q A P F  D Y W  G Q G  T L V T  V S S
301 CAGGCGCCGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG C - SEQ ID NO.: 458
```

DOM-193 - SEQ ID NO.: 344

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F T  G Y A M
  1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTACG GGGTATGCTA
      S W V  R Q A  P G K  G L E W  V S T  I N A  N G I  R T Y  Y A D S  V K G R
```

```
101  TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTAATGCGA ATGGTATTCG GACATACTAC GCCGACTCCG TGAAGGGCCG
       F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  G  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  G  G
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACGGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGGGG
       V  W  R  W  G  T  G  H  K  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301  GTTTGGAGGT GGGGGACTGG GCATAAGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC
```

– SEQ ID NO.: 459

DOM-194 – SEQ ID NO.: 345

```
         E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  K  Q  Y  D  M
  1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAG CAGTATGATA
       R  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  T  I  S  Q  N  G  T  K  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101  TGCGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCGCAGA ATGGTACTAA GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
       F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  S  R
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAATCGAGG
       T  G  R  Y  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
301  ACTGGTAGGT ATTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC
```

– SEQ ID NO.: 460

DOM-195 – SEQ ID NO.: 346

```
         E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  G  T  Y  D  M
  1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGGG ACTTATGATA
       G  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  R  I  N  W  Q  G  D  R  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101  TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGG ATTAATTGGC AGGGTGATCG TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
       F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  A  G
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGCGGGG
       F  G  R  I  V  D  G  L  G  F  D  I  W  G  Q  G  L  V  I  V  S  S
301  TTTGGTCATT ATGTTGATGG TCTTGGGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC
```

– SEQ ID NO.: 461

DOM-196 – SEQ ID NO.: 347

```
         E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  G  Y  E  M
  1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAGT GGGTATGAGA
       A  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  T  D  M  G  D  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101  TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTACTGATA TGGGTGATTC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
       F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  P  G
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCTGGG
       T  A  F  D  Y  W  G  P  G  T  L  V  T  V  S  S
301  ACTGCGTTTG ACTACTGGGG TCCGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC
```

– SEQ ID NO.: 462

DOM-197 – SEQ ID NO.: 348

```
         E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  A  K  Y  K  M
  1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCG AAGTATAAGA
       W  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  T  P  K  G  H  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
101  TGTGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTACTCCGA AGGGTCATTC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
       F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  R  P
201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAGGCCG
```

```
      M T P F  D Y W  G Q G  T L V T  V S S
301   ATGACTCCGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG C
```

– SEQ ID NO.: 463

DOM-198 – SEQ ID NO.: 349

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F E  R Y N M
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG CGGTATAATA
        S W V  R Q A  P G K  G L E W  V S S  I R P R  G G K  T Y Y  A D S V  K G R
101   TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTCGGCCGC GGGGTGGGAA GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K W R
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAATGGCGG
        R E G Y  T G S  K F D  Y W G Q  G T L  V T V  S S
301   CGGGAGGGGT ATACTGGTTC TAAGTTTGAC TACTGGGGTC AGGGAACCCT GGTCACCGTC TCGAGC
```

– SEQ ID NO.: 464

DOM-199 – SEQ ID NO.: 350

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F E  R Y G M
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG AGGTATGGTA
        T W V  R Q A  P G K  G L E W  V S S  I W P R  G Q K  T Y Y  A D S V  K G R
101   TGACTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCAAGT ATTTGGCCGA GGGGTCAGAA GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K G N
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGAAT
        S R Y V  F D Y  W G Q  G T L V  T V S  S
301   AGTCGGTATG TTTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC
```

– SEQ ID NO.: 465

DOM-200 – SEQ ID NO.: 351

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F T  N Y S M
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTACT AATTATAGTA
        G W V  R Q A  P G K  G L E W  V S T  I R P N  G T K  T Y Y  A D S V  K G R
101   TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTCGTCCTA ATGGTACTAA GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K R S
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACGGTCG
        S A H L  Q R F  D Y W  G Q G T  L V T  V S S
301   TCTGCGCATC TTCAGAGGTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
```

– SEQ ID NO.: 466

DOM-201 – SEQ ID NO.: 352

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F G  N Y S M
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGGT AATTATTCGA
        G W V  R Q A  P G K  G L E W  V S S  I G R H  G G R  T Y Y  A D S V  K G R
101   TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGGTCGTC ATGGTGGGCG TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K K G
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAAGGGG
        S T Y P  R F D  Y W G  Q G T L  V T V  S S
301   AGTACTTATC CTAGGTTTGA CTACTGGGGT CAGGGAACCC TGGTCACCGT CTCGAGC
```

– SEQ ID NO.: 467

DOM-202 - SEQ ID NO.: 353

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C T A  S G F  T F S  H Y E M
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTACAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG CATTATGAGA
        G W V  R Q A  P G K  G L E W  V S S  I R P F  G G G  T Y Y  A D S V  K G R
101   TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTGAGCCTT TTGGTGGTGG GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K V Y
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGTAT
        P Q G S  F D Y  W G Q  G T L V  T V S  S
301   CCTCAGGGTT CTTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC
```

– **SEQ ID NO.: 468**

DOM-203 - SEQ ID NO.: 354

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F S  N Y T M
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAGT AATTATACTA
        G W V  R Q A  P G K  G L E W  V S S  I R P D  G K I  T Y Y  A D S V  K G R
101   TGGGGTGGGT CCGTCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTCGGCCTG ATGGTAAGAT TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  E V Y
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GGAAGTTTAT
        S S C A  N C T  P L L  F D Y  W G Q  G T L  V T V  S S
301   TCTTCGTGTG CGATGTGTAC TCCGCTTTTG TTTGACTACT GGGGTCAGGG AACCCTGGTC ACCGTCTCGA GC
```

– **SEQ ID NO.: 469**

DOM-204 - SEQ ID NO.: 355

```
      E V Q L  L A S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F K  R Y S M
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGGGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGAtt cACCTTTAAG CGGTATTCCA
        A W V  R Q A  P G K  G L E W  V S D  I G P R  G F S  T Y Y  A D S V  K G R
101   TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGAT ATTGGGCCGA GGGGTTTTTC GACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
      · F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K V G
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGGGT
        R G Q R  D T S  Q P F  D Y W G  Q G T  L V T  V S S
301   CGTGGTCAGC GTGATACTAG TCAGCCGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 470**

DOM-205 - SEQ ID NO.: 356

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F A  S Y Q M
1     GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCT TCTTATCAGA
        A W V  R Q A  P G K  G L E W  V S G  I T S G  G L S  T Y Y  A D S V  K G R
101   TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGGG ATTACTTCGG GTGGTCTTAG TACGTACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        P T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K P G
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCGGGG
        R G F D  Y W G  Q G T  L V T V  S S
301   AGGGGTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC
```

– **SEQ ID NO.: 471**

DOM-206 - SEQ ID NO.: 357

```
      E V Q L  L E S  G G G  L V Q P  G G S  L R L  S C A A  S G F  T F A  S Y E M
```

```
   1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGTGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCT TCTTATGAGA
        T  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  G  I  S  S  D  G  L  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
 101  TGACTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGGG ATTTCTTCTG ATGGTCTGTC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  P  G
 201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCGGGG
        V  L  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
 301  GTGTTGTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC
```

– SEQ ID NO.: 472

DOM-207 – SEQ ID NO.: 358

```
        E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  D  K  Y  L  M
   1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTGAT AAGTATTTGA
        ·  S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  G  I  E  P  L  G  D  V  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
 101  TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTGAGCCTC TGGGTGATGT TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        ·  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  E  A
 201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGAGGCT
        S  G  D  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
 301  TCGGGGGATT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG C
```

– SEQ ID NO.: 473

DOM-208 – SEQ ID NO.: 359

```
        E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  T  E  Y  E  M
   1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGGTT CACCTTTACT GAGTATGAGA
        S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  D  N  V  G  S  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
 101  TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTGATAATG TGGGTAGTAG TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
        F  T  I  S  R  D  N  ь  A  N  T  L  Y  L  Q  M  N  ς  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  P  G
 201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCTGGG
        K  L  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
 301  AAGCTTTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC
```

– SEQ ID NO.: 474

DOM-209 – SEQ ID NO.: 360

```
        E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  A  D  Y  E  M
   1  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGCT GATTATGAGA
        W  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  A  I  S  R  Q  G  F  A  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R
 101  TGTGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCG ATTTCTAGGC AGGGTTTTGC TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAAGGCCG
        F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  D  L
 201  GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGATCTG
        E  R  D  D  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
 301  GAGCGGGATG ATTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC
```

– SEQ ID NO.: 475

Entre los clones de DOM descritos, se ha hecho un número de observaciones con respecto a la homología entre los clones, y propiedades de los aminoácidos predichos en posiciones particulares en el dAbs anti-CD40L. Estas se muestran en las Tablas 9 y 10 siguientes:

Tabla 9. Predicciones para clones CD40L anti-VH: (utilizando el código estándar de aminoácido de una sola letra)

Número predicho de aminoácido relativo a la secuencia simulada	Numeración Kabat predicha	Aminoácido simulado en esta posición	Propiedades de aminoácidos frecuentemente encontradas en la posición designada en dAbs anti-CD40L	Aminoácidos frecuentemente encontrados en la posición designada en dAbs anti-CD40L
30	30	S	Ácido; pequeño	D, E, A, G
33	33	A	mezcla	Q, E, P, G
35	35	S	mezcla	A, M, G, T
50	50	A	nucleofílico; o G, W	S, T, G, W
52	52	S	hidrofílico; o G, D, N	T, S, G, D, N
53	53	G	mezcla	P, R, S, D
54	54	S	Ácido; o L, I, Q	D, E, L, I, Q
99*	95	S	hidrofóbico; o P, G	P, F, V, L
100	96	Y	mezcla	G, D, R, L

* Si el aminoácido en la posición 99 (simulada) es P entonces G o D se encuentra frecuentemente en la posición 100.

Tabla 10. Predicciones para clones CD40L anti-VK:

Número predicho de aminoácido relativo a la secuencia simulada	Numeración de Kabat predicha	Aminoácido simulado en esta posición	Propiedades de aminoácidos frecuentemente encontradas en la posición diseñada en anti-CD40L dAbs	Aminoácidos frecuentemente encontrados en la posición designada en anti-CD40L dAbs
28*	28	S	mezcla	A, D, W, P
30	30	S	Ácido; o G	G, D, E
32	32	Y	mezcla	R, S, D, N
34**	34	N	Ácido o básico	R, E
50	50	A	mezcla	H, D, G, S
51	51	A	mezcla	S, G, R
53	53	S	hidrofóbico, p K, E	I, L, M, K, E, W
91	91	S	mezcla	Y, R, V
92	92	Y	básico; o S, W	H, S, W, R
96	96	N	mezcla	Y, V, A, T

*Si el aminoácido en la posición 28 (simulada) es D entonces E se encuentra frecuentemente en la posición 34.

**Si el aminoácido en la posición 34 (simulada) es E entonces Y se encuentra frecuentemente en la posición 91 y H o D en la Posición 92.

Ejemplo 8: PEGilación de DOM8-24

La PEGilación de maleimida de sitio específico de DOM8-24 requiere una cisteína accesible solvente para ser proporcionada en la superficie de la proteína, en este ejemplo, en el C terminal. El residuo de cisteína, una vez reducida para proporcionar el tiol libre, puede ser posteriormente utilizado para acoplar específicamente la proteína a PEG vía un amplio rango de químicos tales como maleimida u otro tiol para proporcionar un disulfuro. Un amplio rango de PEGs químicos modificados de diferentes tamaños y formatos

ramificados están disponibles de Nektar (formalmente conocido como Shearwater Corp). Esto permite que el monómero básico dAb-cys sea formateado en una variedad de formas por ejemplo como un monómero, dímero, trímero, tetrámero, etc. PEGilado. El tamaño de los PEGs está dado en kDa pero también puede referirse como K (esto es, "40K PEG" = 40 kDa PEG).

Construcción por PCR de DOM8-24cys

El sitio de unión para el PEG puede ser ubicado en cualquier lugar de la superficie del dAb en la medida que el aminoácido marcado es solvente accesible y la proteína PEGilada resultante aún mantiene el enlace de antígeno. Por lo tanto también es posible diseñar la cys dentro de cualquiera de los marcos 1-4 del dAb para PEGilación y sigue manteniendo algo de enlace de antígeno. Los siguientes oligonucleótidos se utilizaron para específicamente PCR DOM8-24 con unos sitios *Sal*I y *Bam*HI para clonación y también para introducir un reiduo de cisteína C terminal.

```
    SalI
  ~~~~~~~~
Ala Ser Thr Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
Val


 1  GCG TCG ACG GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG
    GTA
    CGC AGC TGC CTC CAC GTC GAC AAC CTC AGA CCC CCT CCG AAC
    CAT

    Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
    Phe
46  CAG CCT GGG GGG TCC CTG CGT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA
    TTC
    GTC GGA CCC CCC AGG GAC GCA GAG AGG ACA CGT CGG AGG CCT
    AAG

    Thr Phe Ser Asn Tyr Gln Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro
    Gly
91  ACC TTT AGT AAT TAT CAG ATG GCG TGG GTC CGC CAG GCT CCA
    GGG
    TGG AAA TCA TTA ATA GTC TAC CGC ACC CAG GCG GTC CGA GGT
    CCC
```

```
     Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Thr Ser Glu Gly Gly
     Ser
136  AAG GGT CTA GAG TGG GTC TCA AGT ATT ACT AGT GAG GGT GGT
     TCG
     TTC CCA GAT CTC ACC CAG AGT TCA TAA TGA TCA CTC CCA CCA
     AGC

     Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
     Arg
181  ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC
     CGC
     TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG
     GCG

     Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
     Arg
226  GAC AAT TCC AAG AAC ACA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG
     CGT
     CTG TTA AGG TTC TTG TGT GAC ATA GAC GTT TAC TTG TCG GAC
     GCA

     Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Gly Lys
     Asn
271  GCC GAG GAC ACC GCG GTA TAT TAC TGT GCG AAA CCG GGT AAG
     AAT
     CGG CTC CTG TGG CGC CAT ATA ATG ACA CGC TTT GGC CCA TTC
     TTA


     Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Cys
     ***
316  TTT GAC TAC TGG GGT CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG TGC
     TAA
     AAA CTG ATG ACC CCA GTC CCT TGG GAC CAG TGG CAG AGC ACG
     ATT

          BamHI
          ~~~~~~~
     *** Gly Ser   (SEQ ID NI: 85)
361  TAA GGA TCC   (SEQ ID NO: 83)
     ATT CCT AGG   (SEQ ID NO: 84)
```

La secuencia de ADN de los cebadores de PCR utilizados para amplificar el dAb diseñado se muestra a continuación.

Cebador directo

5'-AGTGCGTCGACGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCT-3' (SEQ ID NO: 86)

Cebador inverso

5'-AAAGGATCCTTATTAGCACGAGACGGTGACCAGGGTTCCCTG-3' (SEQ ID NO 87)

Se montó la reacción de la PCR (volumen 50 µL) tal como sigue: 200µM de dNTP, 0.4µM de cada cebador, 5 µL de 10x *Pfu*Turbo solución amortiguadora (Stratagene), 100 ng de plásmido molde (DOM8-24), 1µL de enzima *Pfu*Turbo (Stratagene) y se ajustó el volumen hasta 50µL utilizando agua estéril. Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: paso de desnaturalización inicial 94 °C durante 2 mins, posteriormente 25 ciclos de 94 °C durante 30 segs, 64 °C durante 30 seg y 72 °C durante 30 seg. También se incluyó un paso final de extensión de 72 °C durante 5 mins. El producto de la PCR se purificó y se sometió a digestión con *Sal*I y *Bam*HI y se unió dentro del vector (pDOM5) el cual también había sido cortado con las mismas enzimas de restricción Se verificaron los clones correctos por medio de secuenciamiento de ADN.

Expresión y purificación de DOM8-24

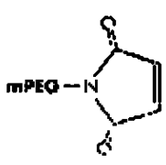
El vector DOM8-24 se transformó dentro de las células electro-competentes HB2151. Se seleccionaron las células que portan el plásmido de dAb para utilización de carbenicilina 100 µg/mL. Los cultivos se montaron en frascos divididos de 2L que contienen 500 mL de medio de cultivo terrific broth (Sigma-Aldrich) y carbenicilina 100 µg/mL. Los cultivos crecieron a 30 °C a 200 rpm hasta un O.D.600 de 1-1.5 y posteriormente se indujeron conIPTG 1mM (isopropil-beta-D-tiogalactopiranósido, de Melford Laboratories). Se permitió que continuara la expresión del dAb durante 12-16 hrs a 30 °C. Se encontró que la mayoría del dAb estaba presente en el medio de cultivo. Por lo tanto, las células se separaron del medio mediante centrifugación (8,000Xg durante 30 mins), y el sobrenadante se utilizó para purificar el dAb. Por litro de

sobrenadante, se adicionaron 10 mL de Línea de Flujo de Proteína A (Amersham Biosciences) y se permitió que el dAb se uniera al lote con agitación durante 3 horas a temperatura ambiente, o durante la noche a 4 °C. Se permitió que la resina se asentara bajo acción de la gravedad durante una hora antes de que se removiera el sobrenadante. Posteriormente se empacó la agarosa dentro de una columna XK 16 (Amersham Pharmacia) y se lavó con 10 volúmenes de columna de 2xPBS. Se eluyó el dAb enlazado con glicina 100 mM pH 3.0 y posteriormente se neutralizaron las fracciones que contienen proteína mediante la adición de 1/5 de volumen de Tris 1 M pH 8.0.

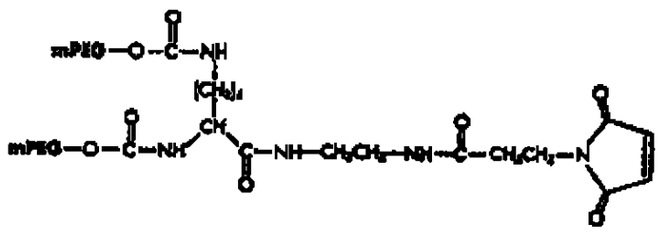
PEGilación de DOM8-24cys utilizando PEG MAL activado

PEGilación de Monómero

El residuo de cisteína que ha sido diseñado sobre la superficie del dAb VH se modificó específicamente con un PEG-MAL simple lineal o ramificado para dar una formatos de proteína mPEG-MAL monomérica modificada que pueden utilizarse para PEGilar un dAb VH o Vk monomérico. Los PEGs pueden ser de PM desde 500 hasta 60,000 (por ejemplo, desde 2,000 hasta 40,000) de tamaño.



mPEG-MAL



mPEG2-MAL

Se redujeron 2.5 ml de DOM8-24cys 500 µM con de ditiotreitol 5 mM y se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente se intercambió la solución amortiguadora de la muestra utilizando una columna PD-10 (Amersham Pharmacia). La columna ha sido pre-equilibrada con EDTA 5 mM, fosfato de sodio 20 mM pH 6.5, glicerol 10%, y la muestra se aplicó y eluyó siguiendo las pautas del fabricante. La muestra eluída (3.5 ml de dAb ~360 µM) se colocó sobre hielo hasta que se requirió. Se pesó un exceso molar de cuatro veces 30K PEG-MAL o 40K PEG2-MAL (Nektar) y se adicionó

directamente a la solución de dAb reducido y se mezcló suavemente hasta que el polímero se disolvió. Se dejó proceder la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas.

Purificación del monómero DOM8-24cys 30K y 40K PEGilado

Se purificó el dAb PEGilado utilizando cromatografía de intercambio catiónico ya que el punto isoeléctrico (pi) de la proteína es ~8. Se adicionaron 40 µL de ácido acético glacial 40% por mL de reacción de DOM8-24cys 30K o 40K PEG para reducir el pH hasta ~4. Posteriormente se aplicó la muestra a una columna de intercambio catiónico Resource S de 1mL (Amersham Pharmacia), la cual a sido pre-equilibrada con acetato de sodio 50 mM pH 4.0. Se separó el material PEGilado del dAb no modificado mediante la corrida de un gradiente de cloruro de sodio lineal desde 0 hasta 500 mM durante 20 volúmenes de columna. Las fracciones que contienen el dAb PEGilado se identificaron únicamente utilizando SDS-PAGE y posteriormente se reunieron y se incrementó el pH hasta 8 mediante la adición de 1/5 de volumen de Tris 1M pH 8.0

Ensayo de enlace funcional *In vitro*: ensayo del receptor de ligando CD40 (CD40L RBA)

Se utilizó el ensayo de CD40L para medir el enlace de CD40L a CD40 y la capacidad de las entidades enlazantes (incluyendo fragmentos de anticuerpo monovalente tal como un dAbs) para bloquear esta interacción, tal como se muestra en la Figura 7.

Se recubrió una placa de ensayo de 96 pozos Nunc Maxisorp durante la noche a 4°C con 100 µl por pozo de CD40/Fc recombinante humana (R&D Systems) a 0.5 µg/ml en solución amortiguadora de carbonato. La placa se lavó 3 veces con 300 µl de Tween/PBS 0.05% y 3 veces con 300 µl de PBS utilizando un lavador de placa Tecan. Los pozos se bloquearon utilizando 200 µl de PBS que contienen BSA 2% (p/v) y se incubaron durante un mínimo de 1 h a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron como anteriormente, posteriormente se añadieron 50 µl de proteína dAb purificada a cada pozo. También se adicionaron a cada pozo 50 µl de CD40L, a 6 ng/ml en diluyente (para una concentración final de 3 ng/ml), y la placa se incubó durante 1 hr a

temperatura ambiente. La placa se lavó tal como se describió previamente y se adicionaron 100 µl de anticuerpo anti-CD40L biotinilado, 0.5 µg/ml en diluyente, y se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. La placa se lavó tal como se describió anteriormente, posteriormente se adicionaron 100 µl de anticuerpo anti-biotina HRP conjugado (1:5000 dilución en diluyente) a cada pozo y la placa se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. La placa se lavó nuevamente tal como se describió previamente utilizando un lavador de placa Tecan y se desarrolló el ensayo utilizando 100 µl de solución SureBlue 1-Component TMB MicroWell Peroxidase (la placa se dejó a temperatura ambiente por hasta 20 min). Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de ácido clorhídrico 1 M. Se ensayó el OD_{450nm} de la placa dentro de los 30 minutos de la adición del ácido. El OD_{450nm} es proporcional a la cantidad de conjugado estreptavidina-HRP enlazado, por lo tanto entre mayor sea el grado de inhibición de dAb menor es el OD_{450nm} de la señal resultante. Se incluyeron los siguientes controles: 0 ng/ml CD40L (solamente diluyente), 3 ng/ml CD40L y 3 ng/ml CD40L con 1 µg/ml anticuerpo anti-CD40L

Los resultados del CD40L RBA se muestran en la Fig. 9. Se puede ver que el DOM8-24cys PEGilado tiene una afinidad similar para CD40L como la proteína no modificada. El tamaño del polímero unido (bien sea 30 o 40K) no parece afectar significativamente el IC 50 de ~1 nM.

Ejemplo 9: Generación y Expresión de un Dímero de dAb Específico Dual (DOM7h-26— DOM-24)

Se construyó un dímero de dAb específico dual tal como se describe en WO2004/003019 y como se describe a continuación.

Se generó un fragmento de PCR introduciendo los sitios de restricción 5' NotI y 3' EcoRI dentro de la secuencia de ADN DOM-24 utilizando los cebadores VH-5'-NotI (5'-GTATGTCTGGCGGCCGCAGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTG-3'; SEQ ID NO: 90) y VH-NO-XhoI (5'-TAGAATTCTTATTAGCTGGAGACGGTGACCAGGGT-3'; SEQ ID NO: 91). El producto de la PCR se sometió a electroforesis sobre un gel de agarosa 1% y se retiró la banda apropiada y se limpió el gel utilizando el Kit de Extracción Qiagen Gel. El ADN purificado se sometió a digestión con NotI y EcoRI durante

1 hora a 37°C y posteriormente se purificó el fragmento de ADN sometido a digestión utilizando el Kit de Limpieza Qiagen PCR. El producto de la PCR sometido a digestión se unió utilizando T4 ADN ligasa dentro del vector pCH3, derivado de pPICz-alfa (Invitrogen Ltd, Paisley, UK), el cual ha sido sometido previamente a digestión con NotI y EcoRI, facilitando de este modo la ligación de la secuencia 3' ADN DOM-24 relativa a la secuencia de ADN dAb de albúmina de suero anti-humana (DOM7h-26). Se utilizó un microlitro de la mezcla de ligación para electroporar 50 µl de E. coli TOP10F' (cubetas de diámetro 0.2 mm; µFD 25; 200Ω; 2.500 kV) utilizando un Biorad Genepulser II con módulo controlador de pulso. Las células electroporadas se resuspendieron inmediatamente en 1 ml de medio LB bajo en sal (10 g/l de triptona; 5 g/l de extracto de levadura; 5 g/l de NaCl; pH hasta 7.5 con NaOH 4 M; posteriormente se sometió a autoclave a 121°C durante 15 min) y se plaquearon 100 µl de la suspensión celular sobre placas de agar LB bajas en sal (10 g/l de triptona; 5 g/l de extracto de levadura; 5 g/l de NaCl; pH hasta 7.5 con NaOH 4 M; agar 15 g/l; posteriormente se sometió a autoclave a 121°C durante 15 min) complementado con 25 µg/ml de zeocina (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) y crecieron a 37°C durante la noche.

Se analizaron diversos clones individuales de la placa de crecimiento durante la noche mediante secuenciamiento de ADN utilizando el cebador de secuenciación del factor alfa (5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'; SEQ ID NO: 92) y el cebador 3' AOX1 inverso (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'; SEQ ID NO: 93). Se hizo una preparación de plásmido derivado de un clon sencillo que contiene la secuencia de ADN deseada mediante la inoculación de 100 ml de medio LB bajo en sal complementado con 25 µg/ml de zeocina y creció durante la noche a 37°C con agitación a 250 rpm, seguido por la purificación del plásmido de ADN utilizando un Kit Qiagen Plasmid Midi Prep (Qiagen).

Se determinó la concentración y pureza del ADN mediante la medición de la absorbancia a 280 nm y 260 nm. Se sometieron a digestión entre 10 y 50 µg de ADN con las enzimas de restricción PmeI, SacI o BstXI y se confirmó la digestión del ADN mediante análisis sobre un gel de agarosa al 0.8%. Se purificó el ADN sometido a digestión utilizando el Kit Qiagen Qiaex II (Qiagen) y se eluyó el ADN en 10 µl de agua purificada por 20 µl de resina Qiaex II.

Se prepararon células de levadura competentes rayando la cepa X33 de Pichia pastoris nativa sobre una placa de agar YPD (para 1 litro de medio: 20 g de peptona de carne tipo 1; 10 g de extracto de levadura; 20 g de agar disuelto en 900 ml de agua y esterilizado mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos; seguido por la adición aséptica de 100ml de dextrosa al 20% y la cantidad deseada de zeocina una vez el medio se ha enfriado por debajo de 50°C) y crecieron a 30°C durante 36-48 h hasta que aparecieron las colonias. Se inoculó una colonia sencilla en 5 ml de medio YPD (en cuanto al agar YPD, sin la adición de 20 g de agar) y creció durante la noche en un frasco dividido de 50 ml a 30°C con agitación a 250 rpm. Se inocularon quinientos mililitros de medio YPD en un frasco dividido de 2l con 0.1-0.5 ml del cultivo de durante la noche y crecieron a 30°C con agitación a 250 rpm durante la noche hasta un OD600 de aproximadamente 1.3-1.5. Se enfrió el cultivo sobre hielo posteriormente se recogió la Pichia mediante centrifugación a 1500 g durante 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 500 ml de agua ultra pura enfriada con hielo. Se recuperó nuevamente la Pichia mediante centrifugación a 1500 g durante 5 min a 4°C. Se resuspendió el sedimento y se centrifugó por otras tres veces adicionales, la primera vez en 250 ml de agua ultra pura enfriada con hielo, posteriormente dos veces en 20 ml de sorbitol 1M enfriado con hielo. Se mantuvo la Pichia competente sobre hielo por hasta 6 horas antes de su uso.

Para transformar la Pichia mediante electroporación, se mezclaron entre 10 hasta 20 µg de vector linealizado en 10 µl de agua con 80 µl de Pichia competente en un tubo de microfuga preenfriado y se incubaron en hielo durante 5 min. Posteriormente se transfirió la mezcla de Pichia a una cubeta de electroporación de abertura de 0.2 cm preenfriada, y electroporada: 25 µF, juego de resistencia al infinito, 0.54 kV en un Biorad Genpulser II con módulo controlador de pulso. Se adicionó inmediatamente 1 ml de sorbitol 1 M enfriado con hielo a la cubeta de electroporación y se transfirió la Pichia electroporada a un tubo de polipropileno de 15 ml. Se incubó este cultivo a 30°C sin agitación durante 2 horas para permitir que las células se recuperaran. Posteriormente se plaquearon las células sobre placas de agar YPDS (agar YPD complementado con sorbitol 1 M) y se adicionó zeocina hasta las concentraciones finales de 100 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, y 2000 µg/ml. Se

incubaron las placas a 30°C en la oscuridad durante 2-10 días hasta que aparecieron las colonias. Se recogieron varios clones de cada palca y se rayaron nuevamente sobre placas de YPD complementadas con la misma cantidad de zeocina con la que se seleccionaron originalmente en contra. No se determinó el estado de Mut para cada clon X33 para la expresión de agitación de frasco a escala pequeña a media .

Se utilizaron colonias rayadas nuevamente individuales para inocular 50 ml de medio BMGY (por 1 litro de medio: 20 g de peptona de carne tipo 1; se disolvieron10 g de extracto de levadura en 700 ml con agua y se esterilizó mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos; seguido de la adición aséptica de 100 ml de KPO_4 1 M pH 6.0; 100 ml de glicerol al 10%; y 100 ml de YNB 10x (Levadura Base de Nitrógeno); 2 ml de biotina 500x) en un frasco de 250 ml y crecieron a 30°C con agitación a 250 rpm hasta que se consiguió un OD600 de 2 hasta 6. Se recuperó la Pichia mediante centrifugación a 1500 g durante 5 min a temperatura ambiente. Se resuspendió el sedimento resultante en 20 ml de medio BMMH (como para el medio BMGY excepto que los 100 ml de glicerol al 10% se reemplazaron con 100 ml de metanol al 5%), y se retornó a un frasco dividido de 250 ml fresco y se incubó a 30°C con agitación a 250 rpm por hasta 5 días post inducción. Se recuperaron, en intervalos de 24 h, muestras de 0.5 ml y se determinaron mediante análisis del sobrenadante por medio de SDS-PAGE.

Se purificó el dímero de dAb a partir del sobrenadante de cultivo utilizando una matriz Streamline protein-A (Amersham Biosciences). Después del enlace del dímero de dAb, se transfirió la matriz a una columna de cromatografía de 20 ml vacía que contiene una frita y se permitió que el sobrenadante fluyera a través de la columna, reteniendo la matriz. Se lavó la matriz con 10 veces el volumen de la matriz de una solución amortiguadora de contenido de sal alto (solución amortiguadora de Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, NaCl 487 mM, pH 7.4). Se eluyó la proteína enlazada con glicina 0.1 M pH 3 complementada con NaCl 0.15 M y se recolectaron fracciones de 0.8 ml que se neutralizaron inmediatamente con la adición de 0.2 ml de Tris-HCl 1 M pH 8.0.

Enlace de Antígeno Simultáneo del Dímero de dAb Específico Dual

Se desarrollo una ELISA de enlace de antígeno, para demostrar que el dAb dimérico específico dual era funcional y podía unirse a ambos antígenos simultáneamente. Se recubrieron cincuenta microlitros por pozo de albúmina de suero humano a 100 µg/ml en PBS sobre una placa de ELISA Maxisorb (Nunc) durante la noche a 4°C. Se lavó la placa 3 veces con 250 µl/pozo de PBS complementado con Tween 20 al 0.1% (v/v) (Sigma). Posteriormente se bloqueó la placa durante 1 h a temperatura ambiente con 200 µl por pozo de PBSM (PBS complementado con 2% (p/v) leche en polvo baja en grasa). La placa se lavó tal como anteriormente, posteriormente se adicionaron 50 µl por pozo de diluciones dobles del dímero de dAb en PBSM y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó tal como anteriormente posteriormente se añadieron 50 µl por pozo de una de solución 5 nM de de CD40L biotinilado en PBSM y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó tal como anteriormente, posteriormente se adicionaron 50 µl por pozo de estreptavidina-HRP (Amersham Biosciences) diluida 1 en 4000 en PBSM y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 4 veces con 250 µl/pozo de PBS complementado con Tween 20 al 0.1% (v/v), seguido de dos lavados con 250 µl/pozo de PBS. Se desarrolló la ELISA mediante la adición de 50 µl por pozo de solución SureBlue 1-Component TMB Micro Well Peroxidasa (KPL, Gaithersberg, MD) y se incubó a temperatura ambiente durante varios minutos hasta que se obtuvo la intensidad de color deseada. Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de ácido clorhídrico 1 M y se leyó a 450 nm (Figura 10).

Generación y Expresión de un Fab Específico Dual (DOM7h-2:CK DOM-24:CH)

Para producir un Fab dual específico se utilizó esencialmente el mismo método tal como se describió para el dímero de dAb dual específico (DOM7h-26— DOM-24) excepto que el ADN para los dAbs DOM7h-2 y DOM-24 se clonó dentro de vectores basados en pPICz-Alfa separados que contienen el dominio CK humano o CH1 humano respectivamente. Se diseñaron cada uno de los dos vectores para permitir la expresión de un polipéptido sencillo que consiste del dominio CH1 o CK fusionado en marco al extremo 3' del dAb apropiado. Para obtener la expresión del fragmento de Fab completo, se

contransformaron cepas X33 de Pichia pastoris competente con dos vectores linealizados. La purificación fue tal como se describió para el dímero de Fab.

Enlace de Antígeno Simultáneo del Fab Específico Dual

Se llevó a cabo el enlace de antígeno simultáneo del Fab dual específico utilizando el mismo ensayo tal como se describió para el dímero dual específico de dAb anterior. Los resultados se muestran en la Figura 11.

Inhibición de la regulación ascendente de CD54 mediada por CD40 interrupción de la interacción CD40 / CD40L en células L3055.

Se ensayaron las moléculas monoméricas de dAb por su capacidad para interrumpir el enlace de CD40L a CD40 asociado celularmente. Esto se determinó mediante la medición del nivel de inhibición de la regulación ascendente de CD54 mediada por CD40 en el grupo 1 de la línea celular L3055 de linfoma de Burkitt mediante FACS. Se estimuló la CD40 desplegada sobre las células L3055 mediante el CD40L expresado sobre la superficie de los fibroblastos (típicamente células L de ratón) transfectados con el gen CD40L tal como se describió previamente por Garrone et al., 1995 (Garrone P., Neidhardt E. V., Garcia E., Galibert L., van Kooten C5 Banchereau J. (1995) J Exp Med 182, 1265-1273.)

Se pre-incubaron las muestras que contienen los dAbs con las células de las células L durante 1 hora antes de la adición de las células L3055. Se co-cultivaron ambas líneas celulares durante 22 horas después de lo cual se tiñeron las células L para el análisis de FACS, tal como fue descrito por Baker et al., 1998 (Baker, M.P., Eliopoulos, A.G., Young, L.S., Armitage, RJ., Gregory, CD., Gordon, J. (1998) Blood, 92 (8), 2830-2843) y por Challa et al., 2002 (Challa, A., Eliopoulos, A.G., Holder, MJ., Burguete, A.S., Pound, J.D., Chamba, A., Grafton, G., Armitage, RJ., Gregory, C.D., Martinez- Valdez, H., Young, L. y Gordon, J. (2002) Blood, 99 (9), 3411-3418.

El análisis de FACS de DOM-24 (forma monomérica) a una concentración de 12 µm mostró inhibición.

El análisis de FACS del DOM-116 de Vk a una concentración de 9μM mostró inhibición comparada con un blanco de control de dAb y el trazo celular estimulado (Figura 13).

Efecto de la terapia anti-CD40L sobre la respuesta inmune primaria a inmunización con KLH.

Para mostrar el efecto de la terapia anti-CD40L sobre la respuesta inmune primaria a inmunización con KLH se puede llevar a cabo un estudio similar al descrito por Gobburu, J.V.S. et al., 1998 (Gobburu, J.V.S., Tenhoor, C, Rogge, M.C., Frazier, D.E., Thomas, D., Benjamin, C, Hess, D.M., & Jusko, WJ. (1998) JPET, 286, 925-930.

Un ejemplo de estudio puede ser tal como sigue: se inyectaron monos Cynomolgus con un anticuerpo anti-CD40L o formato dAb a una dosificación de 10mg/kg en los momentos 0h, 168h y 336h. A las 24h los animales recibieron una inyección intradérmica única de 100 μg de hemocianina de lapa californiana (KLH) altamente purificada. Se evaluó el suero para una respuesta a KLH antes del comienzo y después de la terminación del estudio. Se permitió que los animales se recuperaran durante un tiempo adecuado para asegurar que la molécula de dAb ha despejado la circulación, posteriormente se inyectaron con KLH (sin dAb) para determinar si el animal puede elevar una respuesta inmune contra KLH. Pueden utilizarse antígenos alternativos para el estudio si se detecta una respuesta temprana a KLH antes del comienzo del estudio.

La respuesta inmune a la KLH podrá medirse por medio de un ensayo adecuado de ELISA, RIA o título de anticuerpo. Se anticipó que los resultados pueden mostrar que el DOM-24 monomérico PEgilado puede suprimir la respuesta inmune de los animales a la KLH. Esto podría verse en la reducción del título de anticuerpo comparado con un control positivo. Los resultados pueden ser normalizados de tal forma que se considere que el control positivo sea 100 y la reducción en la respuesta inmune después de la administración del dAbs pueda estar en el rango de 10 a 90% esto es, 90 a 10 unidades.

Sequencia del DOM7h-26--- DOM-24

LEKREVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFDEYNMSWVRQAPGKGLEW
VSTILPHGDRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQD
PLYRFDYWGQGTLVTVSSAAAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSN
YQMAWVRQAPGKGLEWVSSITSEGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCAKPGKNFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 88)

Sequencia del DQM7h-26

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQKIATYLNWYQQKPGKAPKLLIYRSSSL
QSAVPSRFSGSGSGTVFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYAVPPTFGQGTKVEIK
R (SEQ ID NO: 89)

Todas las patentes, solicitudes de patente, y referencias publicadas aquí citadas están por lo tanto incorporadas por referencia en su totalidad. Si bien esta invención ha sido mostrada y descrita particularmente con referencias a las realizaciones preferidas de la misma, se entenderá por aquellos versados en la materia que varios cambios en la forma y detalles pueden hacerse allí sin apartarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones anexadas.

Anexo 1; polipéptidos que mejoran vida media *in vivo*.

Glicoproteína Alfa-1 (Orosomucoide) (AAG)

Antiquimotripsina Alfa-1 (ACT)

Antitripsina Alfa-1 (AAT)

Microglobulina Alfa-1 (Proteína HC) (AIM)

Macroglobulina Alfa-2 (A2M)

Antitrombina III (AT III)

Apolipoproteína A-1 (Apo A-1)

Apoliproteína B (Apo B)

Beta-2-microglobulina (B2M)

Ceruloplasmina (Cp)

Componente Complemento (C3)

Componente Complemento (C4)

Inhibidor de Esterasa C1 (C1 INH)

Proteína C-Reactiva (CRP)

Cistatina C (Cys C)

Ferritina (FER)

Fibrinógeno (FIB)

Fibronectina (FN)

Haptoglobina (Hp)

Hemopexina (HPX)

Inmunoglobulina A (IgA)

Inmunoglobulina D (IgD)

Inmunoglobulina E (IgE)

Inmunoglobulina G (IgG)

Inmunoglobulina M (IgM)

Cadenas Ligeras de Inmunoglobulina (kapa/lambda)

Lipoproteína(a) [Lp(a)]

Proteína de unión a Manosa (MBP)

Mioglobina (Myo)

Fc Neonatal (FcRn)

Plasminógeno (PSM)

Prealbúmina (Transtiretina) (PAL)

Proteína de unión a Retinol (RBP)

Factor Reumatoide (RF)

Suero Amiloide A (SAA)

Receptor de Transferrina Soluble (sTfR)

Transferrina (Tf)

Anexo 2

Apareamiento	Referencias terapéuticas relevantes
TNF ALFA/TGFβ	◦ Cuando se inyectan TGF-b y TNF dentro de la articulación del tobillo del modelo de artritis inducida por colágeno mejoran significativamente la inflamación de la articulación. No hubo efecto en ratones de colágeno no exigido.
TNF ALFA/IL-1	◦ TNF e IL-1 sinergizan en la patología de uveitis ◦ TNF e IL-1 sinergizan en la patología de malaria (hipoglicemia, NO) ◦ TNF e IL-1 sinergizan en la inducción de la migración de células polimorfonucleares (PMN) en inflamacion ◦ IL-1 y TNF sinergizan para inducir la infiltración de PMN dentro del peritoneo ◦ IL-1 y TNF sinergizan para inducir la secreción de IL-1 mediante las células endoteliales. Importante en la inflamación ◦ IL-1 o TNF inducen solos algo de infiltración celular dentro del sinovio de la rodilla. PMNs inducidos por IL-1, TNF-monocitos. Juntos inducen una infiltración más severa debido a los PMNs incrementados ◦ La sustancia depresora de la circulación miocardial (presente en la sepsis) es baja. Los niveles de IL-1 y TNF actúan sinérgicamente
TNF ALFA/IL-2	◦ Más relacionado con la activación sinérgica de las células T asesinas
TNF ALFA/IL-3	◦ Sinergia de interleucina 3 y el factor alfa de necrosis de tumor en la estimulación del crecimiento clonal de blastos de leucemia mielógena aguda es el resultado de la inducción de citocinas hematopoyéticas secundarias por el factor alfa de necrosis de tumor

	• Cancer Res.1992 Apr 15;52(8):2197-201
TNF ALFA/IL-4	• IL-4 y TNF sinergizan para inducir la expresión de VCAM en las células endoteliales. Implicado en tener un papel en asma. Igual para sinovio – implicado en RA. • TNF e IL-4 sinergizan para inducir la expresión de IL-6 en queratinocitos • Sustained elevated levels of VCAM-1 in cultured fibroblast-like synoviocytes can be achieved by TNF-alpha in combination with either IL-4 or IL-3 through increased mRNA stability. *Am J Pathol.* 1999 Apr;154(4):1149-58
TNF ALFA/IL-5	• Relationship between the tumor necrosis factor system and the serum interleukin-4, interleukin-5. interleukin-8 eosinophil cationic protein, and immunoglobulin E levels in the bronchial hyperreactivity of adults and their children *Allergy Asthma Proc.* 2003 Mar-Apr;24(2):111-8
TNF ALFA/IL-6	• TNF and IL-6 are potent growth factors for OH-2, a novel human myeloma cell line. *Eur J Haematol.*1994 Jul;53(1):31-7
TNF ALFA/IL-8	• TNF e IL-8 sinergizan con PMNs para activar las plaquetas. Implicados en el Síndrome de Dolor Respiratorio Agudo. • Ver IL-5/TNF (asma). Synergism between interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha for neutrophil-mediated platelet activation *Eur Cytokine Netw.* 1994 Sep-Oct;5(5):455-60. (síndrome de dolor respiratorio adulto (ARDS))
TNF ALFA/IL-9	
TNF ALFA/IL-10	• IL-10 induce y sinergiza con TNF en la inducción de la expresión de VIH en células T infectadas crónicamente
TNF ALFA/IL-11	• Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal

	calvarial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Sep;**283**(3):C679-87. (pérdida ósea)
TNF ALFA/IL-12	-
TNF ALFA/IL-13	• Sustained elevated levels of VCAM-1 in cultured fibroblast-like synoviocytes can be achieved by TNF-alpha in combination with either IL-4 or IL-3 through increased mRNA stability. *Am J Pathol.* 1999 Apr;154(4):1149-58 • Interleukin-TS and tumour necrosis factor-alpha synergistically induce eotaxin production in human nasal fibroblast Clin Exp Allergy.2000 Mar;30(3):348-55 • Interleukin-TS and tumour necrosis factor-alpha synergistically induce eotaxin production in human nasal fibroblast *Clin Exp Allergy*.2000 Mar;30(3):348-55 (inflamación alérgica)
TNF ALFA/IL-14	• Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. *Thorax.* 2002 Sep;**57**(9).774-8
TNF ALFA/IL-15	• Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. *Thorax.* 2002 Sep;**57**(9):774-8
TNF ALFA/IL-16	• Tumor necrosis factor-alpha-induced synthesis of interleukin-16 in airway epithelial cells: priming for serotonin stimulation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Mar;**28**(3):354-62 (inflamación de las vías respiratorias) • Correlation of circulating interleukin 16 with proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (Oxford). 2001 Apr;**40**(4):474-5. Resumen no disponible. • Interleukin 16 is up-regulated in Crohn´s disease and participates in TNBS colitis in mice. *Gastroenterology.* 2000 Oct;**119**(4):972-82
TNF	• Inhibition of interleukin-17 prevents the

ALFA/IL-17	development of arthritis in vaccinated mice challenged with Borrelia burgdorferi. *Infect Immun.* 2003 Jun;**71**(6):3437-42 • Interleukin 17 synergises with tumour necrosis factor alpha to induce cartilage destruction *In vitro. Ann Rheum Dis.* 2002 Oct;**61**(16):870-6 • A role of GM-CSF in the accumulation of neutrophils in the airways caused by IL-17 and TNF-alpha. *Eur Respir J.* 2003 Mar;**21**(3):387-93. (inflamación de las vías respiratorias) • Resumen Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum.* 2001 Sep;**44**(9):2078-83.
TNF ALFA/IL-18	• Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Feb;**48**(2):339-47. • Resumen Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. *Metabolism.* 2003 May;**52**(5).605-8
TNF ALFA/IL-19	• Resumen IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. *J Immunol.* 2002 Oct 15;**169**(8):4288-97
TNF ALFA/IL-20	• Resumen Cytokines: IL-20 - a new effector in skin inflammation. *Curr Biol.* 2001 Jul 10;**11**(13):R531-4
TNF ALFA/Complemento	• Inflammation and Coagulation: implications for the septic patient. *Clin Infect Dis.* 2003 May 15;**36**(10):1259-65. Epup 2003 May 08. Revisión

TNF ALFA/IFN-γ	• Inducción de MHC en el cerebro. • Sinergiza en la respuesta antiviral / Inducción de IFN-β. • Activación de neutrófilo/explosión respiratoria. • Activación de célula endotelial. • Se notó toxicidad cuando los pacientes se trataron con TNF/INF-γ como terapia antiviral. • Expresión de fractalcina por astrositos humanos. • Muchos artículos sobre respuestas inflamatorias – esto es LPS, también activación de macrófago. • Anti-TNF y anti-IFN-γ sinergizan para .proteger ratones de endotoxemia letal

TGF-β/IL-1	• Síntesis de prostaglandina mediante osteoblastos. • Producción de IL-6 mediante células epiteliales (modelo de inflamación) • Estimula IL-11 e IL-6 en fibroblastos de pulmón (modelo de inflamación) • Producción de IL-6 e IL-8 en la retina.
TGF-β/IL-6	• Proliferación de condrosarcoma.
IL-1/IL-2	• Activación de células-B. • Activación de células LAK. • Activación de células T. • IL-1 synergy with IL-2 in the generation of lymphokine activated killer cells is mediated by TNF-alpha and beta (lymphotoxin). *Cytokine.* 1992 Nov;4(6):479-87
IL-1/IL-3	
IL-1/IL-4	• Activación de células-B. • IL-4 induce la expresión de IL-1 en la activación de células endoteliales.
IL-1/IL-5	
IL-1/IL-6	• Activación de células B. • Activación de células T (puede reemplazar células accesorias).

	• IL-1 induce la expresión de Il-6. • Expresión de C3 y amiloide de suero (respuesta de fase aguda). • Expresión de VIH. • Descomposición del colágeno del cartílago.
IL-1/IL-7	• IL-7 is requisite for IL-1-induced thymocyte proliferation. Involvement of IL-7 in the synergistic effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or tumor necrosis factor with IL-1. *J Immunol.* 1992 Jan 1;148(1):99-105.
IL-1/IL-8	
IL-1/IL-10	
IL-1/IL-11	• Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Sep;**283**(3):C679-87 (pérdida ósea).
IL-1/IL-16	• Correlation of circulating interleukin 16 with proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (Oxford). 2001 Apr;**40**(4):474-5. Resumen no disponible.
IL-1/IL-17	• Inhibition of interleukin-17 prevents the development of arthritis in vaccinated mice challenged with Borrelia burgdorferi. *Infect Immun.* 2003 Jun;**71**(6):3437-42 • Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;**10**(10):799-807. • Resumen Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum.* 2001 Sep;**44**(9):2078-83.
IL-1/IL-18	• Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1beta and

	tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Feb;**48**(2):339-47.
IL-1/IFN-g	
IL-2/IL-3	◦ Proliferación de células T. ◦ Proliferación de células B.
IL-2/IL-4	◦ Proliferación de células B. ◦ Proliferación de células T. ◦ (selectively inducing activation of CD8 and NK lymphocytes) IL-2R beta agonist P1-30 acts in synergy with IL-2, IL-4, IL-9, and IL-15: biological and molecular effects. *J Immunol.* 2000 Oct 15;**165**(8):4312-8.
IL-2/IL-5	◦ Proliferación de células B/ secreción de Ig. ◦ IL-5 induce los receptores de IL-2 en células-B.
IL-2/IL-6	◦ Desarrollo de células-T citotóxicas.
IL-2/IL-7	
IL-2/IL-9	◦ Ver IL-2/IL-4 (células-NK).
IL-2/IL-10	◦ Activación de células-B.
IL-2/IL-12	◦ IL-12 synergizes with IL-2 to induce lymphokine-activated cytotoxicity and perforin and granzyme gene expression in fresh human NK cells. *Cell Immunol.* 1995 Oct 1;**165**(1):33-43. (activación de células T).
IL-2/IL-15	◦ Ver IL-2/IL-4 (células-NK). ◦ (T cell activation and proliferation) IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells *in vivo. Nat Med.* 2001 Jan;7(1):114-8.
IL-2/IL-16	◦ Synergistic activation of CD 4+ T cells by IL-16 and IL-2 *J Immunol.* 1998 Marc 1;160(5):2115-20.
IL-2/IL-17	◦ Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *J Pathol.* 2002 Jul;197(3):322-32.
IL-2/IL-18	◦ Interleukin 18 (IL-18) in synergy with IL-2 induces lethal lung injury in mice: a potential role for

	cytokines, chemokines, and natural killer cells in the pathogenesis of interstitial pneumonia. *Blood.* 2002 Feb 15;**99**(4):1289-98.
IL-2/TGF-β	◦ Control of CD4 effector fate: transforming growth factor beta 1 and interleukin 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion. *J Exp Med.* 1995 Sep 1;**182**(3):699-709.
IL-2/IFN-γ	◦ Secrecion de Ig mediante células-B. ◦ IL-2 induce la expresión de IFN-γ mediante células-T.
IL-2/IFN-α/β	◦ Ninguno.
IL-3/IL-4	◦ Sinergiza en el crecimiento de mastocitos ◦ Synergistic effects of IL-4 and Esther GM-CSF or IL-3 on the induction of CD23 expression by human monocytes: regulatory effects of IFN-alpha and IFN-gamma. *Cytokine.* 1994 Jul;**6**(4):407-103.
IL-3/IL-5	
IL-3/IL-6	
IL-3/IFN-γ	◦ IL-4 and IFN-gamma synergistically increase total polymeric IgA receptor levels in human intestinal epithelial cells. Role of protein tyrosine kinases. *J Immunol.* 1996 Jun 15;**156**(12):4807-14.
IL-3/GM-CSF	◦ Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. *J Immunol.* 2003 Jun 1;**170**(11):5359-66. (inflamación alérgica).
IL-4/IL-2	◦ IL-4 synergistically enhances both IL-2 and IL-12-induced IFN-{gamma } expression in murine NK cells. *Blood.* 2003 Mar 13 [Epub antes de impression]
IL-4/IL-5	◦ Secreción mejorada de mastocitos histamina etc. En respuesta a IgE. ◦ A Th2-like cytokine response is involved in bullous

	pemphigoid, the role of IL-4 and IL-5 in the pathogenesis of the disease. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 1999 May-Aug;**12**(2):55-61.
IL-4/IL-6	
IL-4/IL-10	
IL-4/IL-11	• Synergistic interactions between interleukin-11 and interleukin-4 in support of proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. *Blood.* 1991 Sep 15;**78**(6):1448-51.
IL-4/IL-12	• Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J Immunol.* 2000 Jan1;164(1):64-71. (incrementa la diferenciación de Th1/Th2). • IL-4 synergistically enhances both IL-2 and IL-12-induced IFN-{gamma } expression in murine NK cells. *Blood.* 2003 Mar 13 [Epub antes de impression]
IL-4/IL-13	• Resumen Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science.* 2003 Jun 6;**300**(5625):1527-8. (alergia, asma). • Inhibition of the IL-4/ IL-13 receptor system prevents allergic sensitization without affecting established allergy in a mouse model for allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jun; **111**(6):1361-1369.
IL-4/IL-16	• (asthma) Interleukin (IL)-4/ IL-9 and exogenous IL-16 induce IL-16 production by BEAS-2B cells, a bronchial epithelial cell line. *Cell Immunol.* 2001 Feb 1;**207**(2):75-80.
IL-4/IL-17	• Interleukin (IL)-4 and IL-17 synergistically stimulate IL-6 secretion in human colonic myofibroblasts. *Int J Mol Med.* 2002 Nov;**10**(5):631-4. (Inflamación de tripa).
IL-4/IL-24	• IL-24 is expressed by rat and human macrophages. *Immunobiology.* 2002 Jul;**205**(3)-:321-34.

IL-4/IL-25	• Resumen New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol.* 2002 Jul 1;**169**(1):443-53 (inflamación alérgica). • Resumen Mast cells produce interleukin-25 upon Fcepsilon RI-mediated activation. *Blood.* 2003 May 1;**101**(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02. (inflamación alérgica).
IL-4/IFN-γ	• Resumen Interleukin 4 induces interleukin 6 production by endothelial cells: synergy with interferon-gamma. *Eur J Immunol.* 1999 Jan;**21**(1):97-101.
IL-4/SCF	• Regulation of human intestinal mast cells by sten cell factor and IL-4. *Immunol Rev.* 2001 Feb;**179**:57-60. Revisión.
IL-5/IL-3	• Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. *J Immunol.* 2003 Jun 1;**170**(11):5359-66. (inflamación alérgica ver resumen).
IL-5/IL-6	
IL-5/IL-13	• Inhibition of allergic airways inflammation and airway hyperresponsiveness in mice by dexamethasone: role of eosinophils, IL-5, eotaxin, and IL-3. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 May;**111**(5):1049-61.
IL-5/IL-17	• Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Jan;**28**(1):42-50.
IL-5/IL-25	• Resumen New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol.* 2002 Jul

	1;**169**(1):443-53 (inflamación alérgica). • Resumen Mast cells produce interleukin-25 upon Fcepsilon RI-mediated activation. *Blood*. 2003 May 1;**101**(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02. (inflamación alérgica).
IL-5/IFN-γ	
IL-5/GM-CSF	• Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. *J Immunol.* 2003 Jun 1;**170**(11):5359-66. (inflamación alérgica).
IL-6/IL-10	
IL-6/IL-11	
IL-6/IL-16	• Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Immunology*. 200 May;**100**(1):63-9.
IL-6/IL-17	• Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem*. 2003 May 9;**278**(19):17036-43, Epub 2003 Mar 06. (inflamación de las vías respiratorias, asma).
IL-6/IL-19	• Resumen IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. *J Immunol.* 2002 Oct 15;**169**(8):4288-97
IL-6/IFN-g	
IL-7/IL-2	• Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood* 2002 Oct 1;**100**(7):2642-9.
IL-7/IL-12	• Synergistic effects of IL-7 and IL-12 on human T cell activation. *J Immunol.* 1995 May 15;**154**(10):5093-102.
IL-7/IL-15	• Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myb genes in

	cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood*. 2001 Nov 1;**98**(9):2778-83. (factor de crecimiento).
IL-8/IL-11	◦ Abnormal production of interleukin (IL)-11 and IL-8 in polycythaemia vera. *Cytokine*. 2002 Nov 21;**20**(4):178-83.
IL-8/IL-17	◦ The Role of IL-17 in Joint Destruction. *Drugs News Perspect*. 2002 Jan;**15**(1):17-23. (arthritis). ◦ Resumen Interleukin-17 stimulates the expression of Interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Jun;**26**(6):748-53 (inflamación de las vías respiratorias).
IL-8/GSF	◦ Interleukin-8: an aurocrine/paracrine growth factor for human hematopoietic progenitors acting in synergy with colony stimulating factor-1 to promote monocyte-macrophage growth and differentiation. *Exp Hematol*. 1999 Jan;**27**(1):28-36.
IL-8/VGEF	◦ Intracavitary VEGF, bFGF, IL-8, IL-12 levels in primary and recurrent malignant glioma. *J Neurooncol*. 2003 May;**62**(3):297-303.
IL-9/IL-4	◦ Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperrreactivity in mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Aug 1;**166**(3):409-16.
IL-9/IL-5	◦ Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J Clin Invest*. 2002 Jan;**109**(1):29-39. ◦ Th2 cytokines and asthma. Interleukin-9 as a therapeutic target for asthma. *Respir Res*. 2001;**2**(2):80-4. Epub 2001 Feb 15. Revisión. ◦ Resumen Interleukin-9 enhances Interleukin-5 receptor expression differentiation, and survival of human eosinophils. *Blood*. Sep 15;**96**(6):2163-71 (asma).
IL-9/IL-13	◦ Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits

	airway inflammation and hyperrreactivity in mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Aug 1;**166**(3):409-16. ◦ Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperrreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med.* 2002 Aug;**8**(8):885-9.
IL-9/IL-16	◦ Ver IL-4/IL-6
IL-10/IL-2	◦ The interplay of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-2 (IL-2) in humoral immune responses: IL-10 synergizes with IL-2 to enhance responses of human B lymphocytes in a mechanism which is different form upregulation of CD25expression. *Cell Immunol.* 1994 Sep;**157**(2):478-88.
IL-10/IL-12	
IL-10/TGF-β	◦ IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2003 May;**33**(5):1205-14.
IL-10/IFN-γ	
IL-11/IL-6	◦ Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone.* 2003 Jan;**32**(1):1-7. (resorción ósea en inflamación).
IL-11/IL-17	◦ Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Apr;**111**(4):875-81. (dermatitis alérgica). ◦ IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NK-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol.* 2003 Mar 1;**170**(5):2655-62.
IL-11/TGF-β	◦ Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Apr;**111**(4):875-81. (dermatitis alérgica).

IL-12/IL-13	◦ Relationships of Interleukin 12 and Interleukin 13 imbalance with class-specific rheumatoid factors and anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2003 May;**22**(2):107-11.
IL-12/IL-17	◦ Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2003 Feb;**38**(2):180-5.
IL-12/IL-18	◦ Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. *Cytokine*. 1999 Nov;**11**(11):822-30. ◦ Inflammatory Liver Steatosis Caused by IL-12 and IL-18. *J Interferon Cytokine Res.* 2003 Mar;**23**(3).155-62.
IL-12/IL-23	◦ Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003 Feb 13;**421**(6924):744-8. ◦ Resumen A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. *J Leukoc Biol.* 2003 Jan;**73**(1):49-56. Revisión.
IL-12/IL-27	◦ Resumen IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naïve CD4(+) T cells. *Immunity.* 2002 Jun;**16**(6):779-90.
IL-12/IFN-γ	◦ IL-12 induce la expresión de IFN-γ mediante las células B y T como parte de la estimulación inmune.
IL-13/IL-5	◦ Ver IL-5/IL-13
IL-13/IL-25	◦ Resumen New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol.* 2002 Jul 1;**169**(1):443-53 (inflamación alérgica). ◦ Resumen Mast cells produce interleukin-25 upon Fcepsilon RI-mediated activation. *Blood.* 2003 May 1;**101**(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02. (inflamación alérgica).

IL-15/IL-13	• Differential expression of interleukins (IL)-13 and IL-15 in ectopic and eutopic endometrium of women with endometriosis and normal fertile women. *Am J Reprod Immunol.* 2003 Feb;**49**(2):75-83.
IL-15/IL-16	• IL-15 and IL-16 overexpression in cutaneous T-cell lymphomas: stage-dependent increase in mycosis fungoides progression. *Exp Dermatol.* 2000 Aug;**9**(4):248-51.
IL-15/IL-17	• Resumen IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol.* 2003 Feb 15; **170**(4):2106-12. (inflamación de las vías respiratorias)
IL-15/IL-21	• IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 Enhances IFN-gamma Production in Human NK and T Cells. J *Immunol.* 2003 Jun 1;**170**(11):5464-9.
IL-17/IL-23	• Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 2003 Jan 17;**278**(3):1910-4. Epub 2002 Nov 03.
IL-17/TGF-β	• Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Apr;**111**(4): 875-81. (dermatitis alérgica).
IL-18/IL-12	• Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. *Cytokine.* 1999 Nov;**11**(11):822-30. • Resumen Inhibition of in vitro immunoglobulin production by IL-12 in murine chronic graft-vs-host disease: synergism with IL-18. *Eur J Immunol.* 1998 Jun;**28**(6):2017-24.
IL-18/IL-21	• IL-12 in Synergy with IL-15 or IL-18 Enhances IFN-gamma Production in Human NK and T Cells. J *Immunol.* 2003 Jun 1;**170**(11):5464-9.
IL-18/TGF-β	• Interleukin 18 and transforming growth factor

	beta1 in the serum of patients with Grave's ophtalmopathy treated with corticosteroids. *Int Immunopharmacol.* 2003 Apr;3(4):549-52
IL-18/IFN-γ	
Anti-TNF ALFA/anti-CD4	• Efecto terapéutico sinérgico en ratones artríticos DBA/1.

Anexo 3: Combinaciones de oncología

Objetivo	Enfermedad	Par con
CD89*	Uso como un reclutador celular citotóxico.	Todo
CD19	Linfomas de célula B	HLA-DR CD5
HLA-DR	Linfomas de célula B	CD89 CD19 CD5
CD38	Mieloma múltiple	CD138 CD56 HLA-DR
CD138	Mieloma múltiple	CD138 CD56 HLA-DR
CD138	Cáncer de pulmón	CD56 CEA
CD33	Linfoma mieloode agudo	CD34 HLA-DR
CD56	Cáncer de pulmón	CD138 CEA
CEA	Carcinoma pan	Receptor MET
VEGF	Carcinoma pan	Receptor MET
receptor VEGF	Carcinoma pan	Receptor MET
IL-13	Asma/Inflamación pulmonar	IL-4 IL-5 Eotoxina(s) MDC TARC TNFα IL-9 EGFER CD40L

		IL-25 MCP-1 TGFβ
IL-4	Asma	IL-13 IL-5 Eotoxina(s) MDC TARC TNFα IL-9 EGFR CD40L IL-25 MCP-1 TGFβ
Eotaxina	Asma	IL-5 Eotaxina-2 Eotaxina-3
EGFR	Cáncer	HER2/neu HER3 HER4
HER2	Cáncer	HER3 HER4
TNFR1	RA/Enfermedad de Crohn	IL-1R IL-6R IL-18R
TNFα	RA/Enfermedad de Crohn	IL-1α/β IL-6 IL-18 ICAM-1 IL-15 IL-17
IL-1R	RA/Enfermedad de Crohn	IL-6R IL-18R
IL-18R	RA/Enfermedad de Crohn	IL-6R

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido de anticuerpo que comprende un polipéptido de dominio variable sencillo en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un síntoma de enfermedad autoinmune, en donde dicho polipéptido de dominio variable sencillo antagoniza la actividad de CD40 o CD40L o ambos.

2. El uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde dicha enfermedad autoinmune es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, Diabetes, rechazo de aloinjerto, rechazo de transplante de xenoinjerto y enfermedad de injerto v. hospedero.

3. El uso de acuerdo con la Reivindicación 1 o 2, en donde el polipéptido de anticuerpo es monovalente para el enlace a CD40L (gp39).

4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho polipéptido de anticuerpo inhibe el enlace de CD40L a CD40.

5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde el polipéptido de anticuerpo consiste del polipéptido de dominio variable sencillo.

6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido de dominio variable sencillo es un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo humano.

7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho polipéptido de dominio variable sencillo es un dominio V_H o V_L.

8 El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho polipéptido de anticuerpo comprende un amino ácido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID Nos 7-82 y SEQ ID Nos 246-360.

9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho polipéptido de anticuerpo tiene una secuencia de amino ácido que es al menos 80% homóloga a la SEQ ID NO: 26.

10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho polipéptido de anticuerpo tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la SEQ. ID. NO: 26.

11. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 10, en donde el enlace de dicho polipéptido de anticuerpo a CD40L no agoniza sustancialmente la actividad de CD40 y/o CD40L.

12. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 11, en donde la presencia de dicho polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaquetas estándar no produce la agregación de más del 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo.

13. Un polipéptido de anticuerpo que es monovalente para el enlace a CD40L (gp39), en donde el enlace de dicho polipéptido de anticuerpo a CD40L no agoniza sustancialmente la actividad de CD40 y/o CD40L

14. Un polipéptido de anticuerpo que tiene una secuencia de amino ácido al menos 85% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS 7-82, y SEQ ID NOs: 246-360, cuyo polipéptido de anticuerpo se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L.

15. El polipéptido de la reivindicación 14, que comprende un dominio variable sencillo de anticuerpo que se enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L, en donde dicho polipéptido inhibe sustancialmente el enlace de CD40L a CD40.

16. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, en donde dicho polipéptido de anticuerpo inhibe el enlace de CD40 a CD40L, y no agoniza sustancialmente la señalización por CD40.

17. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, en donde el enlace de dicho polipéptido de anticuerpo a CD40L no induce sustancialmente la fosforilación JNK en las células T Jurkat.

18. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, en donde el enlace de dicho polipéptido de anticuerpo a CD40L no induce sustancialmente la secreción IFN-γ por células T Jurkat co-estimuladas con anticuerpo anti-CD3.

19. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, en donde la presencia de dicho polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaqueta estándar no produce la agregación de más del 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo.

20. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, en el cual dicho polipéptido de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un polipéptido de dominio variable sencillo, dAb, FAb, un scFv, un Fv, o un Fv enlazado a disulfuro.

21. Un polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, que es monovalente para el enlace a CD40L (gp 39), en donde la presencia de dicho polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaqueta estándar no produce la agregación de más del 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo.

22 El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 34, en donde el polipéptido está enlazado a PEG.

23. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 22, que tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 24 kD.

24. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 22, en donde dicho PEG está enlazado a dicho anticuerpo en un residuo de cisteína o lisina.

25. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 22, en donde el tamaño total del PEG es de 20 a 60 kD, inclusive.

26. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 22, que tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 200 kD.

27. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 22, que tiene una vida media *in vivo* aumentada con relación a la misma composición de polipéptido que no tiene polietilenglicol enlazado.

28. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 27, en donde la vida media $t\alpha$ de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más

29. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 27, en donde la vida media $t\alpha$ de la composición de polipéptido está en el rango de 0.25 minutos a 12 horas.

30. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 27, en donde la vida media $t\beta$ de la composición de polipéptido es aumentada en 10% o más.

31. El polipéptido de anticuerpo enlazado a PEG de la reivindicación 27, en donde la vida media $t\beta$ está en el rango de 12 a 48 horas.

32. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14 que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs 7-82 y 246-360.

33. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, que está libre de un dominio Fc.

34. El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 33, en donde la presencia de dicho polipéptido de anticuerpo en un ensayo de agregación de plaqueta estándar no produce la agregación de más del 25% sobre la agregación observada en un ensayo de control negativo.

35 El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14 que inhibe el enlace de CD40L a CD40 con un IC_{50} en el rango de 20 pM a 1.5 μM, inclusive.

36 El polipéptido que se enlaza a antígeno de la reivindicación 13 o 15 que inhibe el enlace de CD40L a CD40 con un IC_{50} en el rango de 20 pM a 1.5 μM, inclusive.

37. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde el polipéptido de anticuerpo comprende una o más regiones de marco que comprenden una secuencia de amino ácido que es la misma secuencia de amino ácido de una región de marco correspondiente codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal, o la secuencia de amino ácido de una o más de dichas regiones de marco que comprenden colectivamente hasta 5 diferencias de amino ácido con relación a la secuencia de amino ácido de dicha región de marco correspondiente codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal.

38. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde las secuencias de amino ácido de FW1, FW2, FW3 y FW4 del polipéptido de anticuerpo son las mismas que las secuencias de aminoácido de regiones de marco correspondientes codificadas por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal, o las secuencias de amino ácido de FW1, FW2, FW3 y FW4 colectivamente contienen hasta 10 diferencias de amino ácido con relación a las secuencias de amino ácido de las regiones de marco correspondientes codificadas por dicho segmento de gen de anticuerpo de línea germinal.

39. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 38, en donde las secuencias de amino ácido de dichos FW1, FW2 y FW3 del polipéptido de anticuerpo son las mismas que las secuencias de amino ácido de regiones de marco correspondientes codificadas por segmentos de gen de anticuerpo de línea germinal humana.

40. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 38, en donde dicho segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana se selecciona del grupo que consiste de DP47, DP45, DP48 y DPK9.

41. Un polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, dicho polipéptido comprende un dominio variable de inmunoglobulina sencillo que se

enlaza específicamente y monovalentemente a CD40L, y que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs 7-82, y SEQ ID NOs 246-360.

42 El polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 41 que antagoniza el enlace de CD40L.

43. Un polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, en donde el polipéptido de dominio variable sencillo que se enlaza a CD40L comprende la secuencia de SEQ ID NO. 26.

44. Un polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, en donde el polipéptido de dominio variable sencillo qu se enlaza a CD40L tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia que es al menos 80% homóloga a la secuencia de SEQ ID NO: 26.

45. Un polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, en donde el polipéptido de dominio variable sencillo que se enlaza a CD40L tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO. 26.

46. Un polipéptido de anticuerpo de las reivindicaciones 13 o 15, en donde el polipéptido de dominio variable sencillo que se enlaza a CD40L tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 26.

47. Un polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, en donde el polipéptido de dominio variable sencillo que se enlaza a CD40L tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en

no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de SEQ ID NO: 26.

48. Un polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, en donde el polipéptido de dominio variable sencillo que se enlaza a CD40L tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26, y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 26.

49. Un polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14 en donde el polipéptido de dominio variable sencillo que se enlaza a CD40L tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 26, y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 26.

50. Un polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, en donde el polipéptido de dominio variable sencillo que se enlaza a CD40L tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26, y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 26.

51. Un polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, en donde el polipéptido de dominio variable sencillo que se enlaza a CD40L tiene una secuencia de amino ácido que es idéntica a la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, o difiere de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 26 en no más de 25 posiciones de amino ácido, y tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26, y tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de

CDR2 de la SEQ ID NO: 26 y tiene una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 26.

52. El polipéptido de la reivindicación 13 o 14 que comprende la secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 26.

53. El polipéptido de la reivindicación 13 o 14 que comprende la secuencia de CDR1, CDR2, y CDR3 de un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 7-82 y 246-360.

54 Un antagonista de CD40L que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26, y/o una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 26, y/o una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 26.

55. Un antagonista de CD40L de la reivindicación 54, que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26, y una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 26.

56. Un antagonista de CD40L de la reivindicación 54, que tiene una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de SEQ ID NO: 26, y una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 26.

57. Un antagonista de CD40L de la reivindicación 54, que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26, y una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 26.

58. Un antagonista de CD40L de la reivindicación 54, que tiene una secuencia de CDR1 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 26, y una secuencia de CDR2 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 26, y una secuencia de CDR3 que es al menos 50% homóloga a la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 26.

59. El antagonista de CD40L de la reivindicación 58, en donde dicho antagonista es un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo, dAb, FAb, un scFv, un Fv o un Fv enlazado a disulfuro.

60 Un polipéptido de anticuerpo que inhibe el enlace de un dominio variable sencillo que comprende la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26, a CD40L.

61. El polipéptido de la reivindicación 60, que se enlaza al mismo epítopo de CD40L unido mediante un dominio variable sencillo de anticuerpo que comprende la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 26.

62. El polipéptido de la reivindicación 61 que se enlaza al mismo epítopo de CD40L unido mediante un polipéptido de dominio variable sencillo, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 7-82 y 246-360, en donde el polipéptido de anticuerpo comprende o consiste de un polipéptido de dominio variable sencillo.

63. El uso del polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 60 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un síntoma de enfermedad autoinmune en un individuo.

64. Una composición que comprende el polipéptido de anticuerpo de la reivindicación 13 o 14, y un segundo polipéptido de anticuerpo que se enlaza a un ligando diferente de CD40L, en donde dicho polipéptido de anticuerpo que se enlaza a un ligando diferente de CD40L, se enlaza a un ligando seleccionado del grupo que consiste de HSA, TNFα, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN-γ, CD2, CD4, CD8, LFA1, LFA3, VLA4, CD80, B7-1, CD28, CD86, B7-2, CTLA-4, CD28, molécula co-estimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, ligando de molécula co-estimuladora inducible (ICOSL), OXL40, HVEM (Mediador de la Entrada del Virus del Herpes), LIGHT.

65. Una formulación farmacéutica de liberación prolongada que comprende un polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente de la reivindicación 13 o

14, en donde el polipéptido de anticuerpo comprende o consiste de un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo.

66. La formulación farmacéutica de liberación prolongada de la reivindicación 65, en donde dicho polipéptido de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de un dAb, Fab, scFv, Fv, o un Fv enlazado a disulfuro.

67. La formulación de la reivindicación 65, en donde dicho polipéptido de anticuerpo anti-CD40L monovalente comprende un dominio variable de anticuerpo sencillo que se enlaza a CD40L.

68. Un ligando específico dual que comprende un primer dominio variable sencillo de anticuerpo que tiene una especificidad de enlace a un primer antígeno y un segundo dominio variable sencillo que tiene una actividad de enlace a un segundo antígeno, en donde el primer antígeno es CD40L y el segundo dominio variable sencillo es un antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno, o un antígeno de superficie de célula T

69. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 68, en donde el antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno se selecciona de uno del grupo que consiste de antígenos de superficie de macrógafo activado, antígenos de superficie de célula B activados, antígenos de superficie de la ruta se señalización co-estimuladora, y MHC.

70. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 69, en donde el MHC es clase II.

71. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 70, en donde el MHC clase II es alfa.

72. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 70, en donde el MHC clase II es beta.

73. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 69, en donde el antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno se selecciona de uno del grupo que consiste de CD28, molécula co-estimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69, CD3, CD70, ligando de molécula co-estimuladora

inducible (ICOSL), OXL40, CD80, CD86, HVEM (Mediador de la Entrada del Virus del Herpes) y LIGHT.

74. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 69, en donde el antígeno de superficie de Célula que Presenta Antígeno se selecciona de uno del grupo que consiste de CD28, molécula co-estimuladora inducible (ICOS), CD27, CD30, OX40, CD45, CD69 y CD3.

75. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 69, en donde el antígeno de superficie es un antígeno de superficie del gen B7.

76. Un ligando de acuerdo con la reivindicación 75, en donde el antígeno de superficie del gen B7 es B7-2, o B7-1.

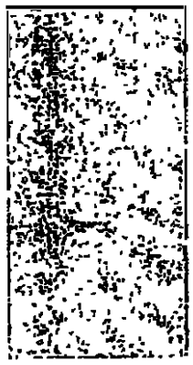


Figura 1a



Figura 1b

Figura 1

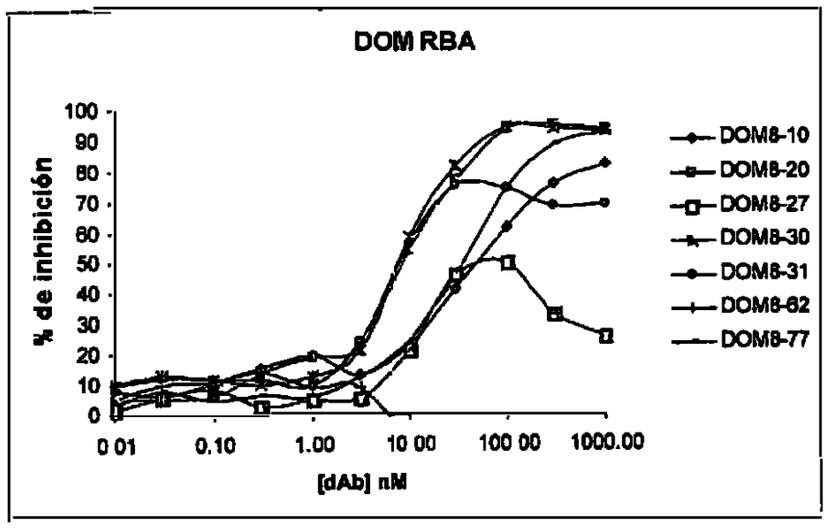

DOM RBA
% de inhibición
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 01
0.10
1.00
10 00
100 00
1000.00
[dAb] nM
DOM8-10
DOM8-20
DOM8-27
DOM8-30
DOM8-31
DOM8-62
DOM8-77

Figura 2

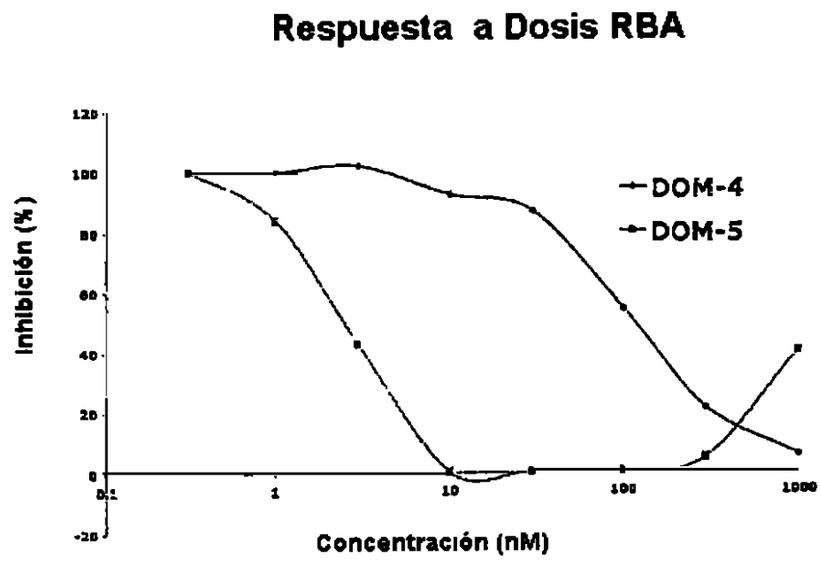

Respuesta a Dosis RBA
Inhibición (%)
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.1
1
10
100
1000
Concentración (nM)
DOM-4
DOM-5

Figura 3

Curva de respuesta a concentración para DOM8-24

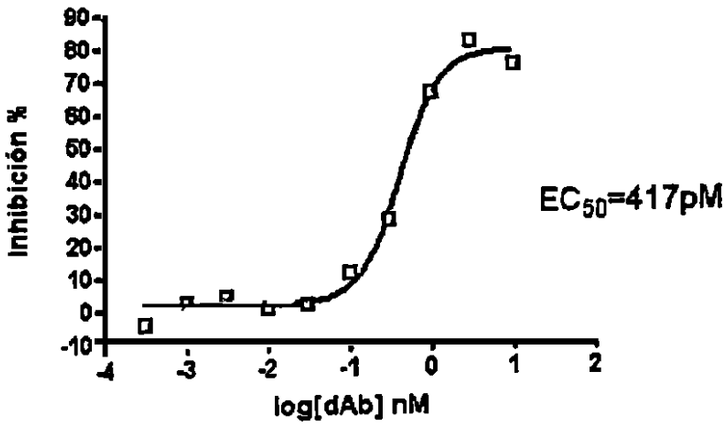


Figura 4

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

      S  L  P  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y
49    TCC CTG CCT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
      AGG GAC GGA GAG AGG ACA CGT CGG AGG CCT AAG TCG AAA TCG TCG ATA
                                                  HCDR1
      A  M  S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V
97    GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGT CTA GAG TGG GTC
      CGG TAC TCG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCA GAT CTC ACC CAG

      S  A  I  S  G  S  G  G  S  T  Y  Y  A  D  S  V
145   TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG
      AGT CGA TAA TCA CCA TCA CCA CCA TCG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC
                              HCDR2
      K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y
193   AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC CGT GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
      TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG GCA CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC ATA

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

Figura 5

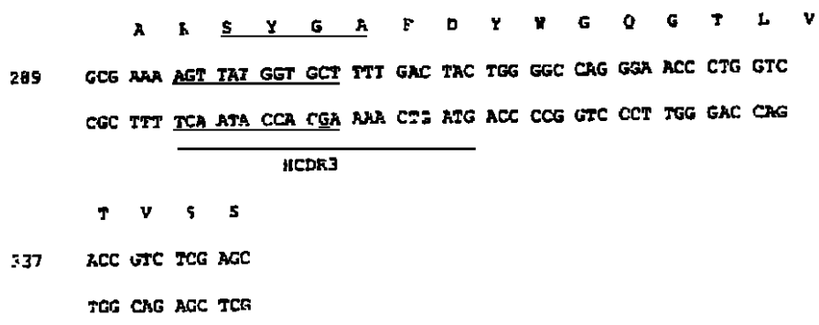


Figura 5 (Cont.)

```
      D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G
1     GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA
      CTG TAG GTC TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGG GAC AGA CGT AGA CAT CCT

      D   R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   S   I   S   S   Y
49    GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT
      CTG GCA CAG TGG TAG TGA ACG GCC CGT TCA GTC TCG TAA TCG TCG ATA
                                  ========================
                                            LCDR1
      L   N   W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I
97    TTA AAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC
      AAT TTA ACC ATG GTC GTC TTT GGT CCC TTT CGG GGA TTC GAG GAC TAG
      ----------

      Y   A   A   S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G
145   TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC
      ATA CGA CGT AGG TCA AAC GTT TCA CCC CAG GGT AGT GCA AAG TCA CCG
            ----------
            LCDR2
      S   G   S   G   T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P
193   AGT GGA TCT CGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT
      TCA CCT AGA GCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG TCG TCA GAC GTT GGA

      E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q   S   Y   S   T   P   N
241   GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT AAT
      CTT CTA AAA CGA TGC ATG ATG ACA GTT GTC TCA ATG TCA TGG GGA TTA
                                  ========================
                                            LCDR3
      T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K   R
289   ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
      TGC AAG CCG GTT CCC TGG TTC CAC CTT TAG TTT GCC
      ---
```

Figura 6

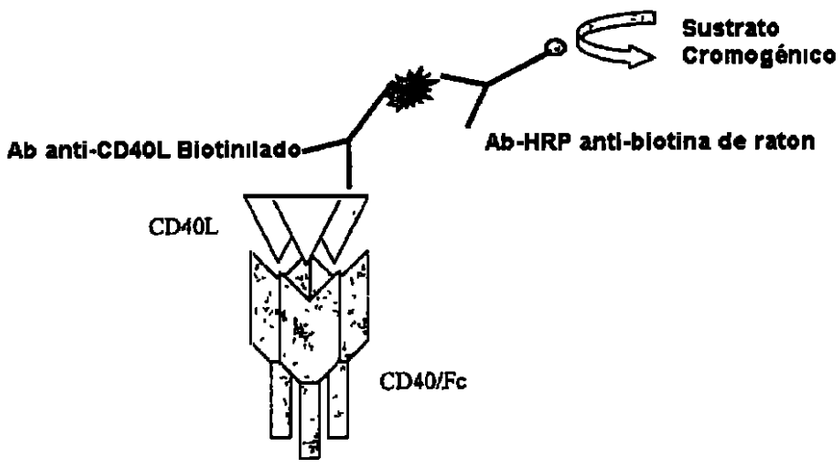

Sustrato
Cromogénico
Ab anti-CD40L Biotinilado
Ab-HRP anti-biotina de raton
CD40L
CD40/Fc

Figura 7

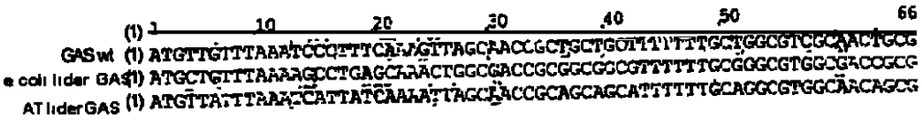

(1) 1 10 20 30 40 50 66
GAS wt (1) ATGTTGTTTAAATCCCTTTCAAAGTTAGCAACGCTGCTGCTTTTTTTGCTGGCGTCGCAACTGCG
e coli lider GAS (1) ATGCTGTTTAAAAGCCTGAGCAAACTGGCGACCGCGGCGGCGTTTTTTGCGGGCGTGGCGACCGCG
AT liderGAS (1) ATGTTATTTAAACCATTATCAAAATTAGCAACCGCAGCAGCATTTTTTGCAGGCGTGGCAACAGCG

Figura 8

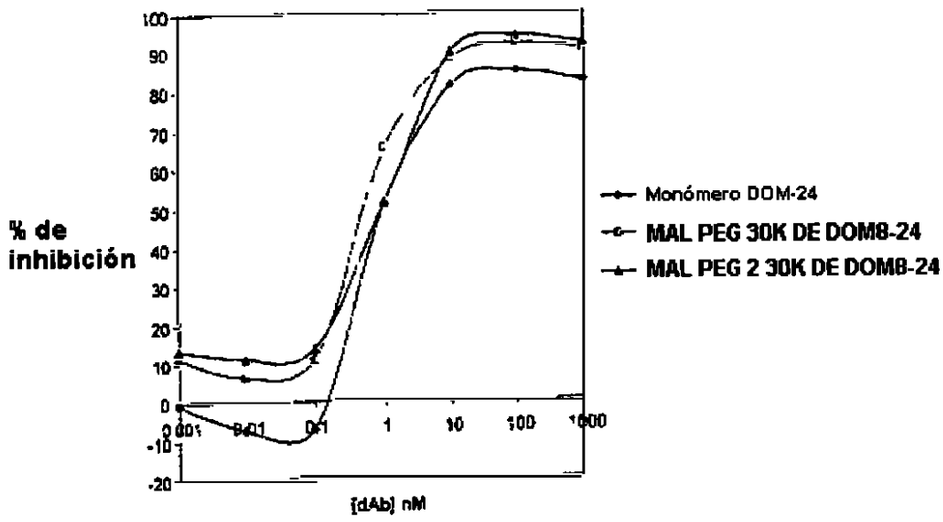

% de inhibición
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[dAb] nM
Monómero DOM-24
MAL PEG 30K DE DOM8-24
MAL PEG 2 30K DE DOM8-24

Figura 9

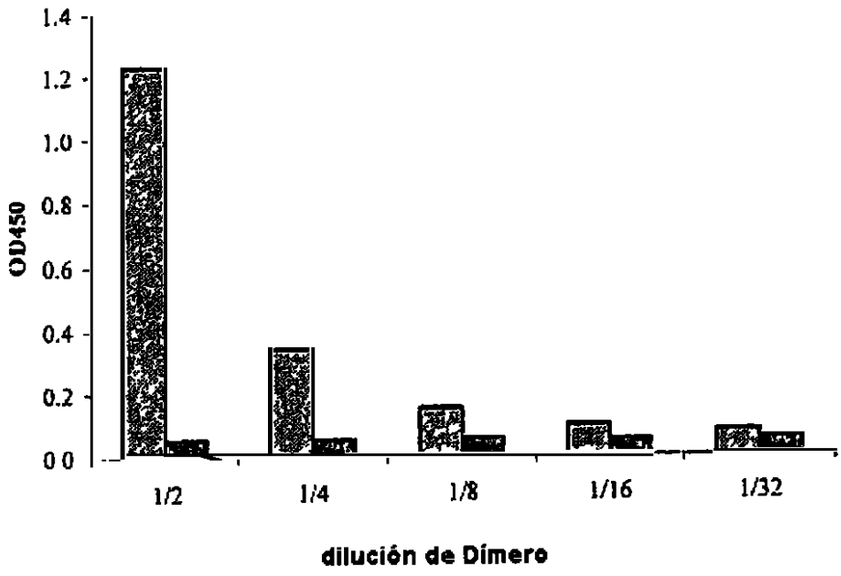


Figura 10

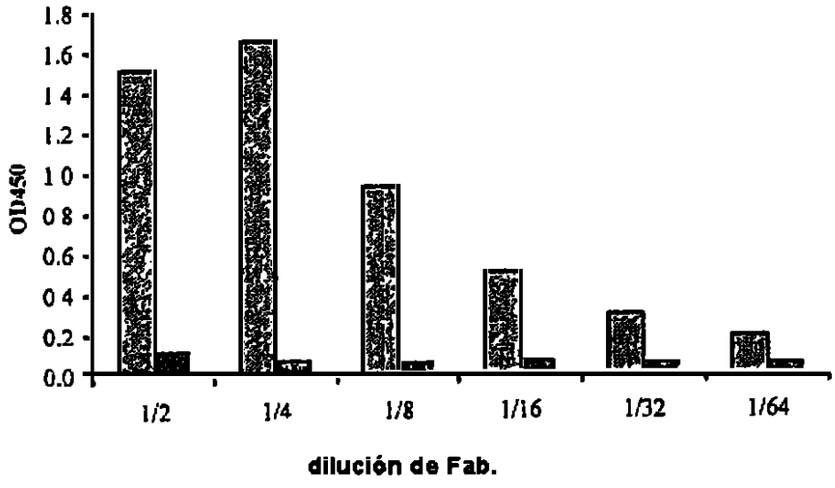

1.8
1.6
1 4
1.2
1 0
0 8
0.6
0 4
0.2
0.0
OD450
1/2
1/4
1/8
1/16
1/32
1/64
dilución de Fab.

Figura 11

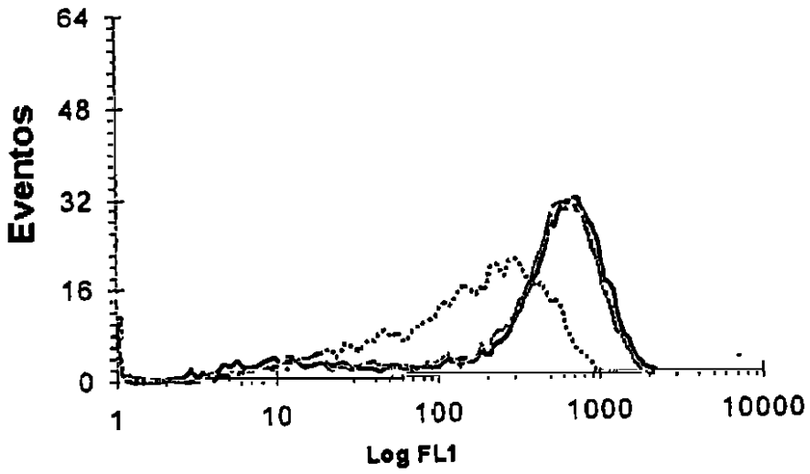


Figura 12

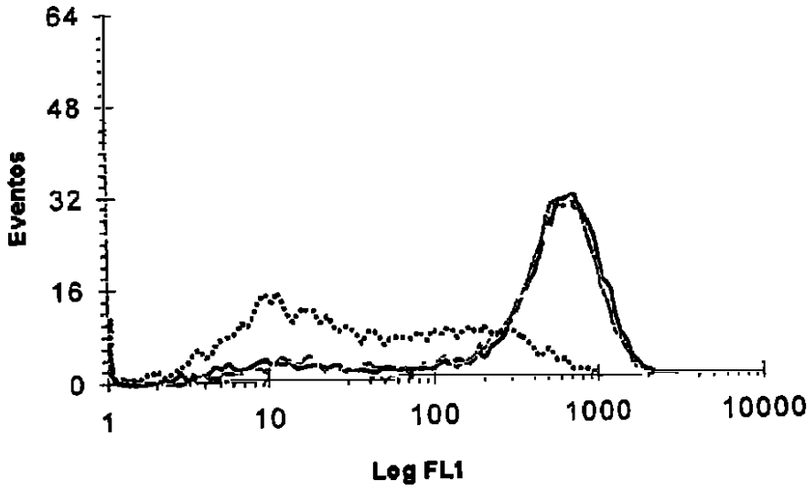


Figura 13